Salo Semelmann Haratz

Nova metodologia de Doppler transcraniano funcional durante tarefa motora unimanual

Tese apresentada ao Departamento de Neurologia da Faculdade
de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de: Neurologia

Área de concentração: Neurologia

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Bastos Conforto

Coorientador: Dr. Edson Bor Seng Shu

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2014

Salo Semelmann Haratz

Nova metodologia de Doppler transcraniano funcional durante tarefa motora unimanual

Tese apresentada ao Departamento de Neurologia da Faculdade
de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de: Neurologia

Área de concentração: Neurologia

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Bastos Conforto

Coorientador: Dr. Edson Bor Seng Shu

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Semelmann Haratz, Salo

Nova metodologia de Doppler Transcraniano funcional durante tarefa motora unimanual / Salo Semelmann Haratz – São Paulo, 2014.

Tese(doutorado) –Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Neurologia.

Orientadora: Adriana Bastos Conforto

Coorientador: Edson Shu

Descritores: 1.Ultrassonografia Doppler Transcraniana 2. Neuroimagem Funcional 3.Lateralidade Funcional

USP/FM/DBD-378/12

À minha esposa, Nina e à minha filha, Maya

AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento mais profundo só poderia ser dedicado a uma pessoa: minha esposa. O tempo todo ao meu lado, incondicionalmente. Nos momentos mais difíceis, que não foram raros, sempre me fazendo acreditar que chegaria ao final desta difícil, porém gratificante etapa. Sou grato por cada gesto carinhoso, cada sorriso e ansioso por estar ao seu lado, o resto da minha vida. Obrigado Nina, meu Amor!

À minha mãe, pelo exemplo de vida que é.

Aos meus irmãos, por todos os momentos partilhados, eternos amigos, confidentes e apoiadores.

À Profa. Dra. Adriana, minha orientadora, pela extrema dedicação, pelos ensinamentos, pela competência científica, pela disponibilidade e generosidade reveladas ao longo destes anos de trabalho, assim como pelas críticas, correções e sugestões relevantes feitas durante a orientação.

Ao Prof. Dr. Edson Shu, meu coorientador, pelo estímulo constante e pelo apoio para a realização deste trabalho.

Ao Dr. João Ricardo Sato, pelos ensinamentos e inestimável contribuição.

Aos colaboradores dessa pesquisa Walter Hugo Lopez Pinaya e Dr. Francisco Fraga, pela parceria e ajuda.

Ao Prof. Dr. David Tanne e aos colegas do Sheba Medical Center que me acolheram em Israel e me possibilitaram transformar um grande sonho em realidade.

À Divisão de Clínica Neurológica, por minha formação.

Aos meus queridos amigos, por se manterem sempre presentes, mesmo durante os momentos em que estive ausente.

Aos colegas do Laboratório de Neuroestimulação, pelo apoio e companheirismo.

A Reiko Uchizono, Sueli Martins, Alair M. S. Silva, Elizabeth Lauritano, Cecília Milani, Erli V. Soares Jr., Vera L. Pereira, Valdenira S. Silva e Vanessa Ramos, pela amizade e paciência.

Aos voluntários que participaram dos experimentos; sem eles, este trabalho não teria sido possível.

A Deus, por me proporcionar tudo.

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Símbolos

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	8
3. REVISÃO DA LITERATURA	11
3.1. Aspectos fisiológicos da hemodinâmica cerebral	11
3.2. Efeito Doppler e Doppler transcraniano	16
3.3. O Doppler transcraniano funcional	20
3.3.1. História do Doppler transcraniano funcional	21
3.3.2. O sinal Doppler e as metodologias de análise do Doppler transcraniano funcional	24
3.3.3. Comparação do Doppler transcraniano funcional com outras técnicas de neuroimagem funcional	32
3.3.4. Aplicações clínicas do Doppler transcraniano funcional	34
4. MÉTODOS	37
4.1. Desenvolvimento de um novo método de análise de Doppler transcraniano funcional para análise de lateralização hemisférica	38
4.1.1. Determinação da linha de base	38
4.1.2. Normalização dos valores brutos	39

4.1.3. O índice de velocidade relativa	39
4.1.4. Suavização do sinal	41
4.1.5. Análise da lateralização	42
4.2. Avaliação da lateralização hemisférica em indivíduos saudáveis	45
4.2.1. Características da amostra	45
4.2.2. Experimentos	48
4.3. Correlação entre o índice de ativação hemisférica e preferência manual, avaliada pelo Inventário de Dominância Manual de Edimburgo	52
4.3.1. Inventário de Dominância Manual de Edimburgo	52
4.3.2.. Correlação com o Inventário de Dominância Lateral de Edimburgo	53
4.4. Análise estatística	53
5. RESULTADOS	56
5.1. Desenvolvimento de um novo método de análise de Doppler transcraniano funcional para análise da lateralização hemisférica	56
5.2 Avaliação da ativação hemisférica na prova motora unimanual	56
5.3 Relação entre o Índice de ativação e o Inventário de Dominância Lateral de Edimburgo	58
6. DISCUSSÃO	61
6.1. Novo método de análise de Doppler transcraniano funcional na prova motora manual	61
6.2. Lateralização hemisférica da atividade cortical durante paradigma motor manual em um grupo de voluntários saudáveis	64

6.3. Relação entre o índice de ativação hemisférica do Doppler transcraniano funcional e a preferência manual pelo Inventário de Dominância Lateral de Edimburgo	67
6.4. Limitações	69
6.5 Considerações finais	69
7. CONCLUSÕES	72
8. ANEXOS	73
9. REFERÊNCIAS	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

M1	Córtex motor primário
PET	Tomografia por emissão de prótons
SPECT	Tomografia computadorizada por emissão de fóton único
CO ₂	Dióxido de Carbono
ATP	Adenosina trifosfato
BOLD	Blood-oxygenation level dependent
NO	Óxido nítrico
μm	Micrometro
μV	Microvolt
Hz	Hertz
cpm	Ciclos por minuto
mm	Milímetros
mmHg	Milímetros de mercúrio
bpm	Batimentos por minuto

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características da amostra	48
Tabela 2. Ativação hemisférica motora obtida com Doppler transcraniano funcional e preferência manual motora do indivíduos	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O acoplamento neurovascular.....	3
Figura 2. As interações entre um evento, o acoplamento neurovascular e as técnicas sensíveis ao fluxo sanguíneo	4
Figura 3. Um estudo de Doppler transcraniano funcional	6
Figura 4. O exame de Doppler transcraniano funcional	7
Figura 5. Mecanismo celular do acoplamento neurovascular	12
Figura 6. Controle do acoplamento vascular mediado por astrócitos.....	14
Figura 7. Esquema de aplicação de efeito Doppler	16
Figura 8. O transdutor, sua relação com o crânio e o Polígono de Willis.....	17
Figura 9. Janelas acústicas para realização do Doppler Transcraniano	19
Figura 10. A fixação dos transdutores.	19
Figura 11. Tela do aparelho de Doppler transcraniano	25
Figura 12. O espectro da velocidade do fluxo sanguíneo cerebral.	27
Figura 13. Influência do ângulo de insonação	29
Figura 14. A suavização por polinômios cúbicos do tipo <i>splines</i>	30
Figura 15. A análise do sinal de Doppler transcraniano funcional.....	38
Figura 16. Os períodos do exame de Doppler transcraniano funcional	43
Figura 17. Indivíduo durante prova de ativação motora	49
Figura 18. O equipamento de Doppler transcraniano funcional.	50
Figura 19. Índice de lateralização das tarefas motoras	58
Figura 20. Correlação entre o Inventário de Edimburgo com o Índice de Ativação	59

RESUMO

Haratz SS. Nova metodologia de Doppler transcraniano funcional durante tarefa motora unimanual. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

INTRODUÇÃO: O Doppler Transcraniano funcional pode avaliar mudanças na velocidade do fluxo sanguíneo encefálico associadas a tarefas cognitivas e/ou sensitivo-motoras. Mede de maneira indireta a atividade metabólica de regiões cerebrais, segundo o princípio do acoplamento neurovascular. Os objetivos deste estudo foram: desenvolver um novo método de análise de Doppler transcraniano funcional para análise da lateralização hemisférica e verificar a capacidade deste novo método em diferenciar a lateralização hemisférica durante a execução de uma tarefa motora unimanual por indivíduos saudáveis. Adicionalmente, a lateralização hemisférica foi correlacionada com a preferência manual nestes indivíduos.

MÉTODOS: Treze indivíduos saudáveis foram submetidos a um exame de Doppler transcraniano funcional durante uma prova de ativação motora manual (oposição de dedos). As sessões de Doppler transcraniano funcional foram realizadas com aparelho *Doppler-Box Transcranial Doppler Unit*. A prova manual compreendeu uma sequência de movimentos de oposição do primeiro e segundo dedos (*thumb-to-finger opposition movement*) realizado por uma mão e depois pela outra, em uma frequência de 1 movimento por segundo (1Hz) fornecida por um metrônomo digital. Durante a execução dos movimentos, foram insonadas simultaneamente as artérias cerebrais médias direita e esquerda. Para interpretação dos dados de Doppler transcraniano funcional desenvolvemos um novo programa de análise denominado FDAT, que tem vantagens de sofrer mínima influência de artefatos de ruído no sinal e de não assumir um formato pré-determinado da resposta hemodinâmica cerebral. Foi calculado um índice de lateralização (IL) como a diferença entre a velocidade relativa média da época de ativação e a velocidade relativa média da época de repouso para cada prova motora. Foi calculada a diferença dos valores de IL ($IL_e - IL_d$) provenientes da análise com cada método, obtendo-se um índice de ativação, próprio de cada sujeito. A comparação do índice de ativação durante a movimentação da mão direita, e durante a movimentação da mão esquerda, foi feita com o teste de Wilcoxon. A correlação entre o índice de ativação e a preferência manual avaliada pelo Inventário de Edimburgo foi avaliada pelo coeficiente rho de Spearman.

RESULTADOS: Houve uma diferença estatisticamente significativa entre o IA obtido durante a movimentação da mão direita ou da mão esquerda ($p=0,02$). Houve correlação estatisticamente significativa entre a preferência manual e a assimetria na lateralização hemisférica identificada pelo Doppler Transcraniano funcional ($\rho = 0.85$, $p<0.001$).

CONCLUSÕES: A análise do Doppler Transcraniano funcional mostrou-se viável pelo método proposto, capaz de avaliar o grau de lateralização hemisférica em uma prova de ativação motora, com boa correlação com a preferência manual. Trata-se de uma ferramenta prática, não invasiva e de baixo custo para a avaliação da lateralização hemisférica em determinadas provas funcionais.

Descritores: Ultrassonografia Doppler Transcraniana; Neuroimagem Funcional; Lateralidade Funcional

SUMMARY

Haratz SS. New methodology for functional transcranial Doppler during an unimanual motor task [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014.

INTRODUCTION: Functional transcranial Doppler is a method for the assessment of changes in blood flow velocity of the middle cerebral artery. An asymmetric increase in blood flow velocity is a marker of hemispheric lateralization during unimanual motor task performance. The aims of this study were to propose a novel and efficient method for functional transcranial Doppler analysis based on cubic smoothing splines, and to verify the ability of this method to identify hemispheric lateralization during unimanual motor task performance in healthy subjects. In addition, hemispheric lateralization was correlated with handedness in these subjects.

METHODS: Thirteen healthy subjects participated in the study. Blood flow velocities in the right and left middle cerebral arteries were recorded using functional transcranial Doppler during a finger-tapping task with either the right or left hand. Data were analyzed with a multi-step new method that included: baseline determination, raw data normalization, smoothing, lateralization Index calculation, definition of rest and motor task epochs and activation Index calculation. A positive activation Index reflects right-hemisphere lateralization and a negative activation index, left hemisphere lateralization.

RESULTS: There was a statistically significant difference between the activation index obtained during right or left hand movements ($p=0.02$). Hand dominance was significantly correlated with asymmetry in hemispheric lateralization assessed with functional transcranial Doppler ($\rho = 0.85$, $p<0.001$).

CONCLUSIONS: This novel method for functional transcranial Doppler analysis was capable to assess the hemispheric lateralization during motor task performance, and correlated well with handedness. It is a practical, non-invasive and unexpensive tool for the assessment of hemispheric lateralization.

Descriptors: Transcranial Doppler Ultrasonography; Functional Neuroimaging; Functional Laterality

1.Introdução

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas houve um substancial aumento no interesse por novas tecnologias de imagem funcional, as quais são ferramentas eficientes para o estudo do processo de funcionamento de diferentes regiões cerebrais.

Tais técnicas de imagem funcional baseiam-se, em sua maioria, no acoplamento neurovascular, que é um processo fisiológico no qual ocorre aumento da perfusão tecidual cerebral sob demanda metabólica local¹⁻³ (Figura 1).

Sabe-se que provas de estimulação cognitiva, sensitiva ou motora ativam neurônios em regiões específicas do encéfalo, aumentando a demanda destas regiões por oxigênio, glicose e outros metabólitos. A monitoração do fluxo sanguíneo cerebral durante estas provas pode fornecer informações indiretas sobre a atividade metabólica destas regiões, tanto em indivíduos saudáveis quanto após acidente vascular cerebral. Estas informações são úteis para algumas situações clínicas como, por exemplo: avaliação da dominância hemisférica da linguagem⁴, avaliação de neuroplasticidade neuronal após acidente vascular cerebral⁵ ou pesquisas no campo da neuropsicologia⁶.

Figura 1. Representação esquemática do acoplamento neurovascular (Adaptado de Deppe⁷).

Outro conceito importante é o de lateralização hemisférica. Por exemplo, no caso de tarefas manuais, a preferência ou dominância manual pode ser avaliada pelo Inventário de Dominância Lateral de Edimburgo⁸. Em indivíduos destros, habitualmente o hemisfério dominante para a realização de tarefas manuais é o esquerdo⁹. Esta dominância pode ser demonstrada pelo aumento mais pronunciado da atividade neuronal no córtex motor primário (M1) contralateral à mão dominante que realiza uma atividade motora manual unilateral, embora haja um aumento da atividade metabólica e do fluxo sanguíneo em ambos os hemisférios cerebrais¹⁰⁻¹².

Diferentes técnicas de neuroimagem funcional já foram utilizadas para estudar-se a lateralização hemisférica com paradigma motor manual¹³ (Figura 2). Uma delas é a aferição do aumento da velocidade do fluxo sanguíneo nas artérias

cerebrais médias através de Doppler transcraniano. Observa-se assimetria do fluxo sanguíneo durante a execução da tarefa motora, denominada “prova de ativação motora”.

Figura 2. As interações entre um evento, o acoplamento neurovascular e as técnicas sensíveis ao fluxo sanguíneo: PET, Ressonância funcional e Doppler transcraniano funcional (Adaptado de DeYoe ¹⁴).

A magnetoencefalografia¹⁵ e a eletroencefalografia¹⁶ também são métodos que podem avaliar a mudança na atividade neuronal durante a realização de tarefas (“provas de ativação”), porém têm limitada resolução espacial. Outros métodos de avaliação da resposta hemodinâmica são a tomografia por emissão de prótons (PET)¹⁷, a tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT)¹⁸ e a ressonância magnética funcional¹⁹. Entretanto, a baixa resolução temporal, o uso de marcadores radioativos (PET e SPECT) e a necessidade de manter o paciente em uma posição fixa para evitar artefatos (particularmente na ressonância magnética

funcional) são importantes limitações destes métodos^{7, 20}.

O Doppler transcraniano foi introduzido na prática clínica na década de 80 por Rune Aaslid²¹. É um exame não invasivo baseado no sistema de emissão pulsada de ondas sonoras de baixa frequência, utilizado para avaliar a hemodinâmica encefálica²². Desde a sua invenção, as indicações clínicas do Doppler transcraniano vêm se expandindo²³. Dentre suas vantagens, pode ser realizado à beira do leito e repetido quando necessário, além de possibilitar monitoração contínua. É menos oneroso que outros métodos e não utiliza agentes de contraste tóxicos²⁴.

O Doppler transcraniano funcional utiliza o Doppler transcraniano clássico para monitorizar a resposta hemodinâmica cerebral sob diferentes condições de estímulos, tais como provas motoras, visuais ou cognitivas. Trata-se de um método de baixo custo que tem excelente resolução temporal e, em contraste com a ressonância magnética funcional, permite ao paciente movimentar-se livremente durante o exame²⁵. Além disso, é um exame seguro²⁶ e, se realizado conforme as recomendações oficiais internacionais, não oferece riscos aos pacientes²⁷.

Até a década de 1990, a tecnologia disponível permitia o monitoramento das artérias intracranianas de um hemisfério apenas, não sendo possível a avaliação concomitante de ambos os lados. Atualmente, com os modernos aparelhos multicanais, a avaliação simultânea bilateral passou a ser possível, permitindo comparações de velocidades de fluxo entre os dois hemisférios a cada centésimo de segundo.

Um importante avanço no campo do Doppler transcraniano funcional foi obtido por Deppe et al.²⁸, que desenvolveram um programa semiautomático de computador para análise de ativação cerebral diante de vários paradigmas (Figura

3).

Figura 3. Exemplo de configuração de um estudo de Doppler transcraniano funcional utilizando o programa *Average*, para a avaliação da atenção e dominância da linguagem. ACMd – artéria cerebral media direita; ACMe – artéria cerebral media esquerda; DTC – Doppler transcraniano; (Adaptado de Deppe²⁸).

Apesar disso, o uso do Doppler transcraniano funcional em larga escala é ainda limitado porque a maioria dos modelos de análise assume arbitrariamente um padrão da resposta hemodinâmica cerebral e não há consenso sobre qual o melhor método²⁹⁻³². Modelos flexíveis do sinal neurovascular são preferíveis porque a função exata da resposta hemodinâmica não é conhecida³³.

Os métodos de análise tradicionais integram o sinal do Doppler transcraniano com o ciclo cardíaco, geralmente regular em indivíduos jovens. Pacientes idosos, no entanto, podem receber leituras incorretas da resposta hemodinâmica cerebral, especialmente aqueles com arritmias cardíacas. Levando-se em conta que estudos de lateralização hemisférica com Doppler transcraniano funcional são especialmente relevantes em pacientes após acidente vascular cerebral isquêmico, que afeta predominantemente indivíduos idosos, e que a fibrilação atrial é responsável por até 20% dos casos³⁴, é altamente desejável um método que não dependa da integralização com o ciclo cardíaco.

Dada a crescente importância do Doppler transcraniano funcional como ferramenta clínica e de pesquisa há a necessidade de uma técnica de análise que seja simples e sobreponha-se às limitações descritas acima. Além disso, deve ser de baixo custo e ter elevada sensibilidade.

O objetivo deste projeto é desenvolver um novo método de análise de Doppler transcraniano funcional para determinar lateralização hemisférica durante uma tarefa motora unimanual, conforme representado na figura 4, no intuito de detectar o aumento assimétrico na velocidade do fluxo sanguíneo cerebral da artéria cerebral média.

Figura 4. Representação esquemática do exame de Doppler transcraniano funcional. No centro os sinais relativos à velocidade de fluxo obtidos do aparelho e acima os sinais brutos de cada artéria cerebral média.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Desenvolver um novo método de análise de Doppler transcraniano funcional para análise da lateralização hemisférica cerebral durante paradigma motor unimanual, com mínima influência de artefatos de ruído no sinal e com formato da resposta hemodinâmica cerebral flexível, não pré-determinado.

2.2. Verificar a capacidade deste novo método em diferenciar a lateralização hemisférica durante paradigma motor manual em um grupo de voluntários saudáveis.

2.3. Correlacionar o índice de ativação hemisférica obtido através desta nova metodologia de análise e a preferência manual, avaliada pelo inventário de Edimburgo.

3. Revisão da Literatura

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Aspectos fisiológicos da hemodinâmica cerebral

O cérebro é um órgão cuja demanda de energia absorve 25% do débito cardíaco, embora compreenda apenas 2,5% do peso corporal³⁵. Devido a um estado metabólico aeróbico estrito e à falta de estoques de oxigênio ou substratos, a atividade cerebral é extremamente dependente de um suprimento sanguíneo apropriado³⁶ e de mecanismos regulatórios eficientes. O acoplamento neurovascular é um mecanismo cerebral eficaz, rápido, intrínseco e vasoregulador que adapta o fluxo sanguíneo cerebral local de acordo com a atividade metabólica neural subjacente (Figura 5), permitindo fornecimento contínuo de substratos ao leito microvascular^{37, 38}.

A ativação neuronal é seguida por uma sequência de eventos celulares, metabólicos e vasculares. A nível celular, vários processos requerem energia na forma de adenosina trifosfato (ATP)^{39, 40} e, no cérebro, aproximadamente 90% de glicose é metabolizada em condições aeróbicas⁴¹. Um suprimento contínuo de glicose e oxigênio é mantido pelo fluxo sanguíneo cerebral através da rede complexa de vasos.

Figura 5. Mecanismo celular do acoplamento neurovascular, participação das células piramidais, interneurônios GABA e astrócitos. ACh – Acetilcolina; NA – Noradrenalina; 5-HT – Serotonina; DA – Dopamin; NO – Óxido nítrico; PGE₂ – Prostaglandina E2; COX-2 – Cicloxigenase 2. (Adaptado de Cauli⁴²).

A magnitude e a localização topográfica das micromudanças do fluxo sanguíneo são, por sua vez, diretamente proporcionais à atividade neuronal local. Estes processos estão intimamente relacionados, dependendo de uma cascata de eventos regulatórios envolvendo neurônios perivascular, astrócitos, células endoteliais e células musculares lisas, compreendendo o que denomina-se a unidade neurovascular⁴³.

A correlação entre as alterações na atividade neural, no metabolismo e as mudanças no fluxo sanguíneo cerebral são claras e bem definidas pela literatura, embora os mecanismos que relacionem esses processos ainda não estejam bem definidos⁴⁴. Embora intuitiva, a idéia de que a oferta de energia (ou seja, o fluxo

sanguíneo local) é controlada diretamente pela demanda de energia (isto é, a atividade metabólica) parece estar demasiado simplificada⁴⁵. Uma teoria proposta é a do controle por mecanismos de retroalimentação que são sensíveis a variações das concentrações iônicas e moleculares de subprodutos do metabolismo celular⁴⁶, e desencadeiam vasodilatação ou vasoconstrição endotelial cerebral⁴⁷.

Outra proposta é que o fluxo sanguíneo cerebral seja controlado diretamente por um mecanismo que envolve a sinalização neuronal através de neurotransmissores^{48, 49}, (Figura 6). Os astrócitos desempenhariam um papel crucial na função de ligação destes com as respostas vasculares^{35, 39, 50} via reciclagem de glutamato⁵¹ e produção de agentes químicos vasoativos⁵². Assim, o acoplamento neurovascular seria mediado por mecanismos de sinalização por meio de vias gliais, ao invés de simples percepção de consumo de energia. Ainda, existem evidências adicionais de que a inervação neuronal direta de células de músculo liso pode controlar o fluxo sanguíneo⁴³, entre outras teorias^{2, 49, 53}.

Cabe notar que o acoplamento neurovascular é fundamental para que a função cerebral seja ininterrupta, uma vez que requer um suprimento contínuo de nutrientes e substratos além da eliminação de produtos residuais, tais como CO₂ e calor excessivo^{51, 54, 55}. O fato desse processo ocorrer em uma fina escala espaço-temporal fornece a base para muitas das técnicas de neuroimagem funcional³⁷.

Figura 6. Controle do acoplamento vascular mediado por astrócitos. Representação esquemática das diferentes vias de sinalização que controlam a resposta vascular cerebral frente à atividade neuronal. A elevação na concentração de Ca^{2+} nas terminações celulares dos astrócitos representa um passo crucial no mecanismo de acoplamento vascular e é mediada por glutamato, GABA e neuropeptídeos liberados por interneurônios ativados. (Adaptado de Carmignoto ³⁵).

Embora a atividade neural e o fluxo sanguíneo estejam conectados, é importante compreender quais aspectos da atividade neural desencadeiam a resposta vascular⁴⁵. A atividade sináptica é o sinal de entrada (*input*) para o neurônio, enquanto os potenciais de ação são os sinais de saída (*output*) que permitem a comunicação entre os neurônios. A maioria dos estudos de processamento sensorial demonstrou que a transmissão sináptica e os potenciais de ação estão altamente correlacionados entre si e com a resposta vascular⁵⁶. No entanto, quando dissociados, a resposta vascular reflete mais a atividade sináptica e

pode não servir como um indicador dos potenciais de ação numa população neural⁵⁷. Diferentes métodos de imagem funcional foram utilizados no intuito de demonstrar como estes dois sinais estão acoplados no espaço, no tempo e em amplitude. Existe uma densa rede de capilares (distância intercapilar de 25µm) que penetra na substância cinzenta⁵⁸. Mapas representativos das colunas neurais podem ser obtidos através de um reforço do sinal deste componente capilar⁵⁹.

Uma das limitações dos modelos experimentais de acoplamento neurovascular é a falta de informação temporal da resposta vascular⁶⁰. A resposta do fluxo sanguíneo para um breve período de ativação neuronal é normalmente retardada por 1 a 2 segundos e atinge seu pico em 4 a 6 segundos após a resposta neural⁵¹. Devido a este atraso é improvável que a modulação rápida da atividade neural seja refletida na resposta vascular. O retardo do fluxo sanguíneo relativo à atividade neuronal provavelmente é relacionado à difusão e absorção lentas de mediadores neurovasculares⁶¹. Apesar deste moroso processo, diversos estudos asseguram que a precisão com que a resposta vascular reflete temporalmente a atividade neuronal é da ordem de milésimos de segundo^{1, 55, 62}.

3.2. Efeito Doppler e Doppler transcraniano

Os princípios do exame de Doppler transcraniano são exatamente os mesmos de qualquer exame de Dopplerfluxometria⁶³. A técnica baseia-se no efeito Doppler⁶⁴, que ocorre quando um transdutor emite uma onda sonora que incide sobre um objeto em movimento (eritrócitos no interior do vaso sanguíneo) e é imediatamente refletida e captada de volta pelo transdutor com frequência diferente da emitida, proporcional à velocidade de fluxo dentro do vaso (Figura 7). A frequência refletida é maior quando os eritrócitos se aproximam e menor quando se afastam do transdutor²¹.

Figura 7. Esquema de aplicação de efeito Doppler. A relação entre comprimento de onda e frequência é de $f = \frac{c}{\lambda}$ onde c é a velocidade da onda, f é a frequência e λ o comprimento da onda. V – velocidade; λ_{em} – comprimento da onda emitida; λ_{rec} – comprimento da onda recebida; ϕ - ângulo de insonação do feixe ultrassônico.

Através desse princípio é possível estimar a velocidade do fluxo de sangue no interior dos vasos sanguíneos , conforme a equação 1.

$$v = \frac{c}{2 \cos \phi} \frac{\Delta f}{f_{em}} \quad (1)$$

Onde v é a velocidade da partícula, c é a velocidade do som nos tecidos biológicos ($c \approx 1550$ m/s), f_{em} é a frequência emitida no transdutor, ϕ é ângulo de insonação do feixe ultrassônico e Δf é a diferença na frequência do eco em relação ao sinal emitido.

O exame de Doppler transcraniano permite medir a velocidade de fluxo sanguíneo cerebral nas principais artérias do polígono de Willis de maneira simples e contínua, não invasiva e com baixo custo^{12, 21} (Figura 8).

Figura 8. Ilustração do transdutor, sua relação com o crânio e o Polígono de Willis (Adaptado de Aaslid²¹).

Uma vez que o Doppler transcraniano não dispõe de informações morfológicas, e sim apenas de informações com relação à velocidade do fluxo, o diâmetro e a localização exatos do vaso são desconhecidos. Desta forma, para a aferição da velocidade de fluxo nas artérias cerebrais assume-se um diâmetro constante do vaso insonado⁶⁵ e, assim sendo, as alterações relativas do sinal Doppler têm a capacidade de fornecer estimativas fidedignas do fluxo sanguíneo cerebral^{66, 67}.

Para realização do exame, utiliza-se tipicamente um transdutor de baixa frequência (2-4MHz), uma vez que frequências mais elevadas são incapazes de atravessar os ossos cranianos. A insonação é realizada através de janelas acústicas, que são regiões cranianas de baixa densidade óssea ou forames ósseos, para a avaliação das artérias intracerebrais (Figura 9). Aproximadamente 10% dos indivíduos não possuem uma janela acústica adequada para realizar DTC³⁶, sendo que esta proporção é maior em indivíduos negros e de maior idade⁶⁸.

Os transdutores de Doppler podem ou não ser fixados à cabeça do paciente com uma fita ou através de um capacete, como demonstrado na Figura 10.

Figura 9. Janelas acústicas no crânio para realização do Doppler Transcraniano (Fonte: Adaptado de Fujioka ⁶⁹).

Figura 10. Fotografia da fixação dos transdutores através de um capacete para acesso às artérias cerebrais basais.

3.3. O Doppler transcraniano funcional

O Doppler transcraniano funcional é um importante instrumento diagnóstico e de pesquisa em muitos laboratórios neurovasculares³⁵. Este exame permite a monitorização em tempo real das flutuações da velocidade de fluxo sanguíneo cerebral durante o repouso e durante a execução de algum paradigma de ativação cortical⁷⁰.

Durante uma ativação cortical, seja motora, cognitiva ou visual, ocorre um aumento na velocidade de fluxo sanguíneo cerebral nas artérias de ambos os hemisférios cerebrais de acordo com o mecanismo de acoplamento neurovascular previamente descrito. Sabe-se que um maior aumento na velocidade de fluxo sanguíneo cerebral ocorre no hemisfério dominante à respectiva ativação^{71, 72}. A artéria cerebral média conduz cerca de 80% do volume do fluxo recebido pelo hemisfério cerebral, podendo ser utilizada como referência para análise da ativação cortical na maioria dos paradigmas cognitivos e motores¹².

Devido à alta resolução temporal do Doppler transcraniano funcional, é possível monitorar a velocidade de fluxo sanguíneo cerebral e com elevada precisão, permitindo o estudo da lateralização cerebral relacionada com a ativação^{12, 66, 73, 74}.

As maiores vantagens deste exame em relação a outras técnicas de imagem funcional como a tomografia por emissão de pósitrons (PET), tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) e ressonância magnética funcional são sua elevada resolução temporal, liberdade de movimento do paciente

(possibilitando a realização de qualquer paradigma) e ausência de radiação ou meios de contraste^{4, 7, 64, 75, 76}.

3.3.1. História do Doppler transcraniano funcional

Embora a Dopplervelocimetria já seja aplicada na Medicina desde a década de 1960, desconhecia-se que as ondas de ultrassom poderiam atravessar a calota craniana. No ano de 1987 Rune Aaslid demonstrou pela primeira vez o fenômeno do acoplamento neurovascular através do Doppler transcraniano. Aaslid detectou um aumento médio de 3.3% na velocidade de fluxo na artéria cerebral posterior em 10 voluntários submetidos a estímulo visual simples⁷⁷.

Droste, Harders e colaboradores foram os primeiros a avaliar a lateralidade hemisférica com o uso de Doppler transcraniano, em 1989⁷⁸. Eles submeteram 7 voluntários saudáveis a uma série de tarefas cognitivas sabidamente vinculadas a um ou a outro hemisfério cerebral e verificaram as alterações nas velocidades de fluxo sanguíneo da artéria cerebral média, com resultados que demonstraram uma excelente resolução espacial do método. No entanto, já identificava-se a necessidade de um monitoramento bilateral, o que não era possível do ponto de vista técnico naquele momento^{12, 73, 78}, pois até o final da década de 1990 a tecnologia disponível permitia apenas a avaliação unilateral de parâmetros do fluxo sanguíneo cerebral intracranianos. Para a medida de diferenças de lateralização hemisférica, as artérias correspondentes de cada hemisfério tinham que ser analisadas em separado, normalmente de maneira aleatorizada. Kelley e colaboradores, em 1992, foram os primeiros a usar aparelhos de Doppler

transcraniano com 2 canais em estudos funcionais possibilitando monitorização bilateral, porém ainda de maneira não contínua⁷⁹. Atualmente, a medição bilateral simultânea é possível, o que permite uma comparação direta e confiável da velocidade de fluxo sanguíneo cerebral em ambos os hemisférios⁸⁰.

O primeiro grande trabalho com monitorização contínua e bilateral de ambas as artérias cerebrais médias foi publicado por Silvestrini e colaboradores⁸¹. De maneira pioneira, demonstraram um aumento lateralizado da velocidade de fluxo sanguíneo cerebral durante atividades cognitivas. Posteriormente, publicaram o primeiro estudo utilizando Doppler transcraniano funcional em pacientes com doença cerebrovascular, avaliando a influência do hemisfério não afetado pelo acidente vascular cerebral isquêmico no controle motor do membro superior e na linguagem⁸¹. Aplicaram uma prova motora simples - oposição repetitiva do polegar e do dedo indicador. O aumento obtido na velocidade de fluxo sanguíneo cerebral na artéria cerebral média ipsilateral ao membro superior atingido pelo acidente vascular cerebral durante a prova motora foi significativamente maior que o aumento no fluxo na artéria cerebral média ipsilateral ao membro saudável, ou que nos controles.

Até então, a maioria dos estudos utilizaram técnicas de análise muito pouco elaboradas, baseadas em simples comparação percentual de alteração de velocidade de fluxo. Um divisor de águas foi o desenvolvimento em 1997 do programa de computador *Average* que permitiu uma análise quantitativa minuciosa do sinal da velocidade de fluxo sanguíneo cerebral. Este programa viabilizou a redução de ruídos e a análise e rejeição de artefatos dos dados obtidos. Ademais, as inferências da diferença de perfusão hemisférica e da sua evolução no tempo

puderam ser analisadas por métodos estatísticos paramétricos ou não paramétricos²⁸.

O programa *Average* foi utilizado para a avaliação da atividade cerebral no processamento de estímulos táteis⁸² e de tarefas de linguagem (comparando resultados de Doppler transcraniano funcional e teste de Wada)⁴, comprovando sua precisão e reprodutibilidade⁷⁴. Além da quantificação da assimetria do aumento da velocidade de fluxo sanguíneo cerebral, a localização temporal da mesma no transcurso da avaliação é importante, conforme evidenciado por Schuepbach e colaboradores⁸³.

Recentemente, um novo programa de domínio público de análise foi lançado²⁸, o qual utiliza um processo de análise muito similar ao usado no *Average*. Foram feitas pequenas modificações no método de análise do ciclo cardíaco e na interface, que tornou-se mais amigável ao usuário⁸⁴.

É importante notar a ausência de padronização nos métodos de análise dos dados de Doppler transcraniano funcional na literatura²⁹. Vários processos têm sido empregados para a determinação da lateralização hemisférica^{67, 85}, como a avaliação da variabilidade do índice de lateralidade⁷⁰, ou um modelo de sistema linear de segunda ordem, que gera curvas de resposta hipotéticas do fluxo sanguíneo cerebral².

3.3.2. O sinal Doppler e as metodologias de análise do Doppler transcraniano funcional

O sinal acústico refletido pelas partículas sanguíneas e captado pelo transdutor, para efeitos de análise, é convertido pelo computador em sinal eletrônico denominado espectro Doppler ou sonograma, através do uso de uma transformada. Essa transformada é utilizada para descobrir a quantidade de partículas em uma determinada velocidade e para isso, como em muitos sinais fisiológicos, normalmente é empregada a transformada de Fourier, conforme equação 2:

$$\begin{aligned} f(t) &= \int_{-\infty}^{\infty} \mathcal{F}_0(f) e^{2\pi i f t} df. \\ \mathcal{F}_0(f) &= \int_{-\infty}^{\infty} f(t) e^{-2\pi i f t} dt \end{aligned} \quad (2)$$

Onde e , π são constantes matemáticas, t é o tempo e f é a frequência.

Para podermos utilizar a transformada de Fourier é necessário assumir-se o sinal Doppler como estacionário e, para tal existem algumas simplificações matemáticas a serem feitas, uma vez que o sinal Doppler não é estacionário na sua origem⁸⁶.

O processo de análise do sinal Doppler necessita de precisão, sensibilidade e especificidade, uma vez que a diferença do aumento da velocidade de fluxo sanguíneo cerebral entre os hemisférios é pequena⁷³, porém significativa e necessita ser demonstrada. Para tal utiliza-se a medida do pico do aumento do fluxo sanguíneo cerebral (*overshoot*) na determinação das diferenças de resposta

hemodinâmica entre os hemisférios funcionalmente evocados^{1, 2}. Outro ponto a ser considerado é a taxa de amostragem do sinal, a qual deve ser de pelo menos 20 Hz para uma resolução temporal suficiente^{64, 87}.

O Espectro do Doppler permite visualizar os valores de velocidade do fluxo sanguíneo, conforme demonstrado na figura 11. Seu eixo horizontal representa o tempo (t) em segundos e o eixo vertical representa a diferença de frequência captada do eco (f). Esta diferença é apresentada como a velocidade das partículas do sangue em unidades de centímetro por segundo. Já a intensidade (brilho) relativa a um determinado ponto do espectro (t , f) corresponde à potência espectral da frequência f no determinado instante t .

Figura 11. Tela do aparelho de Doppler transcraniano, demonstrando o espectro Doppler e as diversas medidas aferidas.

A linha envoltória que passa pelos pontos mais distantes em relação ao eixo horizontal corresponde à velocidade máxima do fluxo sanguíneo cerebral na unidade de tempo. Apresenta uma estrutura temporal característica de fluxo arterial, com picos e vales relacionados ao ciclo cardíaco.

No sinal de Doppler transcraniano funcional existem algumas fontes de ruído que podem ser secundários a artefatos de atenuação do sinal gerados pela dupla passagem do som através tecido ósseo ou ao movimento das paredes dos vasos sanguíneos⁸⁸, além das ondas B, M, P e R (Figura 12). As ondas P (pulsatilidade) são secundárias a modulações rítmicas da velocidade do fluxo causadas pelo batimento cardíaco com faixa de frequência normalmente acima de 60 ciclos por minuto, correspondendo a uma frequência de 1 Hz⁸⁹. As ondas R são ocasionadas pela variação de pressão torácica na inspiração e expiração a qual é transmitida para a pressão arterial e ocorrem com uma média de 10 a 20 cpm^{67, 90}.

A maioria dos mamíferos apresenta lentas variações periódicas da pressão arterial em uma faixa de frequência abaixo da taxa de respiração, denominadas ondas M⁹¹. Em humanos, elas aparecem no intervalo de 3-9 cpm. As ondas B⁹², por sua vez, apresentam modulações lentas abaixo de 3 cpm e sua amplitude varia em função dos diferentes estados de repouso. Não há consenso sobre a origem das ondas M e B.

Figura 12. Composição do espectro da amplitude da velocidade do fluxo sanguíneo cerebral, demonstrando as principais ondas e ruídos presentes. CPM – ciclos por minuto; Hz – Hertz. (adaptado de Deppe⁶⁷).

3.3.2.1. O processo de análise do sinal

A filtragem ideal do sinal de Doppler transcraniano funcional é essencial para a obtenção das estimativas mais fidedignas dos parâmetros analisados. Diversas condições influenciam o sinal de Doppler e devem ser consideradas para a realização da análise.

O valor da velocidade de fluxo medida pelo Doppler é influenciado pelo ângulo formado entre o transdutor e o vaso analisado, ângulo este que é desconhecido uma vez que o Doppler transcraniano funcional não fornece informações morfológicas sobre o vaso, sendo realizado “às cegas” (figura 13). Isso nos impossibilita realizar a análise com base nos dados brutos desconsiderando o erro do ângulo de insonação. Para isso, os dados brutos necessitam ser transformados em unidades relativas, eliminando a influência do ângulo de insonação^{21, 23, 67}, como demonstrado pela Equação 3:

$$V(t_k) = 100 \times \frac{v(t_k)}{\bar{v}_{tot}} \quad (3)$$

onde $V(t_k)$ é a amostra normalizada no instante de tempo t_k , $v(t_k)$ é a amostra bruta em porcentagem e o $\bar{v}_{tot}$ é a média aritmética simples das amostras do canal.

Figura 13. Influência do ângulo de insonação

No processo de análise, a utilização de um índice inter-hemisférico é de suma importância⁹³. As oscilações às quais ambas as artérias cerebrais médias estão sujeitas (flutuações sistêmicas fisiológicas ou relacionadas a fatores ambientais) afetam todo o sistema cardiovascular e aparecerão bilateralmente no sinal Doppler⁷⁴. O cálculo de um índice inter-hemisférico suprime estas oscilações, isolando exclusivamente a alteração na velocidade causada pela ativação⁷⁴. Além disso, o uso desses índices permite uma melhor correlação interobservador, como confirmado previamente⁹³. Com efeito, esta técnica é análoga a outros índices de lateralização calculados por outras técnicas de imagem sensíveis a perfusão, incluindo ressonância magnética funcional^{66, 94} e PET⁹⁵.

O uso de métodos clássicos de filtragem de sinal, como filtro passa-baixa⁷⁷, na tentativa de reduzir de maneira eficaz o ruído afetam de maneira negativa a resolução temporal²⁸ e podem causar modificações na latência dos picos agudos de velocidade ou uma hiper- ou subestimativa artificial do sinal⁹⁶.

A suavização espectral por meio de polinômios cúbicos do tipo *splines* é uma técnica popular em regressão não paramétrica, e serve como um exemplo importante de estimativa linear no modelo gaussiano de ruído branco⁹⁷, sendo especialmente indicada para avaliar oscilações de baixa frequência⁹⁸. Sua utilização permite uma redução substancial e consistente do ruído sem levar as consequências danosas ao sinal inerente a outros métodos de filtragem^{29, 99}. Essa suavização pode ser realizada de forma automática e utiliza como parâmetro de suavização o resultado da validação cruzada denominado “*leave-one-out cross-validation – LOOCV*”. O resultado desse passo pode ser visto no exemplo da Figura 14.

Figura 14. Gráfico demonstrando o resultado da suavização por polinômios cúbicos do tipo *splines*

3.3.2.2. Desenho dos paradigmas e definição das épocas para análise

Existem importantes diferenças metodológicas na escolha do desenho experimental entre os diversos estudos de Doppler transcraniano funcional⁶⁴, uma vez que a velocidade do fluxo sanguíneo cerebral diante de uma ativação tem uma

dinâmica própria. O pico máximo da diferença entre os hemisférios na velocidade de fluxo sanguíneo cerebral é alcançado entre 4 e 20 segundos após o início da ativação, com um pico médio após 6-11 segundos^{12, 25, 78, 100-102}. Este pico é seguido por um decréscimo, levando a um estado de equilíbrio^{5, 102}. Após a cessação do estímulo, a velocidade do fluxo sanguíneo cerebral diminui, com uma latência de 4 segundos⁷¹. Cabe também notar que a velocidade de fluxo sanguíneo cerebral no hemisfério mais “ativado” é mais estável do que no menos “ativado”⁷⁰.

A determinação de maneira fidedigna dos valores da linha de base do sinal é uma questão metodológica importante na pesquisa com Doppler transcraniano funcional porque esses valores serão tidos como referência para a avaliação das mudanças na velocidade de fluxo sanguíneo cerebral durante a ativação. Várias estratégias para determinar estes valores basais já foram empregadas. O paradigma experimental mais comum é preceder cada ativação com um período de repouso. É o paradigma “em bloco”, que alterna períodos de repouso com períodos de ativação. Esta estratégia permite utilizar uma parte de cada fase de repouso como a medida de referência para a sua subsequente ativação.

Após este passo, duas opções estão disponíveis. A primeira é usar uma parte de cada fase de repouso como a medida de referência para a sua ativação ulterior^{73, 103}. A vantagem desta tática é que a fase de repouso e a fase de ativação ocorrem próximas e assim pode-se inferir que ocorra variação desprezível no estado fisiológico entre as duas fases^{64, 103}. A segunda opção é calcular a média da velocidade de fluxo sanguíneo cerebral de todos os períodos de repouso e usar este valor basal médio para determinar a mudança na velocidade de fluxo sanguíneo cerebral em cada ativação^{12, 78}. Porém, na segunda opção, o cálculo da média de

todas as condições de repouso desconsidera o fato de a velocidade de fluxo sanguíneo cerebral diminuir gradualmente de maneira não harmônica durante o transcurso da sessão^{73, 104}.

Um paradigma alternativo proposto por Rihs e também por Knecht é alternar períodos de ativação com períodos de repouso, ou realizar ciclos curto e sucessivos (20 segundos ou menos) de ativação e repouso⁸⁰. Embora este método tenha como vantagem a alta proximidade temporal entre repouso e ativação, ele sofre demasiada interferência da ativação residual. É conhecida uma ativação cortical residual, após o final do período de ativação, que pode durar entre 6 e 33 segundos antes que a re-estabilização aos valores basais seja atingida¹⁰⁴.

3.3.3. Comparação do Doppler transcraniano funcional com outras técnicas de neuroimagem funcional

3.3.3.1. Ressonância magnética funcional

Um estudo com 14 voluntários saudáveis destros submetidos a um complexo paradigma cognitivo visuo-espacial demonstrou a capacidade de ambos os métodos em discriminar um desvio do fluxo sanguíneo cerebral para o hemisfério direito induzido pela tarefa⁷⁶. Estes resultados foram confirmados por estudos subsequentes^{20, 105}. Outro estudo, também com voluntários saudáveis, avaliou a correlação entre os métodos na determinação da lateralidade hemisférica da linguagem indicando que as alterações de velocidade medidas pelo Doppler

transcraniano funcional correlacionam-se com as alterações no fluxo sanguíneo cerebral regional medidas pela ressonância magnética funcional de maneira linear⁷. Um terceiro estudo que avaliou a linguagem também encontrou correlação significativa, porém imperfeita¹⁰⁶.

3.3.3.2. PET

Sabri e colaboradores avaliaram a lateralização cerebral com paradigma de memória e mostraram correlações fortes e altamente significativas entre PET e Doppler transcraniano funcional empregados simultaneamente em 11 pacientes com esquizofrenia crônica sob controle e 10 voluntários saudáveis⁷⁵.

3.3.3.3. Teste de WADA (Teste de amobarbital sódico intra-carotídeo)

Uma alta correlação dos índices de lateralidade foi detectada com o uso de ambos os testes em pacientes com epilepsia do lobo temporal, uma população que é mais susceptível a ter representação cortical atípica da linguagem¹⁰⁷.

3.3.3.4. SPECT

Um estudo com 17 pacientes na avaliação pré-operatória de epilepsia ou malformação arteriovenosa mostrou concordância entre os dois métodos na determinação da lateralização de linguagem¹⁰⁸.

3.3.3.5. Potencial evocado visual

Simultaneamente foram estudadas as respostas do fluxo sanguíneo cerebral com Doppler transcraniano funcional, e as respostas do potenciais evocados visual com paradigma de contrastes visuais em 30 voluntários saudáveis, sugerindo-se uma associação positiva entre as duas respostas¹⁰⁹.

3.3.4. Aplicações clínicas do Doppler transcraniano funcional

Diversos estudos demonstraram aplicações do Doppler transcraniano funcional na prática de diversos campos da Neurologia. A maior concentração de estudos encontra-se no campo da linguagem, embora o exame tenha sido utilizado também para avaliação de pacientes com distúrbios do movimento, doença cerebrovascular e distúrbios psiquiátricos, entre outros.

No campo da linguagem, o Doppler transcraniano funcional é uma ferramenta útil e válida para a determinação da dominância hemisférica de maneira comparável ao teste de Wada. Estes resultados foram obtidos inclusive em populações especiais como pacientes de baixo QI, crianças e em pacientes com epilepsia refratária candidatos a tratamento cirúrgico^{4, 32, 107, 110, 111}. A falta de janela ultrassônica em alguns pacientes, uma limitação em potencial ao seu uso, já foi superada com o uso de contrastes específicos para ultrassom¹¹².

O uso do Doppler transcraniano funcional ictal é também capaz de identificar a lateralização do foco da crise epiléptica de maneira concomitante e concordante com o eletroencefalograma e o SPECT¹¹³.

No campo dos distúrbios de movimento, foram demonstradas através do Doppler transcraniano funcional alterações precoces do processamento emocional em pacientes com doença de Parkinson¹¹⁴ e doença de Huntington¹¹⁵.

Pacientes esquizofrênicos apresentam diferenças qualitativas na resolução espacial (avaliada por PET) e temporal (avaliada por Doppler transcraniano funcional) de processamento cognitivo. Doentes esquizofrênicos ativam um volume cortical significativamente maior para o desempenho de uma tarefa, mas com um aumento significativamente menor do fluxo sanguíneo cerebral neste volume, do que os indivíduos saudáveis. Além disso, eles não sofrem aumento da velocidade do fluxo sanguíneo cerebral durante o curso da ativação cognitiva como os voluntários⁷⁵.

Estudo interessante associando Doppler transcraniano funcional e potencial evocado visual sugeriu que, em pacientes com enxaqueca, ocorra um aumento do acoplamento neurovascular no córtex occipital⁵⁵.

Também em pacientes na fase subaguda após acidente vascular cerebral isquêmico subcortical, o Doppler transcraniano funcional demonstrou-se válido como determinante de prognóstico de reabilitação motora quando comparado a outros fatores determinantes^{5, 22, 116-118}.

Pacientes assintomáticos portadores de doença de Fabry apresentam, quando comparados a voluntários saudáveis, alterações nos mecanismos de acoplamento neurovascular aferidos pelo Doppler transcraniano funcional com paradigma visual mesmo antes de apresentarem acidente vascular cerebral¹¹⁹.

Certos estudos demonstraram também a aplicação da técnica na avaliação do acometimento cerebral no processo de envelhecimento, sugerindo que a idade

reduziria a assimetria na lateralização hemisférica em paradigmas motores, cognitivos ou visuais^{25, 30, 120}.

Por fim, no estudo da dor, o Doppler transcraniano funcional mostrou-se sensível tanto para os diferentes níveis de intensidade física de estímulos de dor tanto quanto para as diferenças interindividuais no processamento nociceptivo¹²¹.

4. Métodos

4. MÉTODOS

4.1. Desenvolvimento de um novo método de análise de Doppler transcraniano funcional para análise de lateralização hemisférica

Para interpretação dos dados de Doppler transcraniano funcional desenvolvemos um novo programa de análise denominado FDAT (*Functional Doppler Analysis Toolbox*) usando a plataforma R (Versão 2.9.2, The R Foundation for Statistical Computing, 2009). O processo de análise dos dados obtidos envolve várias etapas consecutivas com o objetivo de calcular o Índice de Lateralização, que é a representação numérica da ativação de um hemisfério cerebral no transcurso da prova motora unilateral. As etapas para o cálculo do índice de lateralização estão descritas a seguir e estão representadas na figura 15.

Figura 15. Etapas do processo de análise do sinal de Doppler transcraniano funcional

4.1.1. Determinação da linha de base

Os valores da velocidade de fluxo sanguíneo cerebral na fase de repouso de cada sessão foram utilizados como linha de base de referência para comparação com os respectivos dados da fase de ativação subsequente. Um novo período de

repouso é necessário antes de uma nova prova, devido a possíveis variações na linha de base secundárias a alterações fisiológicas ao longo do tempo^{64, 103}. Além disso tem o objetivo de anular o efeito de habituação (*“between-task habituation effect”*), que é a significativa redução da velocidade do fluxo sanguíneo cerebral ao longo de tarefas sucessivas, o qual tem importante implicação em estudos envolvendo Doppler transcraniano funcional¹⁰⁴.

4.1.2. Normalização dos valores brutos

Os diferentes métodos de estudo, não apenas o Doppler transcraniano funcional, que buscam determinar ativação cerebral através de diferenças na perfusão tecidual baseiam-se em diferenças absolutas muito pequenas. Assim sendo, um erro sistemático definitivamente comprometedor pode ser causado pela aferição incorreta de diferenças das velocidade de fluxo sanguíneo cerebral.

Além disso, os valores de velocidade obtidos nos aparelhos de Doppler transcraniano não representam a velocidade real do fluxo sanguíneo. Isto ocorre porque os valores de velocidade obtidos por meio do efeito Doppler são diretamente dependentes do ângulo formado pelo eixo do transdutor e pelo eixo do vaso pelo qual passa o fluxo sanguíneo a ser analisado.

Este obstáculo técnico foi superado por meio da normalização dos valores de velocidade brutos em valores relativos. Este processo está abaixo representado pela equação 5:

$$V(t_k) = 100 \times \frac{v(t_k)}{v_{tot}}$$

(5)

onde $v(t_k)$ é a amostra bruta no instante de tempo t_k , $V(t_k)$ é a amostra normalizada em porcentagem e o v_{tot} é a média aritmética simples das amostras do canal;

4.1.3. O índice de velocidade relativa

Com o objetivo de eliminar fatores de confusão como flutuações fisiológicas da velocidade de fluxo sanguíneo cerebral secundárias ao ciclo cardíaco ou ao ciclo respiratório, foi utilizado um índice de velocidade relativa, calculado pela razão entre as velocidades relativas da artéria cerebral média direita e esquerda, ponto a ponto, a cada centésimo de segundo.

A utilização deste tipo de índice permite excluir da análise as oscilações às quais ambas as artérias cerebrais médias estão sujeitas concomitantemente, como por exemplo flutuações fisiológicas da velocidade de fluxo sanguíneo cerebral secundárias ao ciclo cardíaco ou ao ciclo respiratório. O uso deste tipo de cálculo de índice de lateralidade entre os hemisférios é similar a outros índices utilizados em outras técnicas de imagem com base em perfusão tecidual, como por exemplo a ressonância magnética funcional⁷⁶. Ademais, essa técnica fornece melhor correlação interobservador⁹³. Consequentemente, será possível observar mudanças no fluxo sanguíneo cerebral diretamente e exclusivamente relacionadas à prova de ativação motora, independentemente de outros fatores.

4.1.4. Suavização do sinal

O principal desafio na análise de dados de Doppler transcraniano funcional é reduzir a influência do forte ruído (*“strong noise”*) sobre o sinal obtido. Uma vez que os componentes de interesse (alterações na velocidade do fluxo sanguíneo cerebral induzidas pela ativação) não são periódicos, mas sim curvas de resposta hemodinâmica, adotamos a técnica de suavização espectral por polinômios cúbicos (*smoothing splines*). Este é um método flexível e semi-paramétrico que ajusta um conjunto de sinais obtidos a uma curva suavizada, usando uma combinação linear de funções cúbicas do tipo *spline*¹²².

A suavização por *splines* deve ser vista como uma generalização de interpolações de *splines*, onde as funções são determinadas para minimizar a combinação ponderada do erro quadrado médio aproximado sobre os dados observados e a medida de irregularidade. Para um certo número de definições da medida de irregularidade, as funções *spline* são vistas como de dimensão finita. O número de nós da decomposição, o qual define a suavidade da forma, é determinado automaticamente por meio de generalização de validação cruzada¹²². Esta abordagem é frequentemente aplicada em pesquisas de processamento de sinal e econometria, principalmente devido à sua flexibilidade de adaptação a diferentes tipos de curvas¹²³.

A etapa de suavização por *splines* é composta por dois estágios. No primeiro estágio, é determinado o parâmetro de suavização, através da validação cruzada pelo método *leave-one-out*¹²⁴. Já o segundo estágio corresponde a suavização em

si. Essa suavização é realizada por splines cúbicas que minimizam a seguinte fórmula (Equação 6).

$$\sum_{k=1}^{12000} |\Delta V(tk) - \Delta V_{spline}(tk)|^2 + (1 + p) \int |D^2 \Delta V_{spline}(tk)|^2 dt_k \quad (6)$$

onde $\Delta V_{spline}(tk)$ é a função resultante da suavização, $\Delta V(tk)$ é a diferença entre canais, p é o parâmetro de suavização, e D^2 é a derivada de segunda ordem da função f .

4.1.5. Análise da lateralização

Para a análise da ativação, utilizamos o índice de velocidade relativa suavizado (conforme descrito acima) a cada centésimo de segundo. A análise foi realizada em duas etapas: determinação do período representativo de cada fase (épocas) e, por fim, o cálculo do índice de lateralização.

Definição das épocas

Denominamos época a cada período da sessão a ser considerado ideal para análise, tanto no repouso (época de repouso) quanto na vigência da prova de ativação motora (época de ativação). Para isso, levou-se em consideração a

característica de interesse de cada fase a ser analisada, isto é, o platô da velocidade relativa na fase de repouso e o pico da velocidade relativa na fase de ativação.

A determinação do período ideal foi baseada em dados obtidos de estudos anteriores que demonstraram que o pico máximo da velocidade de fluxo sanguíneo cerebral é atingido entre 4 e 20 segundos após o início da prova motora (média 6 - 9 segundos)^{12, 25, 100-102}. Este pico é seguido por um leve declínio na velocidade e então atinge um platô^{5, 102}.

Definiu-se, assim, como época de repouso os últimos 35 segundos do repouso. A época de ativação foi definida como o período de 4 segundos com a maior velocidade relativa média dentre os primeiros 35 segundos da prova de ativação motora (Figura 16).

Figura 16. Representação esquemática dos períodos do exame de Doppler transcraniano funcional e a definição das épocas para análise.

Em seguida, foi calculada a média da velocidade relativa de cada época.

Cálculo do índice de lateralização

O índice de lateralização é calculado como a diferença entre a velocidade relativa média da época de ativação e a velocidade relativa média da época de repouso para cada prova motora:

$$IL = \bar{V}_{ativação} - \bar{V}_{repouso} \quad (7)$$

Assim, para cada sujeito foram calculados 2 índices de lateralização: índice de lateralização da prova com a mão direita (IL_d) e índice de lateralização com a mão esquerda (IL_e).

Tendo se em conta que o índice de lateralização advém dos dados obtidos da análise da comparação entre o hemisfério direito e o esquerdo:

Um índice de lateralização da prova com a *mão esquerda, maior que zero (positivo)* significa ativação preponderante do *hemisfério direito* durante a fase de ativação (aumento preponderante da velocidade de fluxo sanguíneo cerebral na artéria cerebral média direita em relação à esquerda).

Um índice de lateralização da prova com a *mão direita, menor que zero (negativo)* significa ativação preponderante do *hemisfério esquerdo* durante a prova de ativação.

Cálculo do índice de ativação

Finalmente, é calculada a diferença dos valores de LI ($LI_e - LI_d$) provenientes da análise com cada método, obtendo-se um índice de ativação (IA), próprio de cada sujeito, e que representa o quão uma mesma tarefa unimanual associa-se a

mudanças na velocidade do fluxo sanguíneo predominantemente no hemisfério direito ou no esquerdo. Predominância esta que reflete a assimetria na ativação neuronal decorrente da lateralização hemisférica para a referida tarefa.

4.2. Avaliação da lateralização hemisférica em indivíduos saudáveis

4.2.1. Características da amostra

Todos os dados foram colhidos e os procedimentos realizados entre Janeiro e Junho de 2010 no laboratório de Neuroestimulação, localizado no 5º andar do Instituto Central do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O presente estudo fez parte de um protocolo de pesquisa devidamente aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CaPPesq) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 27 de Agosto de 2008 sob o número 0908/08 (anexo A).

Todos os candidatos ao estudo concordaram com a participação e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo B).

Critérios de inclusão

- Concordância em participar da pesquisa.
- Idade entre 18 e 80 anos.
- Preferência manual direita (definida por um resultado +80 ou mais no Inventário de Dominância Lateral de Edimburgo).
- Janela sonográfica satisfatória no osso temporal.

Critérios de exclusão

- Outras doenças neurológicas.
- Doença crônica grave (como insuficiência renal crônica, insuficiência cardíaca grave, entre outras).
- Uso de droga antidepressiva, antiepiléptica ou neuroléptica.
- Uso de cafeína, nicotina ou álcool 12 horas ou menos antes do experimento¹²⁵.
- Alteração no exame de Doppler de carótidas e vertebrais ou no Doppler transcraniano, indicando estenose arterial extra ou intracraniana maior que 50%^{80, 126}.

O recrutamento ocorreu entre funcionários e amigos ou familiares de funcionários do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Foram coletados dados demográficos, antecedentes pessoais, medicações utilizadas e aplicado o Inventário de Dominância Manual de Edimburgo⁸ (Anexo C) para determinação e quantificação da preferência motora manual. Em seguida, todos os indivíduos foram submetidos a Doppler de carótidas e vertebrais e a Doppler transcraniano completo.

Foram recrutados 14 indivíduos. Um indivíduo foi excluído por estenose extracraniana. Participaram do estudo treze indivíduos, nove homens e quatro mulheres.

A mediana (entre parênteses, o intervalo mínimo-máximo) da idade dos indivíduos foi de 57 (43 - 80) anos.

A mediana da pressão arterial média foi de 97 (80 - 123) mm Hg e a mediana da frequência cardíaca foi de 68 (56 - 80) batimentos por minuto. As características dos indivíduos estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 Características da amostra

Sujeito	Sexo	Idade (anos)	PAM (mmHg)	FC (bpm)
1	F	62	83	72
2	M	43	93	76
3	M	76	97	64
4	F	51	103	72
5	M	67	107	64
6	M	80	97	68
7	F	54	90	80
8	M	58	83	56
9	F	51	93	68
10	M	46	80	64
11	M	57	123	80
12	M	55	100	68
13	M	60	103	80

F: feminino; M: masculino; PAM: pressão arterial media; FC: frequência cardíaca.

4.2.2. Experimentos

Todos os experimentos foram executados em uma sala, com controle constante de luz e temperatura. Todos os sujeitos foram instruídos sobre os equipamentos usados e as tarefas a serem executadas durante o estudo. Durante o experimento, os indivíduos permaneceram sentados numa poltrona confortável e

foram solicitados a relaxar, respirar de maneira habitual e regular, assim como a evitar a falar durante o teste (Figura 17).

Figura 17. Indivíduo durante prova de ativação motora sob avaliação com Doppler transcraniano funcional.

As sessões de Doppler transcraniano funcional foram realizadas com aparelho Doppler-Box Transcranial Doppler Unit (Compumedics Germany GmbH – The DWL[®] Doppler Company - Singen, Alemanha) (Figura 18) pertencente ao Setor de Neurosonologia, Hemodinâmica Encefálica e Cuidados Neurocríticos do HCFMUSP.

Figura 18. Fotografia do equipamento de Doppler transcraniano funcional.

Dois transdutores com frequência de 2-Hz com sistema de fixação automática (*"click-and-stay" system*) foram alocadas bilateralmente na cabeça dos sujeitos, sobre a janela sonográfica do osso temporal e fixados com o auxílio de um dispositivo similar a um arco, especialmente desenvolvido para monitorização contínua de Doppler transcraniano (Figura 17).

A insonação simultânea das artérias cerebrais médias direita e esquerda foi realizada conforme a técnica previamente descrita por Aaslid et al.²¹ para a avaliação da velocidade de fluxo sanguíneo cerebral. O exame ultrassonográfico foi inicialmente realizado a uma profundidade de 50 mm, com ajustes posteriores de profundidade e ângulo de insonação de acordo com a necessidade, obtendo-se a

maior intensidade de sinal da primeira porção da artéria cerebral média. A profundidade de avaliação variou de 45 a 56 mm²³.

Imediatamente antes e após o teste, foram avaliados pressão arterial, ritmo respiratório e oximetria periférica.

A prova manual compreendeu uma sequência de movimentos de oposição do dedo polegar e do dedo indicador tipo pinça (*thumb-to-finger opposition movement*¹¹⁷) realizado por uma mão e depois pela outra, numa frequência de 1 movimento por segundo (1Hz) fornecida por um metrônomo digital.

Cada prova motora (mão direita e mão esquerda - fase de ativação) durou 2 minutos, sendo precedida por 2 minutos de repouso¹¹⁶. A escolha da mão examinada em primeiro lugar foi realizada por meio de aleatorização em bloco, entre os sujeitos.

No aparelho de DTC, observou-se durante a prova o espectro do sinal da onda de Doppler ao longo do tempo, e também com marcação eletrônica do momento exato de início e final de cada período, de cada sessão.

A velocidade do fluxo sanguíneo foi registrada continuamente para posterior análise. As medidas das velocidades foram gravadas a uma taxa de amostragem de 100Hz (a cada centésimo de segundo) para uma ótima resolução temporal⁶⁴, compreendendo 12.000 medições por prova + repouso (24.000 por sessão).

4.3. Correlação entre o índice de ativação hemisférica e preferência manual, avaliada pelo Inventário de Dominância Manual de Edimburgo

4.3.1. Inventário de Dominância Manual de Edimburgo

Na aplicação deste questionário, (Anexo C) são feitas dez perguntas sobre qual mão o indivíduo utiliza para realizar as seguintes tarefas: escrever, desenhar, jogar uma bola, usar um cinzeiro, usar uma escova de dentes, comer com um garfo, segurar uma colher de sopa, acender um fósforo, abrir uma tampa e utilizar uma vassoura. Cada atividade é incluída em uma tabela. O indivíduo indica suas preferências no uso das mãos nas atividades descritas marcando um sinal de “+” na coluna apropriada: coluna “D”, caso utilize preferencialmente a mão direita, e/ou coluna “E” caso a mão que preferencialmente realize a atividade seja a esquerda. Quando a preferência é tão forte que a outra mão jamais é usada a não ser que o indivíduo seja forçado, é assinalado o sinal “++”. Caso a mão a ser utilizada na tarefa seja indiferente, é orientado que se marque “+” nas duas colunas. O total de sinais “+” em cada coluna é calculado.

Depois de respondido o inventário, o coeficiente de lateralidade manual λ é determinado através da Equação 4, onde R_i corresponde ao número de marcas realizadas na i -ésima linha da coluna de preferência com a mão direita e L_i corresponde ao número de marcas realizadas na i -ésima linha da coluna de preferência com a mão esquerda e linha i :

$$\lambda = 100 \frac{\sum_{i=1}^{10} Ri - \sum_{i=1}^{10} Li}{\sum_{i=1}^{10} Ri + \sum_{i=1}^{10} Li} \quad (4)$$

Esse coeficiente resultante do inventário de Edimburgo quantifica a lateralidade manual de uma pessoa e seus valores vão de -100 a 100. Quanto mais próximo o resultado estiver de 100, maior a lateralidade manual direita, e quanto mais próximo de -100, maior a lateralidade manual esquerda⁹.

4.3.2. Correlação com o Inventário de Dominância Lateral de Edimburgo

Por fim, o conjunto de valores de índices de ativação foi correlacionado com o conjunto dos respectivos inventários de Edimburgo. Partiu-se do pressuposto de que quanto mais correlacionado o conjunto de dados de índice de ativação estiver do conjunto de dados dos inventários de Edimburgo, melhor seria o método utilizado, pois o índice de ativação corresponde à diferença na ativação entre os hemisférios. Assim, quanto maior o grau de dominância lateral, maior deve ser o índice de ativação de cada sujeito. Assim, espera-se que quanto mais próximo ρ estiver de 1 ou -1, mais eficaz seja o método de determinação de lateralização hemisférica.

4.4. Análise estatística

A normalidade dos dados foi avaliada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov.

Para verificar-se a capacidade deste novo método em diferenciar a lateralização hemisférica da atividade cortical durante o paradigma motor manual, as diferenças entre os índices de lateralização obtidos na vigência das duas provas de ativação motora (mão direita, mão esquerda), utilizou-se o teste de Wilcoxon.

Para avaliar-se a relação entre a preferência manual obtida através do Inventário de Dominância Lateral de Edimburgo e o índice de ativação foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman.

O nível de significância estatística foi definido para um valor alfa de 0,05. Todos os testes estatísticos foram executados no programa PASW Statistics, versão 19 (IBM Corporation, Somers, NY, EUA).

5. Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Desenvolvimento de um novo método de análise de Doppler transcraniano funcional para análise da lateralização hemisférica

O programa de computador para análise de Doppler transcraniano funcional com o novo método proposto, denominado FDAT, foi finalizado e disponibilizado gratuitamente na internet no seguinte endereço: <https://sites.google.com/site/fdattoolbox/>. O anexo E apresenta o manual de operação do FDAT.

5.2 Avaliação da ativação hemisférica na prova motora unimanual

Diferenças claras no índice de lateralização, ou seja, valores positivos para o índice de lateralização da prova com a mão esquerda, e valores negativos para o índice de lateralização da prova com a mão direita, foram obtidos na maioria dos indivíduos (Tabela 2).

A mediana do índice de lateralização da prova com a mão direita foi -2,55 (-1,63 a -3,34), indicando lateralização para o hemisfério esquerdo. A mediana do índice de lateralização da prova com a mão esquerda foi 2,99 (-1,48 a 4,61), indicando lateralização para o hemisfério direito.

Houve uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,028$) no índice de lateralização dependendo de qual mão foi movimentada durante a prova manual. (Figura 19)

Tabela 2. Ativação hemisférica obtida pelo método FDAT e a preferência manual motora

Sujeito	ILe	ILd	IA	IDLE
1	-1,61	-1,66	0,001	81,8
2	1,38	-1,82	0,034	88,2
3	2,99	-2,55	0,059	89,5
4	8,05	-3,83	0,120	88,9
5	-2,21	-2,65	0,003	81,8
6	3,16	-3,06	0,064	88,9
7	4,50	-2,81	0,077	100,0
8	-1,34	-2,43	0,014	87,5
9	-3,66	3,77	-0,077	80,0
10	2,27	-1,60	0,042	87,5
11	4,45	-6,46	0,111	88,2
12	5,30	6,77	-0,016	80,9
13	4,73	-3,63	0,085	100,0

IDLE: Inventário de Dominância Lateral de Edimburgo (%); ILd: índice de lateralização da prova motora com a mão direita; IAE: índice de lateralização da prova motora com a mão esquerda; IA: índice de ativação

Figura 19. Índice de lateralização das tarefas motoras com a mão direita ou esquerda.

5.3 Relação entre o Índice de ativação e o Inventário de Dominância Lateral de Edimburgo

Foi encontrada uma correlação fortemente positiva entre a preferência manual, avaliada pelo Inventário de Dominância Lateral de Edimburgo, e o Índice de ativação obtido pelo Doppler transcraniano funcional ($\rho = 0,85$; $p < 0,001$) (Figura 20).

Figura 20. Correlação entre o Inventário de Edimburgo com o Índice de Ativação (IA) (rho = 0,85, p <0,001)

Em resumo, a metodologia de análise desenvolvida foi capaz de discriminar entre o aumento relativo na velocidade de fluxo sanguíneo cerebral na artéria cerebral média contralateral durante cada sessão de prova de ativação motora.

Houve uma significativa lateralização no aumento relativo da velocidade de fluxo sanguíneo cerebral favorecendo a artéria cerebral média esquerda durante a prova motora com a mão direita, e a artéria cerebral média direita durante a prova motora com a mão esquerda.

6. Discussão

6. DISCUSSÃO

6.1. Novo método de análise de Doppler transcraniano funcional na prova motora manual

Acredita-se que durante a atividade neural, os aumentos no consumo de glicose e oxigênio sejam seguidos por um aumento no fluxo sanguíneo cerebral regional³⁹⁻⁴¹, e este aumento desproporcional (maior no hemisfério contralateral à mão que realiza a atividade motora), da ordem de apenas 5%⁷¹, seja o fundamento para o Doppler transcraniano funcional.

Estudos prévios já comprovaram que o Doppler transcraniano funcional é uma excelente alternativa para estudos neurofuncionais. Entretanto, o ruído do sinal do Doppler transcraniano e as flutuações das variáveis fisiológicas relacionadas especialmente ao ciclo cardiorrespiratório são ainda desafios para a análise e interpretação dos dados de maneira fidedigna.

O presente estudo propõe uma metodologia original de análise de Doppler transcraniano funcional, não baseado em suposições pré-determinadas da função da resposta hemodinâmica, diferentemente dos métodos até agora disponíveis para a análise. O método aqui apresentado é de fácil aplicação, intuitivo, não-invasivo e com excelente resolução temporal.

Stefan Knecht⁴ em 1998 publicou um estudo pioneiro que propôs um método simples de processamento do sinal do Doppler transcraniano funcional. Esse estudo avaliou a lateralização da linguagem em 19 pacientes e comparou os resultados obtidos com o Doppler transcraniano funcional com o teste de Wada. Este método

baseava-se em um processamento relativamente simples e não incluía nenhum tratamento mais avançado do sinal. Utilizava-se de duas etapas apenas: normalização do sinal bruto e a subtração dos valores obtidos em uma artéria cerebral média pelos da artéria contralateral.

Posteriormente, Michael Deppe²⁸ desenvolveu uma metodologia computadorizada mais rebuscada, uma evolução do método de Knecht, que incluiu um tratamento mais avançado do sinal do Doppler transcraniano funcional por meio da integralização do ciclo cardíaco. Esta integralização tinha como objetivo eliminar as interferências dos ciclos, substituindo as amostras correspondentes a um único ciclo por uma função do tipo degrau de valor equivalente à média das amostras originais⁷. Este método de análise de Doppler transcraniano funcional é atualmente o mais difundido e baseado no programa *Average*²⁸. Este programa já foi validado com outras técnicas neurofuncionais⁷ e tem boa reprodutibilidade interna⁷⁴, sendo uma robusta técnica de análise apesar de uma série de limitações, em especial o custo e a dependência do ritmo cardíaco.

A maioria dos métodos desenvolvidos para a análise de Doppler transcraniano funcional propuseram modelos determinísticos da função de resposta hemodinâmica. Estes são modelos matemáticos onde o desfecho é precisa e diretamente determinado através de uma relação absolutamente conhecida entre os estados e eventos³³. Todavia, a função da resposta hemodinâmica varia conforme as características dos indivíduos, a sessão de estudo, a região cerebral avaliada e, certamente, não pode ser propriamente retratada por um método determinístico³³.

As principais inovações do método utilizado em nosso estudo foram a não utilização de filtros tipo passa baixa, e o uso de polinômios cúbicos para a obtenção

de uma ótima relação sinal-ruído sem, em qualquer momento, perder eficiência na análise. Assim como em outros métodos, os valores absolutos das velocidades foram normalizados e convertidos em valores relativos para se evitar artefatos de aferição relacionados a diferenças desconhecidas nos ângulos de insonação das artérias estudadas. Também, a ativação hemisférica foi obtida pela subtração dos valores de uma artéria cerebral média pelos da artéria cerebral média contralateral^{1,}

32, 70, 127, 128

O não uso da integralização do ciclo cardíaco na análise de Doppler transcraniano funcional justifica-se pelo conceito de que todo o sistema cardiovascular, incluindo as artérias cerebrais aqui avaliadas, é influenciado a todo momento pelas mesmas flutuações fisiológicas previamente mencionadas. De tal modo, subtraindo-se os valores da velocidade em um hemisfério pelos do outro, a influência destas flutuações é matematicamente anulada. Ademais, a independência do ciclo cardíaco neste modelo de análise permite estudar a resposta hemodinâmica cerebral de indivíduos com ciclo cardíaco irregular. Temos como principal exemplo desta condição a fibrilação atrial, uma arritmia comum em pacientes com acidente vascular cerebral isquêmico e que afeta 8% da população idosa¹²⁹. Levando-se em conta que a avaliação da lateralização hemisférica deve ser importante para estudos sobre plasticidade e reabilitação após acidente vascular cerebral^{31, 130, 131}, um método que possa ser aplicado indiscriminadamente na população idosa representa um avanço considerável nas pesquisas com Doppler transcraniano funcional.

6.2. Lateralização hemisférica da atividade cortical durante paradigma motor manual em um grupo de voluntários saudáveis

Nossos resultados demonstraram que a nova metodologia de análise proposta é capaz de demonstrar a ativação do hemisfério contralateral à mão utilizada na prova de ativação motora. O resultado obtido em voluntários saudáveis durante prova de ativação motora com Doppler transcraniano funcional foi semelhante ao descrito com ressonância magnética funcional¹³², com espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) funcional¹³³, com magnetoencefalografia¹³⁴ e também com tomografia por emissão de pósitrons¹³⁵.

Nossos resultados utilizando um paradigma motor, quando avaliados em conjunto com dados da literatura utilizando paradigmas tanto motores ou cognitivos, visuais, de linguagem ou atenção^{100, 102, 103}, sugerem que o Doppler transcraniano funcional seja uma eficaz ferramenta clínica ou de pesquisa para avaliar as relações inter-hemisféricas.

Estudos análogos com Doppler transcraniano funcional obtiveram resultados fidedignos com relação à lateralização hemisférica, porém utilizando-se de técnicas diferentes de análise do sinal, além de paradigmas não-motores. Badcock et al.¹³⁶ demonstraram a lateralização hemisférica de diferentes componentes da linguagem por meio do Doppler transcraniano funcional em 27 voluntários saudáveis. Duschek et al.¹²¹ avaliaram a resposta cortical e a lateralidade hemisférica em resposta a estímulos nociceptivos, também por meio do Doppler transcraniano funcional em 46

voluntários. Também, Roje-Bedekovic et al.¹³⁷ investigaram a lateralidade hemisférica da resposta visual através do Doppler funcional em 30 voluntários.

Vale salientar que as características e o número dos participantes de nosso estudo são similares às de outros trabalhos originais realizados com outras metodologias^{80, 100}. Salinet et al.¹³⁸, com uma amostra de 12 voluntários saudáveis, similar à utilizada em nosso estudo (8 homens, idade média 64 anos), encontrou resultados semelhantes na lateralidade hemisférica durante prova motora unimanual aferida por Doppler transcraniano funcional, porém com um método de análise utilizando filtros eletrônicos do tipo passa-baixa.

Diferentemente do esperado, quando analisamos o índice de ativação de maneira individual, pudemos observar que em dois dos treze sujeitos analisados este índice não foi menor durante o movimento da mão direita quando comparado ao da prova com a mão esquerda. Este resultado poderia sugerir uma inacurácia do método ou uma apresentação atípica da lateralidade hemisférica desses indivíduos. No entanto, alguns estudos com ressonância magnética funcional também demonstraram em alguns indivíduos saudáveis, de maneira similar, uma ativação menor do córtex motor contralateral à mão movimentada, quando comparado com o córtex motor ipsilateral. Newton et al.⁹, estudando as relações inibitórias inter-hemisféricas do córtex motor primário através de ressonância magnética funcional, encontrou ativação cortical ipsilateral à prova motora unimanual numa minoria de indivíduos num grupo de 6 voluntários destros. Olman et al.¹³⁹ também obtiveram algum grau de ativação cortical ipsilateral à prova de ativação unimanual, ao estudar o mapeamento cortical da movimentação dos dedos da mãos por meio de ressonância magnética funcional.

Estes resultados podem ser justificados por algumas teorias neurofisiológicas. Nem sempre a ativação do córtex ipsilateral durante uma atividade motora unimanual está diretamente relacionada à ativação de neurônios do córtex motor primário, e a presença desta ativação não necessariamente relaciona-se ao grau de lateralidade hemisférica. Este tipo de ativação pode ser proveniente de uma simples ativação em espelho do córtex ipsilateral, ou até mesmo fazer parte do complexo equilíbrio-excitatório e/ou inibitório inter-hemisférico¹⁴⁰. Outra possível explicação estaria relacionada a mudanças de comportamento neuronal secundárias à idade, sendo que a ativação cortical relacionada à tarefa motora simples é mais focalizada e lateralizada em indivíduos mais jovens e mais difusa e bilateral nos indivíduos mais idosos^{141, 142}.

A idade de nosso grupo de experimento pode explicar em parte estes resultados. Outros estudos já demonstraram uma redução da lateralidade hemisférica para provas cognitivas relacionada ao envelhecer, dando origem ao modelo HAROLD (*hemispheric asymmetry reduction in older adults*)¹⁴³. Przybyla et al.¹⁴⁴ demonstraram recentemente esta influência, descrevendo que um grupo jovem (idade média 28 anos) e um grupo mais idoso (68) apresentam diferença significativa na lateralidade hemisférica durante uma prova motora. Em nossa amostra, a idade média dos sujeitos foi 57 anos e os dois sujeitos que tiveram achados inesperados tinham 51 e 57 anos. Nosso reduzido tamanho amostral impede extrapolações dos dados e correlações da idade com os achados do Doppler transcraniano funcional.

6.3. Relação entre o índice de ativação hemisférica do Doppler transcraniano funcional e a preferência manual pelo Inventário de Dominância Lateral de Edimburgo

A preferência manual é uma das mais óbvias assimetrias do comportamento humano e baseia-se na dominância pelo uso de uma mão em detrimento da segunda para a realização de tarefas manuais¹⁴⁵. A relação entre a preferência manual e as assimetrias hemisféricas é crucial para o entendimento dos sistemas neurais que compõe o comportamento humano¹⁴⁶.

Há divergência com relação ao melhor método para se determinar e aferir a preferência motora manual. Nós optamos pelo uso do Inventário de Dominância Lateral de Edimburgo por ser um método bastante consolidado e o mais utilizado em estudos envolvendo pacientes com doenças cerebro-vasculares^{22, 118}.

Diversos trabalhos com diferentes técnicas de neuroimagem funcional já demonstraram a relação entre medidas fisiológicas da assimetria hemisférica e a preferência manual funcional. Volkmann et al.¹⁴⁷, estudando a correlação entre o grau de assimetria da atividade cortical hemisférica aferida por meio de magnetoencefalografia e a preferência manual em 10 voluntários encontraram uma correlação significativa ($r = -0.76$; $P = 0.0082$), semelhante à por nós encontrada. Correlação similar foi obtida por Helmich et al.¹⁴⁸ ao estudarem a lateralidade hemisférica em 12 voluntários durante paradigma motor, por meio da espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) funcional.

Em um elegante estudo envolvendo ressonância magnética funcional e estimulação magnética transcraniana¹⁴⁹ com 10 voluntários saudáveis (7 homens,

idade média 36,5 anos) nenhum indivíduo mostrou ativação significativa do córtex sensório-motor ipsilateral (direito) durante os movimentos do seu dedo indicador direito (dominante). No entanto, metade dos sujeitos demonstrou ativação ipsilateral ao mover os dedos indicadores da mão esquerda (não-dominante). Nesses últimos, a estimulação magnética transcraniana excitatória do córtex sensório-motor ipsilateral (esquerdo) não foi capaz de evocar potenciais motores na mão ipsilateral, sugerindo assim que a atividade cortical ipsilateral presente naquela metade dos sujeitos seria causada por excitação inter-hemisférica, e não por ativação primária dos neurônios motores.

Outro estudo, com estimulação magnética transcraniana¹⁴⁰ em 6 voluntários saudáveis sugeriu a ativação do córtex motor ipsilateral à tarefa motora unimanual, bem como uma influência significativa da inibição e excitação inter-hemisférica neste tipo de ativação, sendo esta influência assimétrica e mais presente do hemisfério dominante sobre o não dominante.

Nós reportamos pela primeira vez que os resultados obtidos pelo Doppler transcraniano funcional mostraram-se fortemente correlacionados com a dominância motora funcional avaliada pelo Inventário de Dominância Lateral de Edimburgo. A metodologia apresentada obteve uma forte correlação entre o resultado do seu processamento, um dado neurofisiológico e o inventário de Edimburgo, um dado comportamental.

6.4. Limitações

O tamanho da amostra é uma limitação deste estudo. Contudo, apesar do pequeno número de indivíduos, nossos resultados sugerem que a metodologia seja robusta. Cabe notar que o tamanho amostral por nós apresentado não é muito diferente de outros estudos experimentais realizados nesta área.

Certamente, estudos futuros são necessários para avaliar-se a confiabilidade teste-reteste deste método, para confirmar a capacidade de determinar a lateralização hemisférica em provas não motoras, como visuais ou do linguagem, e também para verificar a validação externa da metodologia.

Além disso, a comparação com outros métodos de referência, como a ressonância magnética funcional, poderia fornecer informações adicionais interessantes sobre o método.

6.5 Considerações finais

O presente estudo propõe um novo método de análise de Doppler transcraniano funcional que pretende ser uma ferramenta promissora para o estudo da lateralização hemisférica motora e interações inter-hemisféricas, especialmente em situações onde métodos mais dispendiosos ou invasivos não são adequados.

Este método permite de maneira eficiente a redução do ruído sem comprometer a excelente resolução temporal, e não utiliza uma função da resposta hemodinâmica cerebral pré-determinada. Além disso, é sensível, automatizado, de

baixo custo e de fácil implementação em laboratórios de Doppler transcraniano. Permite investigar a função cerebral durante o desempenho de tarefas em indivíduos saudáveis e deverá ser investigado futuramente em pacientes com acidente vascular cerebral.

7. Conclusões

7. CONCLUSÕES

7.1. Desenvolvemos uma nova metodologia de Doppler transcraniano funcional que permite a análise da lateralização hemisférica da atividade cortical durante tarefa motora unimanual com mínima influência de artefatos de ruído no sinal e com formato da resposta hemodinâmica cerebral flexível, não pré-determinado.

7.2. Este método foi capaz de diferenciar a lateralização hemisférica da atividade cerebral durante paradigma motor unimanual em um grupo de voluntários saudáveis, com desempenho similar a outros métodos publicados de análise de Doppler transcraniano funcional.

7.3. Em indivíduos saudáveis, houve correlação significativa do índice de ativação hemisférica obtido pelo Doppler transcraniano funcional e a preferência manual aferida pelo inventário de Edimburgo.

8. Anexos

Anexo A – Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq)

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 07/10/2009, **APROVOU o(s) documento(s)** abaixo mencionado(s) no Protocolo de Pesquisa nº **0908/08**, intitulado: **"EFEITOS HEMODINÂMICOS ENCEFÁLICOS DA ESTIMULAÇÃO MAGNÉTICA TRANSCRANIANA EM PACIENTES COM ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO: AVALIAÇÃO COM DOPPLER TRANSCRANIANO"** apresentado pelo Departamento de **NEUROLOGIA**.

- Adendo ao Protocolo
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Pesquisador (a) Responsável: **Dra. Adriana Bastos Conforto**

CAPPesq, 08 de Outubro de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
**Presidente da Comissão
de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa**

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 19/11/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 0908/08, intitulada: **"EFEITOS HEMODINÂMICOS ENCEFÁLICOS DA ESTIMULAÇÃO MAGNÉTICA TRANSCRANIANA EM PACIENTES COM ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO: AVALIAÇÃO COM DOPPLER TRANSCRANIANO"** apresentado pelo Departamento de **NEUROLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Dra. Adriana Bastos Conforto**

Pesquisador (a) Executante: **Solo Semelmann Haratz**

CAPPesq, 24 de Novembro de 2008

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Anexo B – Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:SEXO. M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

.....

BAIRRO:.....CIDADE

CEP:.....TELEFONE:(.....

2.RESPONSÁVEL LEGAL:.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

.....

BAIRRO:.....CIDADE :.....

CEP:.....TELEFONE:(.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Efeitos hemodinâmicos encefálicos da Estimulação Magnética Transcraniana em pacientes com Acidente Vascular Cerebral Isquêmico: Avaliação com Doppler transcraniano

2. PESQUISADORES: Salo Semelmann Haratz e Adriana Bastos Conforto

CARGO/FUNÇÃO: médico estagiário/ médica assistente

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 131715 e Nº 80298

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Neurologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO

RISCO MÍNIMO

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 8 meses

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

Nós estamos convidando o senhor/senhora para participar de um estudo da Neurologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. É importante que o senhor/senhora leia ou ouça e entenda o que será feito nesta pesquisa. Sua participação depende somente do senhor/senhora, e o senhor/senhora pode deixar de participar do estudo a qualquer momento.

Este estudo tem o objetivo de entender melhor o funcionamento de cérebro através de um exame chamado Doppler Transcraniano.

O Doppler Transcraniano é um tipo de ecografia dos vasos (artérias) do cérebro, feito com um aparelho que é encostado na cabeça e que consegue perceber a passagem do sangue dentro destes vasos.

Este exame já é feito de rotina em nosso hospital, inclusive em bebês recém nascidos.

O que nós queremos descobrir neste estudo?

Como os movimentos da mão modificam a maneira que o sangue passa pelos vasos (artérias) do cérebro.

Como vai funcionar o estudo?

O senhor/senhora deverá comparecer apenas uma vez durante o estudo. Antes de o estudo começar de verdade o médico vai fazer algumas perguntas e alguns testes com o senhor/senhora. Eles vão servir para o médico comparar os resultados entre os pacientes do estudo.

Existem riscos neste estudo?

Durante o Doppler transcraniano e o Doppler de carótidas o paciente não sente nada. O exame é bastante seguro, prova disso é que o mesmo tipo de exame é feito para examinar os bebês nas barrigas das mulheres grávidas

Durante o estudo vão ser usados dois tipos de exames, o Doppler transcraniano e o Doppler de carótidas e vertebrais. Como são estes exames?

- Doppler de carótidas e vertebrais. Ele é parecido com o Doppler transcraniano, mas serve para avaliar os vasos sanguíneos do pescoço, que são as artérias carótidas e as artérias vertebrais. Estes são os vasos que levam sangue do coração para o cérebro. O aparelho é encostado no pescoço. Ele demora mais ou menos 30 minutos.

- Doppler Transcraniano:

Um instrumento chamado transdutor, que é um pequeno “tubo” de metal, é encostado na cabeça do paciente, e é ligado ao computador, e assim o médico pode fazer o exame. Para o exame é usado um gel a base de água, igual ao usado na ecografia de barriga. O exame demora em média 30 minutos.

Para as avaliações do estudo, durante o exame, em alguns momentos o senhor/senhora deverá realizar alguns movimentos com a mão. Estes movimentos serão ensinados antes. Quando lhe for solicitado, o senhor/senhora deverá abrir e fechar os dedos da mão, conforme for escutando um barulho (BIP). Para no final do estudo sabermos se os movimentos foram feitos de maneira correta, será colocado em suas mãos umas “etiquetas” presas a um fio (eletrodo), e estes fios serão ligados a um aparelho (eletroneuromiógrafo). Estes fios não “dão” choque, e o senhor/senhora não vai sentir nenhum desconforto. Estes movimentos serão realizados com as duas mãos, conformes as orientações do médico durante o estudo.

O senhor vai estar sentado em frente a uma tela de computador. Quando vir um sinal e ouvir um BIP deverá fazer um movimento. Isso será muito bem explicado e treinado antes.

O estudo será realizado no laboratório de Neuroestimulação, localizado no 5^o andar do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo.

Depois que o estudo terminar, poderemos dizer se a movimentação da mão muda a forma como o sangue passa dentro dos vasos do cérebro. Esperamos que

essa descoberta possa ajudar no tratamento para fraqueza na mão e do braço de pessoas que tiveram derrame.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

Se o senhor/senhora tiver qualquer pergunta ou problemas em relação a esta pesquisa, deve entrar em contato com o doutor Salo S Haratz pelos telefones 7832-6436 ou com a Dra Adriana Conforto pelos telefones 8814-0907 / 3069-6401 / 3069-7877.

Caso o senhor/senhora não goste do exame ou de qualquer outra parte do protocolo, pode desistir a qualquer momento, é só avisar o pesquisador. Neste caso, sua participação na pesquisa vai ser terminada. Se o senhor/senhora se sentir cansado devido ao exame, e quiser desistir de participar da pesquisa, também pode fazer isso a qualquer momento.

Se os resultados desta pesquisa forem publicados em revistas de Neurologia ou em congressos, o nome do senhor/senhora não será revelado. Os testes que forem filmados não serão divulgados sem sua autorização, todos os dados coletados na pesquisa serão confidenciais.

O senhor/senhora não terá despesas pessoais em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não haverá compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem

direito a tratamento médico na instituição, bem como indenizações legalmente estabelecidas.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Veja item IV.

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

Nome: _____

Documento: _____

Data/Hora: ____/____/____ / ____:____

Assinatura do pesquisador

Nome: _____

Documento: _____

Data/Hora: ____/____/____ / ____:____

Anexo C – Inventário de Dominância Lateral de Edimburgo
Traduzido do inglês de Oldfield⁹

Atividade (antes do evento)	Mão E		Mão D
Escrever ou distribuir as cartas de um baralho			
Desenhar ou encher de água um copo			
Jogar uma bola			
Utilizar um cinzeiro			
Utilizar uma escova de dentes			
Comer com um garfo			
Segurar uma vassoura (mão do alto)			
Acender um fósforo			
Segurar uma colher de sopa			
Abrir um pote (mão que segura a tampa)			
Total			

Quociente de lateralidade= (total D – total E/total D + total E) X 100

QL= _____

-100: canhoto absoluto; 0: ambidestro; + 100: destro absoluto

Anexo D – Questionário de coleta de dados

**PROJETO: ENSAIO CLÍNICO COM ESTIMULAÇÃO MAGNÉTICA
TRANSCRANIANA EM PACIENTES COM
ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL**

VOLUNTÁRIOS SAUDÁVEIS

Paciente: _____

Iniciais: _____

Número: _____

1.1. Nome: _____

1.2. Idade: _____ 1.3. Data de nascimento: ____/____/____ RG HC: _____

1.5. Raça: 1. Negra() 2. Branca() 3. Parda() 4. Amarela() 5. Outra: _____()

1.6. Endereço: _____

1.7. Telefones: _____

1.8. Escolaridade: _____ () <4ª () ≥ 4ª

1.10. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

1) () Idade entre 18 e 80 anos.

1.11. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- a) () Uso de bomba de infusão implantável
- b) () Portadores de marcapasso cardíaco
- c) () Gestantes
- d) () Hipertensão intracraniana
- e) () Antecedentes de crises epiléticas
- f) () Aparelhos eletrônicos ou objetos metálicos intracranianos
- g) () Falhas ósseas no crânio
- h) () Múltiplos AVCs
- i) () Outras doenças neurológicas, exceto enxaqueca
- j) () Deformidade articular grave
- k) () Câncer terminal
- l) () Doença crônica grave como I Renal, ICC, DPOC, etc.
- m) () Incapacidade para fornecer consentimento livre e esclarecido devido à afasia grave, anosognosia, ou déficit cognitivo.
- n) () “Stent” implantado em artérias carótidas ou vertebrais há menos de dois meses.
- o) () Uso de antidepressivos tricíclicos, neurolépticos, benzodiazepínicos

- p) () Presença de projétil em áreas de risco lesivo
- q) () Impossibilidade de comparecer às sessões de tratamento
- r) () Estenose intracraniana importante, demonstrada pelo DOPPLER TRANSCRANIANO(VS em cm/s do fluxo sanguíneo cerebral maior que 130 na ACI; 240 na ACM; 130 na AB ou AV)
- s) () Ausência de janela ultra-sônica temporal
- t) ()Oclusão arterial intra ou extracraniana

1.12. DOENÇAS ASSOCIADAS

- a- () HAS: a1() controlada (a2 não controlada)
- b- () DM
- c- () Cardiopatia:
- d- () Arritmia cardíaca
- e- () Insuficiência arterial periférica
- f- () Pneumopatia
- g- () Tabagismo
 - () nunca fumou
 - () tabagista _____maços/dia por _____
- h- () Etilismo _____
- i- () Doença reumatológica
- j- () Doença renal

1.13. TERMO DE CONSENTIMENTO

- () Assinado por paciente e pesquisador (___/___/___)
- () Cópia deixada com paciente

1.14. EXAME NEUROLÓGICO

	Normal	Alterado
Pares cranianos		
Força muscular		
Reflexos		
Sensibilidade		
Sensibilidade		
Coordenação		
Marcha /Equilíbrio		

1.15. QUESTIONÁRIO DE EDIMBURGO

Atividade (ANTES do evento)	Mão E	Mão D
Escrever ou distribuir as cartas de um baralho		
Desenhar ou encher de água um copo		
Jogar uma bola		
Utilizar um cinzeiro		
Utilizar uma escova de dentes		
Comer com um garfo		
Segurar uma vassoura (mão do alto)		
Acender um fósforo		
Segurar uma colher de sopa		
Abrir um pote (mão que segura a tampa)		
TOTAL		

Quociente de lateralidade = (total D - total E / total D + total E) x 100 Q.L.=

-100: canhoto absoluto; 0 ambidestro; + 100: destro absoluto

1.16. RANDOMIZAÇÃO MEMBRO

- PAM/ TR iniciar com membro () direito () esquerdo

1.16. MEDICAÇÕES EM USO:

a)Anticoagulação (diversas drogas podem ser selecionadas)

nenhum warfarina heparina heparina de baixo peso molecular ND

b) Agentes anti- plaquetários (diversas drogas podem ser selecionadas)

nenhuma aspirina ticlopidina clopidogrel ND

c) Tratamento de diminuição lipídica (diversas drogas podem ser selecionadas)

nenhuma estatina fibrato outros ND

d) Anti-diabéticos (diversas drogas podem ser selecionadas)

nenhuma insulina anti-diabéticos orais ND

e) Anti-hipertensivos (diversas drogas podem ser selecionadas)

nenhuma beta bloqueadores bloqueadores de canais de cálcio diuréticos
ACE-inibidor bloqueador de angiotensina 2 outros ND

f) Tratamento de cefaléia (diversas drogas podem ser selecionadas)

nenhuma triptano derivados do ergot outros ND

g) Drogas anti- inflamatórias (AIDs) (diversas drogas podem ser selecionadas)

nenhuma AINE corticoesteróides

h) Terapia para reposição hormonal (somente para mulheres) :

nenhum terapia de substituição pós menopausa contraceptivo

i) Antidepressivos

nenhum tricíclicos ISRS outros

j) Anticonvulsivantes

nenhum fenitoína carbamazepina outro

2.0. DOPPLER VASOS EXTRACRANIANOS

EXAME:(__/__/____). Examinador: _____

Vaso		ACC	ACI	ACE	AV
Estenos e %	D				
	E				

3.0. DOPPLER TRANSCRANIANO COMPLETO

Data ___/___/_____ Horário: ___:___

ARQUIVO: _____

4.0. TREINAMENTO PAM

- () Metronomo
- () 2 minutos de repouso + 2 minutos de prova motora
- () 2 minutos de repouso + 2 minutos de prova motora com o segundo membro
- () 2 minutos de repouso + 2 minutos de prova motora com os 2 membros

5.0. TREINAMENTO TR

- () paciente sentado na poltrona – () 60 cm distancia olhos X Monitor
- () colocar tala no braço parético e fixar no braço da poltrona
- () Abrir programa “Tempo de Reação” no LabView. Escolher onde gravar
- () Instrução:
“Olhar uma bola verde escura no centro da tela, e apertar o botão tão depressa quanto possível em resposta a mudança na cor da bola. Repetir quantas vezes a bola mudar de cor.”
- () Não informar o paciente sobre o desempenho
- () Realizar Teste de Tempo de Reação (bloco de 20)

DADOS VITAIS:

PA :___/___ mmHg FC:___ BPMFR:___ Spo2: _____ Jejum ()sim ()não

TESTE DO TEMPO DE REAÇÃO

- () paciente sentado na poltrona – () 60 cm distancia olhos X Monitor
- () colocar tala no braço parético e fixar no braço da poltrona
- () Abrir programa “Tempo de Reação” no LabView. Escolher onde gravar
- () Instrução:

“Olhar uma bola verde escura no centro da tela, e apertar o botão tão depressa quanto possível em resposta a mudança na cor da bola. Repetir quantas vezes a bola mudar de cor.”

- () Não informar o paciente sobre o desempenho
- () Iniciar com o membro () direito () esquerdo
- () estabilização (3 blocos de 20)

Atingir menos de 20% de diferença entre última amostra e antepenúltima

Arquivo: _____

- () Realizar Teste de Tempo de Reação (bloco de 20)

Arquivo: _____

- () após realizar com o membro () direito () esquerdo
- () estabilização (3 blocos de 20)

Atingir menos de 20% de diferença entre última amostra e antepenúltima

Arquivo: _____

- () Realizar Teste de Tempo de Reação (bloco de 20)

Arquivo: _____

PROVA DE ATIVAÇÃO MOTORA

- Membro inicialmente estimulado:

() Esquerdo () Direito

- () Metronomo
- () 2 minutos de repouso
- () 2 minutos de prova motora
- () 2 minutos de repouso
- () 2 minutos de prova motora com o segundo membro
- () 2 minutos de repouso
- () 2 minutos de prova motora com os 2 membros

DTC: _____

PA : ____/____ mmHg FC:____ BPMFR:____ Spo2: ____

Anexo E – Manual operacional do programa de análise de Doppler transcraniano funcional denominado FDAT (Functional Doppler Analysis Toolbox)

TUTORIAL

- 7) Download R software from the website: www.r-project.org

- 8) Download the *FDAT software* from <https://sites.google.com/site/fdattoolbox>.
- 9) Set up the .TXT files extracted from the DTC device for the analysis:
- Export files already in.TXT format
 - All files need to have 3 columns;
 - The first column represents the measurement order and must be numbered, starting at #1;
 - The second column stands for the raw velocity values for the Left Middle Cerebral Artery in cm/s;
 - The third column stands for the raw velocity values for the Right Middle Cerebral Artery in cm/s;
- 10) Independently of the file size, i.e., the duration of each series of motor activation task, the beginning of the activation phase must be determined

- 11) at the exact middle point of the whole series. For example, if the protocol consists of 2 minutes of rest and 2 minutes of motor activation, the file shall have 12000 rows, the activation phase starting exactly at row 6001. Run *R* software.

- 6) GO to *file* at the upper menu bar and select *change dir... / mudar dir...*

- 7) Select the directory to which you have copied the script *FDAT.r*

8) At the prompt, type: `source("FDAT.r")`

9) Execute fdoppler software pressing the “RUN” key.

- 10) The graphic interface will open and ask you for the name of the input file.

- 11) Choose the .TXT file to be analyzed.

- 12) The software provides the graphic curves for the analysis that may be saved by the operator for further use, if needed.

- 13) The Activation Index analysis results will appear at the software open window.

```

RGui
Arquivo  Editar  Visualizar  Misc  Pacotes  Janelas  Ajuda

R Console
Digite 'demo()' para demonstrações, 'help()' para o sistema on-line de ajuda,
ou 'help.start()' para abrir o sistema de ajuda em HTML no seu navegador.
Digite 'q()' para sair do R.

> source("fTCD_analyzer.r")
Carregando pacotes exigidos: tcltk
Carregando a interface Tcl/Tk ... pronto
Carregando pacotes exigidos: splines
[1] "Processing..."
[1] "Preprocessing Finished!"
[1] "Analyzing..."
[1] "-----"
[1] "  Summary of Resting and Activation Epochs  "
[1] "-----"
[1] "Mean of Resting (35 seconds):"
[1] -0.004876315
[1] "Mean of Resting (4 seconds of minimum variability):"
[1] -0.01575526
[1] "Mean of Activation (4 seconds peak):"
[1] 0.0134642
[1] "Mean of Activation (35 seconds):"
[1] 0.004904657
[1] "-----"
[1] "Analysis Finished!"
[1] "Processing..."

```

- a. 1st line: the mean of the last 35 seconds of the rest phase (A);
- b. 2nd line: mean of the 4 second period with less variation of the Activation Index during the last 35 seconds of the rest phase (B)
- c. 3rd line: the mean of the 4 seconds period with highest variation of the Activation Index during the first 35 seconds of the activation phase (C).
- d. 4th line: the mean of the first 35 seconds of the activation phase. (D)

14) Activation Index calculation:

- a. Calculate the difference between the value obtained for the activation and the rest phase ($C - A$);

15) Activation Index interpretation:

- Activation Index Positive (>0) = Right hemisphere activation
- Activation Index Negative (<0) = Left hemisphere activation

9. Referências

9. REFERÊNCIAS

1. Rosengarten B, Huwendiek O , Kaps M. Neurovascular coupling and cerebral autoregulation can be described in terms of a control system. *Ultrasound Med Biol.* 2001; 27(2):189-93.
2. Rosengarten B, Lutz H , Kaps M. The neurovascular coupling bears properties of a feedforward and feedback regulative mechanism. *Ultrasound in Medicine & Biology.* 2008; 34(1):1-6.
3. Jones M, Devonshire IM, Berwick J, Martin C, Redgrave P , Mayhew J. Altered neurovascular coupling during information-processing states. *Eur J Neurosci.* 2008; 27(10):2758-72.
4. Knecht S, Deppe M, Ebner A, Henningsen H, Huber T, Jokeit H , Ringelstein EB. Noninvasive determination of language lateralization by functional transcranial Doppler sonography: a comparison with the Wada test. *Stroke.* 1998; 29(1):82-6.
5. Silvestrini M, Caltagirone C, Cupini LM, Matteis M, Troisi E , Bernardi G. Activation of healthy hemisphere in poststroke recovery. A transcranial Doppler study. *Stroke.* 1993; 24(11):1673-7.
6. Rosch RE, Bishop DVM , Badcock NA. Lateralised visual attention is unrelated to language lateralisation, and not influenced by task difficulty - a functional transcranial Doppler study. *Neuropsychologia.* 2012; 50(5):810-5.
7. Deppe M, Knecht S, Papke K, Lohmann H, Fleischer H, Heindel W, Ringelstein EB , Henningsen H. Assessment of hemispheric language

- lateralization: a comparison between fMRI and fTCD. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000; 20(2):263-8.
8. Oldfield RC. The assessment and analysis of handedness: the Edinburgh inventory. *Neuropsychologia.* 1971; 9(1):97-113.
 9. Newton JM, Sunderland A , Gowland PA. fMRI signal decreases in ipsilateral primary motor cortex during unilateral hand movements are related to duration and side of movement. *NeuroImage.* 2005; 24(4):1080-7.
 10. van den Berg FE, Swinnen SP , Wenderoth N. Involvement of the primary motor cortex in controlling movements executed with the ipsilateral hand differs between left- and right-handers. *J Cogn Neurosci.* 2011; 23(11):3456-69.
 11. Bouma A , Bouma JM, *Lateral Asymmetries And Hemispheric Specialization: Theoretical Models And Research*, ed. Rockland M. 1990: Swets & Zeitlinger
 12. Harders AG, Laborde G, Droste DW , Rastogi E. Brain activity and blood flow velocity changes: a transcranial Doppler study. *Int J Neurosci.* 1989; 47(1-2):91-102.
 13. De Luca C, Bertollo M , Comani S. Non-magnetic equipment for the high-resolution quantification of finger kinematics during functional studies of bimanual coordination. *J Neurosci Methods.* 2010; 192(1):173-84.
 14. DeYoe EA, Bandettini P, Neitz J, Miller D , Winans P. Functional magnetic resonance imaging (fMRI) of the human brain. *J Neurosci Methods.* 1994; 54(2):171-87.

15. Ressel V, Wilke M, Lidzba K, Preissl H, Krageloh-Mann I , Lutzenberger W. Language lateralization in magnetoencephalography: two tasks to investigate hemispheric dominance. *Neuroreport*. 2006; 17(11):1209-13.
16. Milivojevic B, Hamm JP , Corballis MC. Hemispheric dominance for mental rotation: it is a matter of time. *Neuroreport*. 2009; 20(17):1507-12.
17. Coghill RC, Gilron I , Iadarola MJ. Hemispheric lateralization of somatosensory processing. *J Neurophysiol*. 2001; 85(6):2602-12.
18. Ors M, Ryding E, Lindgren M, Gustafsson P, Blennow G , Rosen I. SPECT findings in children with specific language impairment. *Cortex*. 2005; 41(3):316-26.
19. Christova PS, Lewis SM, Tagaris GA, Ugurbil K , Georgopoulos AP. A voxel-by-voxel parametric fMRI study of motor mental rotation: hemispheric specialization and gender differences in neural processing efficiency. *Exp Brain Res*. 2008; 189(1):79-90.
20. Hattemer K, Plate A, Heverhagen JT, Haag A, Keil B, Klein KM, Hermsen A, Oertel WH, Hamer HM, Rosenow F , Knake S. Determination of hemispheric dominance with mental rotation using functional transcranial Doppler sonography and FMRI. *J Neuroimaging*. 2011; 21(1):16-23.
21. Aaslid R, Markwalder TM , Nornes H. Noninvasive transcranial Doppler ultrasound recording of flow velocity in basal cerebral arteries. *J Neurosurg*. 1982; 57(6):769-74.
22. Matteis M, Vernieri F, Troisi E, Pasqualetti P, Tibuzzi F, Caltagirone C , Silvestrini M. Early cerebral hemodynamic changes during passive movements and motor recovery after stroke. *J Neurol*. 2003; 250(7):810-7.

23. Alexandrov AV, Sloan MA, Wong LK, Douville C, Razumovsky AY, Koroshetz WJ, Kaps M , Tegeler CH. Practice standards for transcranial Doppler ultrasound: part I--test performance. *J Neuroimaging*. 2007; 17(1):11-8.
24. Sloan MA, Alexandrov AV, Tegeler CH, Spencer MP, Caplan LR, Feldmann E, Wechsler LR, Newell DW, Gomez CR, Babikian VL, Lefkowitz D, Goldman RS, Armon C, Hsu CY, Goodin DS , Neurology TaTASotAAo. Assessment: transcranial Doppler ultrasonography: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2004; 62(9):1468-81.
25. Orlandi G , Murri L. Transcranial Doppler assessment of cerebral flow velocity at rest and during voluntary movements in young and elderly healthy subjects. *Int J Neurosci*. 1996; 84(1-4):45-53.
26. Jungehulsing GJ, Brunecker P, Nolte CH, Fiebach JB, Kunze C, Doepp F, Villringer A , Schreiber SJ. Diagnostic transcranial ultrasound perfusion-imaging at 2.5 MHz does not affect the blood-brain barrier. *Ultrasound Med Biol*. 2008; 34(1):147-50.
27. Barnett SB, Ter Haar GR, Ziskin MC, Rott HD, Duck FA , Maeda K. International recommendations and guidelines for the safe use of diagnostic ultrasound in medicine. *Ultrasound Med Biol*. 2000; 26(3):355-66.
28. Deppe M, Knecht S, Henningsen H , Ringelstein EB. AVERAGE: a Windows program for automated analysis of event related cerebral blood flow. *J Neurosci Methods*. 1997; 75(2):147-54.

29. Gommer ED, Shijaku E, Mess WH , Reulen JP. Dynamic cerebral autoregulation: different signal processing methods without influence on results and reproducibility. *Med Biol Eng Comput*. 2010; 48(12):1243-50.
30. Bracco L, Bessi V, Alari F, Sforza A, Barilaro A , Marinoni M. Cerebral hemodynamic lateralization during memory tasks as assessed by functional transcranial Doppler (fTCD) sonography: effects of gender and healthy aging. *Cortex*. 2011; 47(6):750-8.
31. Hao Q, Wong LKS, Lin WH, Leung TWH, Kaps M , Rosengarten B. Ethnic influences on neurovascular coupling: a pilot study in whites and Asians. *Stroke*. 2010; 41(2):383-4.
32. Bishop DV, Badcock NA , Holt G. Assessment of cerebral lateralization in children using functional transcranial Doppler ultrasound (fTCD). *J Vis Exp*. 2010(43).
33. Johnston LA, Gavrilescu M , Egan GF. A stochastic linear model for fMRI activation analyses. *Med Image Comput Comput Assist Interv*. 2011; 14(Pt 2):293-301.
34. Furie KL, Kasner SE, Adams RJ, Albers GW, Bush RL, Fagan SC, Halperin JL, Johnston SC, Katzan I, Kernan WN, Mitchell PH, Ovbiagele B, Palesch YY, Sacco RL, Schwamm LH, Wassertheil-Smoller S, Turan TN, Wentworth D, American Heart Association Stroke Council CoCNCaCC, Interdisciplinary Council on Quality of C , Outcomes R. Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke or transient ischemic attack: a guideline for healthcare professionals from the american heart association/american stroke association. *Stroke*. 2011; 42(1):227-76.

35. Carmignoto G , Gomez-Gonzalo M. The contribution of astrocyte signalling to neurovascular coupling. *Brain Res Rev.* 2010; 63(1-2):138-48.
36. Rosengarten B, Deppe M, Kaps M , Klingelhöfer J. Methodological aspects of functional transcranial Doppler sonography and recommendations for simultaneous EEG recording. *Ultrasound in Medicine & Biology.* 2012; 38(6):989-96.
37. Sheth SA, Nemoto M, Guiou M, Walker M, Pouratian N , Toga AW. Linear and nonlinear relationships between neuronal activity, oxygen metabolism, and hemodynamic responses. *Neuron.* 2004; 42(2):347-55.
38. Devonshire IM, Papadakis NG, Port M, Berwick J, Kennerley AJ, Mayhew JE , Overton PG. Neurovascular coupling is brain region-dependent. *Neuroimage.* 2012; 59(3):1997-2006.
39. Belanger M, Allaman I , Magistretti PJ. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab.* 2011; 14(6):724-38.
40. Butt AM. ATP: a ubiquitous gliotransmitter integrating neuron-glia networks. *Semin Cell Dev Biol.* 2011; 22(2):205-13.
41. Dienel GA. Fueling and imaging brain activation. *ASN Neuro.* 2012.
42. Cauli B , Hamel E. Revisiting the role of neurons in neurovascular coupling. *Front Neuroenergetics.* 2010; 2:9.
43. Iadecola C. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 2004; 5(5):347-60.
44. Amaro E , Barker GJ. Study design in fMRI: basic principles. *Brain and Cognition.* 2006; 60(3):220-32.

45. Girouard H , Iadecola C. Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *J Appl Physiol.* 2006; 100(1):328-35.
46. Zheng Y, Pan Y, Harris S, Billings S, Coca D, Berwick J, Jones M, Kennerley A, Johnston D, Martin C, Devonshire IM , Mayhew J. A dynamic model of neurovascular coupling: implications for blood vessel dilation and constriction. *Neuroimage.* 2010; 52(3):1135-47.
47. Filosa JA, Bonev AD , Nelson MT. Calcium dynamics in cortical astrocytes and arterioles during neurovascular coupling. *Circ Res.* 2004; 95(10):e73-81.
48. Iadecola C. Intrinsic signals and functional brain mapping: caution, blood vessels at work. *Cereb Cortex.* 2002; 12(3):223-4.
49. Lauritzen M. Reading vascular changes in brain imaging: is dendritic calcium the key? *Nat Rev Neurosci.* 2005; 6(1):77-85.
50. Harder DR, Alkayed NJ, Lange AR, Gebremedhin D , Roman RJ. Functional hyperemia in the brain: hypothesis for astrocyte-derived vasodilator metabolites. *Stroke.* 1998; 29(1):229-34.
51. Bittner CX, Valdebenito R, Ruminot I, Loaiza A, Larenas V, Sotelo-Hitschfeld T, Moldenhauer H, San Martin A, Gutierrez R, Zambrano M , Barros LF. Fast and reversible stimulation of astrocytic glycolysis by K⁺ and a delayed and persistent effect of glutamate. *J Neurosci.* 2011; 31(12):4709-13.
52. Raichle ME , Mintun MA. Brain work and brain imaging. *Annu Rev Neurosci.* 2006; 29:449-76.
53. Attwell D , Iadecola C. The neural basis of functional brain imaging signals. *Trends Neurosci.* 2002; 25(12):621-5.

54. Radhakrishnan H, Wu W, Boas D , Franceschini MA. Study of neurovascular coupling by modulating neuronal activity with GABA. *Brain Res.* 2011; 1372:1-12.
55. Zaletel M, Strucl M, Bajrovic FF , Pogacnik T. Coupling between visual evoked cerebral blood flow velocity responses and visual evoked potentials in migraineurs. *Cephalalgia.* 2005; 25(8):567-74.
56. Logothetis NK , Wandell BA. Interpreting the BOLD signal. *Annu Rev Physiol.* 2004; 66:735-69.
57. Scott NA , Murphy TH. Hemodynamic responses evoked by neuronal stimulation via channelrhodopsin-2 can be independent of intracortical glutamatergic synaptic transmission. *PLoS ONE.* 2012; 7(1):e29859.
58. Pawlik G, Rackl A , Bing RJ. Quantitative capillary topography and blood flow in the cerebral cortex of cats: an in vivo microscopic study. *Brain Res.* 1981; 208(1):35-58.
59. Vanzetta I, Slovin H, Omer DB , Grinvald A. Columnar resolution of blood volume and oximetry functional maps in the behaving monkey; implications for fMRI. *Neuron.* 2004; 42(5):843-54.
60. Martin C, Zheng Y, Sibson NR, Mayhew JE , Berwick J. Complex spatiotemporal haemodynamic response following sensory stimulation in the awake rat. *Neuroimage.* 2012; 66C:1-8.
61. Abraham T , Feng J. Evolution of brain imaging instrumentation. *Semin Nucl Med.* 2011; 41(3):202-19.
62. Kellman P, Gelderen P, de Zwart JA , Duyn JH. Method for functional MRI mapping of nonlinear response. *Neuroimage.* 2003; 19(1):190-9.

63. Silvestrini M, Troisi E, Matteis M, Cupini LM , Caltagirone C. Transcranial Doppler assessment of cerebrovascular reactivity in symptomatic and asymptomatic severe carotid stenosis. *Stroke*. 1996; 27(11):1970-3.
64. Stroobant N , Vingerhoets G. Transcranial Doppler ultrasonography monitoring of cerebral hemodynamics during performance of cognitive tasks: a review. *Neuropsychol Rev*. 2000; 10(4):213-31.
65. Serrador JM, Picot PA, Rutt BK, Shoemaker JK , Bondar RL. MRI measures of middle cerebral artery diameter in conscious humans during simulated orthostasis. *Stroke*. 2000; 31(7):1672-8.
66. Duschek S , Schandry R. Functional transcranial Doppler sonography as a tool in psychophysiological research. *Psychophysiology*. 2003; 40(3):436-54.
67. Deppe M, Ringelstein EB , Knecht S. The investigation of functional brain lateralization by transcranial Doppler sonography. *Neuroimage*. 2004; 21(3):1124-46.
68. Suri MF, Georgiadis AL, Tariq N, Vazquez G, Qureshi N , Qureshi AI. Estimated prevalence of acoustic cranial windows and intracranial stenosis in the US elderly population: ultrasound screening in adults for intracranial disease study. *Neuroepidemiology*. 2011; 37(1):64-71.
69. KA Fujioka DC, *Anatomy and freehand examination*, in *Transcranial Doppler*, Newell DW AR, Editor. 1992, Raven Press: New York.
70. Vadikolias KM, Artemis ND, Mitsias PD, Heliopoulos JN, Tripsianis GA, Vadikolia CM, Proios HS, Serdari AE, Piperidou CN , Milonas IA. Evaluation of the stability of blood flow over time in the dominant hemisphere: a functional transcranial Doppler study. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007; 27(11):1870-7.

71. Klingelhofer J, Matzander G, Sander D, Schwarze J, Boecker H , Bischoff C. Assessment of functional hemispheric asymmetry by bilateral simultaneous cerebral blood flow velocity monitoring. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997; 17(5):577-85.
72. Rihs F, Sturzenegger M, Gutbrod K, Schroth G , Mattle HP. Determination of language dominance: Wada test confirms functional transcranial Doppler sonography. *Neurology.* 1999; 52(8):1591-6.
73. Droste DW, Harders AG , Rastogi E. A transcranial Doppler study of blood flow velocity in the middle cerebral arteries performed at rest and during mental activities. *Stroke.* 1989; 20(8):1005-11.
74. Knecht S, Deppe M, Ringelstein EB, Wirtz M, Lohmann H, Drager B, Huber T , Henningsen H. Reproducibility of functional transcranial Doppler sonography in determining hemispheric language lateralization. *Stroke.* 1998; 29(6):1155-9.
75. Sabri O, Owega A, Schreckenberger M, Sturz L, Fimm B, Kunert P, Meyer PT, Sander D , Klingelhofer J. A truly simultaneous combination of functional transcranial Doppler sonography and H(2)(15)O PET adds fundamental new information on differences in cognitive activation between schizophrenics and healthy control subjects. *J Nucl Med.* 2003; 44(5):671-81.
76. Schmidt P, Krings T, Willmes K, Roessler F, Reul J , Thron A. Determination of cognitive hemispheric lateralization by "functional" transcranial Doppler cross-validated by functional MRI. *Stroke.* 1999; 30(5):939-45.
77. Aaslid R. Visually evoked dynamic blood flow response of the human cerebral circulation. *Stroke.* 1987; 18(4):771-5.

78. Droste DW, Harders AG , Rastogi E. Two transcranial Doppler studies on blood flow velocity in both middle cerebral arteries during rest and the performance of cognitive tasks. *Neuropsychologia*. 1989; 27(10):1221-30.
79. Kelley RE, Chang JY, Scheinman NJ, Levin BE, Duncan RC , Lee SC. Transcranial Doppler assessment of cerebral flow velocity during cognitive tasks. *Stroke*. 1992; 23(1):9-14.
80. !!! INVALID CITATION !!!
81. Silvestrini M, Cupini LM, Matteis M, Troisi E , Caltagirone C. Bilateral simultaneous assessment of cerebral flow velocity during mental activity. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1994; 14(4):643-8.
82. Knecht S, Deppe M, Backer M, Ringelstein EB , Henningsen H. Regional cerebral blood flow increases during preparation for and processing of sensory stimuli. *Exp Brain Res*. 1997; 116(2):309-14.
83. Schuepbach D, Boeker H, Duschek S , Hell D. Rapid cerebral hemodynamic modulation during mental planning and movement execution: evidence of time-locked relationship with complex behavior. *Clin Neurophysiol*. 2007; 118(10):2254-62.
84. Badcock NA, Holt G, Holden A , Bishop DV. dopOSCCI: a functional transcranial Doppler ultrasonography summary suite for the assessment of cerebral lateralization of cognitive function. *J Neurosci Methods*. 2012; 204(2):383-8.
85. Panerai RB, Moody M, Eames PJ , Potter JF. Dynamic cerebral autoregulation during brain activation paradigms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 289(3):H1202-8.

86. Aydin N, Marvasti F , Markus HS. Embolic Doppler ultrasound signal detection using discrete wavelet transform. *IEEE Trans Inf Technol Biomed.* 2004; 8(2):182-90.
87. Lohmann H, Deppe M, Jansen A, Schwindt W , Knecht S. Task repetition can affect functional magnetic resonance imaging-based measures of language lateralization and lead to pseudoincreases in bilaterality. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2004; 24(2):179-87.
88. Ubeyli ED. Combining eigenvector methods and support vector machines for detecting variability of Doppler ultrasound signals. *Comput Methods Programs Biomed.* 2007; 86(2):181-90.
89. Droste DW, Berger W, Schuler E , Krauss JK. Middle cerebral artery blood flow velocity in healthy persons during wakefulness and sleep: a transcranial Doppler study. *Sleep.* 1993; 16(7):603-9.
90. Tiecks FP, Haberl RL , Newell DW. Temporal patterns of evoked cerebral blood flow during reading. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998; 18(7):735-41.
91. Haubrich C, Klemm A, Diehl RR, Moller-Hartmann W , Klotzsch C. M-wave analysis and passive tilt in patients with different degrees of carotid artery disease. *Acta Neurol Scand.* 2004; 109(3):210-6.
92. Daley ML, Pasley RL, Connolly M, Timmons SD, Angel J, Stidham G , Leffler CW. Spectral characteristics of B-waves and other low-frequency activity. *Acta Neurochir Suppl.* 2002; 81:147-50.
93. Bay-Hansen J, Ravn T , Knudsen GM. Application of interhemispheric index for transcranial Doppler sonography velocity measurements and evaluation of recording time. *Stroke.* 1997; 28(5):1009-14.

94. Seghier ML. Laterality index in functional MRI: methodological issues. *Magn Reson Imaging*. 2008; 26(5):594-601.
95. Achten E, Santens P, Boon P, De Coo D, Van De Kerckhove T, De Reuck J, Caemaert J , Kunnen M. Single-voxel proton MR spectroscopy and positron emission tomography for lateralization of refractory temporal lobe epilepsy. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1998; 19(1):1-8.
96. Friston KJ, Frith CD, Turner R , Frackowiak RS. Characterizing evoked hemodynamics with fMRI. *NeuroImage*. 1995; 2(2):157-65.
97. Altmann Y, Halimi A, Dobigeon N , Tourneret JY. Supervised nonlinear spectral unmixing using a postnonlinear mixing model for hyperspectral imagery. *IEEE Trans Image Process*. 2012; 21(6):3017-25.
98. Muller T, Reinhard M, Oehm E, Hetzel A , Timmer J. Detection of very low-frequency oscillations of cerebral haemodynamics is influenced by data detrending. *Med Biol Eng Comput*. 2003; 41(1):69-74.
99. Friston KJ, Josephs O, Zarahn E, Holmes AP, Rouquette S , Poline J. To smooth or not to smooth? Bias and efficiency in fMRI time-series analysis. *Neuroimage*. 2000; 12(2):196-208.
100. Rihs F, Gutbrod K, Gutbrod B, Steiger HJ, Sturzenegger M , Mattle HP. Determination of cognitive hemispheric dominance by "stereo" transcranial Doppler sonography. *Stroke*. 1995; 26(1):70-3.
101. Knecht S, Henningsen H, Deppe M, Huber T, Ebner A , Ringelstein EB. Successive activation of both cerebral hemispheres during cued word generation. *Neuroreport*. 1996; 7(3):820-4.

102. Schnittger C, Johannes S, Arnavaz A , Munte TF. Blood flow velocity changes in the middle cerebral artery induced by processing of hierarchical visual stimuli. *Neuropsychologia*. 1997; 35(8):1181-4.
103. Cupini LM, Matteis M, Troisi E, Sabbadini M, Bernardi G, Caltagirone C , Silvestrini M. Bilateral simultaneous transcranial Doppler monitoring of flow velocity changes during visuospatial and verbal working memory tasks. *Brain*. 1996; 119 (Pt 4):1249-53.
104. Vingerhoets G , Stroobant N. Between-task habituation in functional transcranial Doppler ultrasonography. *Neuroreport*. 1999; 10(15):3185-9.
105. Jansen A, Floel A, Deppe M, van Randenborgh J, Drager B, Kanowski M , Knecht S. Determining the hemispheric dominance of spatial attention: a comparison between fTCD and fMRI. *Hum Brain Mapp*. 2004; 23(3):168-80.
106. Somers M, Neggers SF, Diederens KM, Boks MP, Kahn RS , Sommer IE. The Measurement of Language Lateralization with Functional Transcranial Doppler and Functional MRI: A Critical Evaluation. *Front Hum Neurosci*. 2011; 5:31.
107. Knake S, Haag A, Hamer HM, Dittmer C, Bien S, Oertel WH , Rosenow F. Language lateralization in patients with temporal lobe epilepsy: a comparison of functional transcranial Doppler sonography and the Wada test. *Neuroimage*. 2003; 19(3):1228-32.
108. Borbely K, Gjedde A, Nyary I, Czirjak S, Donauer N , Buck A. Speech activation of language dominant hemisphere: a single-photon emission computed tomography study. *Neuroimage*. 2003; 20(2):987-94.

109. Zaletel M, Strucl M, Rodi Z , Zvan B. The relationship between visually evoked cerebral blood flow velocity responses and visual-evoked potentials. *Neuroimage*. 2004; 22(4):1784-9.
110. Basic S, Hajnsek S, Poljakovic Z, Basic M, Culic V , Zadro I. Determination of cortical language dominance using functional transcranial Doppler sonography in left-handers. *Clin Neurophysiol*. 2004; 115(1):154-60.
111. Pelletier I, Sauerwein HC, Lepore F, Saint-Amour D , Lassonde M. Non-invasive alternatives to the Wada test in the presurgical evaluation of language and memory functions in epilepsy patients. *Epileptic disorders : international epilepsy journal with videotape*. 2007; 9(2):111-26.
112. House PM, Brückner KE , Lohmann HH. Presurgical functional transcranial Doppler sonography (fTCD) with intravenous echo enhancing agent SonoVue enables determination of language lateralization in epilepsy patients with poor temporal bone windows. *Epilepsia*. 2011; 52(3):636-9.
113. Knake S, Haag A, Pilgramm G, Reis J, Klein KM, Hoeffken H, Bartenstein P, Oertel WH, Hamer HM , Rosenow F. Ictal functional TCD for the lateralization of the seizure onset zone--a report of two cases. *Epilepsy Res*. 2004; 62(1):89-93.
114. Troisi E, Peppe A, Pierantozzi M, Matteis M, Vernieri F, Stanzione P, Silvestrini M , Caltagirone C. Emotional processing in Parkinson's disease. A study using functional transcranial doppler sonography. *J Neurol*. 2002; 249(8):993-1000.

115. Deckel AW, Cohen D , Duckrow R. Cerebral blood flow velocity decreases during cognitive stimulation in Huntington's disease. *Neurology*. 1998; 51(6):1576-83.
116. Caramia MD, Palmieri MG, Giacomini P, Iani C, Dally L , Silvestrini M. Ipsilateral activation of the unaffected motor cortex in patients with hemiparetic stroke. *Clin Neurophysiol*. 2000; 111(11):1990-6.
117. Cuadrado ML, Egido JA, Gonzalez-Gutierrez JL , Varela-De-Seijas E. Bihemispheric contribution to motor recovery after stroke: A longitudinal study with transcranial doppler ultrasonography. *Cerebrovasc Dis*. 1999; 9(6):337-44.
118. Silvestrini M, Troisi E, Matteis M, Cupini LM , Caltagirone C. Involvement of the healthy hemisphere in recovery from aphasia and motor deficit in patients with cortical ischemic infarction: a transcranial Doppler study. *Neurology*. 1995; 45(10):1815-20.
119. Azevedo E, Mendes A, Seixas D, Santos R, Castro P, Ayres-Basto M, Rosengarten B , Oliveira JP. Functional transcranial Doppler: presymptomatic changes in Fabry disease. *Eur Neurol*. 2012; 67(6):331-7.
120. Topcuoglu MA, Aydin H , Saka E. Occipital cortex activation studied with simultaneous recordings of functional transcranial Doppler ultrasound (fTCD) and visual evoked potential (VEP) in cognitively normal human subjects: effect of healthy aging. *Neuroscience letters*. 2009; 452(1):17-22.
121. Duschek S, Hellmann N, Merzoug K, Reyes del Paso GA , Werner NS. Cerebral blood flow dynamics during pain processing investigated by functional transcranial Doppler sonography. *Pain Med*. 2012; 13(3):419-26.

122. Carew JD, Wahba G, Xie X, Nordheim EV , Meyerand ME. Optimal spline smoothing of fMRI time series by generalized cross-validation. *Neuroimage*. 2003; 18(4):950-61.
123. Zhang CM, Jiang Y , Yu T. A comparative study of one-level and two-level semiparametric estimation of hemodynamic response function for fMRI data. *Stat Med*. 2007; 26(21):3845-61.
124. Li X, Coyle D, Maguire L, McGinnity TM , Benali H. A model selection method for nonlinear system identification based FMRI effective connectivity analysis. *IEEE transactions on medical imaging*. 2011; 30(7):1365-80.
125. Vingerhoets G , Stroobant N. Lateralization of cerebral blood flow velocity changes during cognitive tasks. A simultaneous bilateral transcranial Doppler study. *Stroke*. 1999; 30(10):2152-8.
126. Wolff T, Guirguis-Blake J, Miller T, Gillespie M , Harris R. Screening for carotid artery stenosis: an update of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*. 2007; 147(12):860-70.
127. Matteis M, Bivona U, Catani S, Pasqualetti P, Formisano R, Vernieri F, Troisi E, Caltagirone C , Silvestrini M. Functional transcranial Doppler assessment of cerebral blood flow velocities changes during attention tasks. *Eur J Neurol*. 2009; 16(1):81-7.
128. Azevedo E, Rosengarten B, Santos R, Freitas J , Kaps M. Interplay of cerebral autoregulation and neurovascular coupling evaluated by functional TCD in different orthostatic conditions. *Journal of Neurology*. 2007; 254(2):236-41.
129. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Adams RJ, Berry JD, Brown TM, Carnethon MR, Dai S, de Simone G, Ford ES, Fox CS, Fullerton HJ, Gillespie

- C, Greenlund KJ, Hailpern SM, Heit JA, Ho PM, Howard VJ, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Makuc DM, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McDermott MM, Meigs JB, Moy CS, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Rosamond WD, Sorlie PD, Stafford RS, Turan TN, Turner MB, Wong ND, Wylie-Rosett J, Subcommittee AHA/ASCaSS. Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2011; 123(4):e18-e209.
130. Matteis M, Federico F, Troisi E, Pasqualetti P, Vernieri F, Caltagirone C, Petrosini L, Silvestrini M. Cerebral blood flow velocity changes during meaningful and meaningless gestures--a functional transcranial Doppler study. *Eur J Neurol*. 2006; 13(1):24-9.
 131. Moody M, Panerai RB, Eames PJ, Potter JF. Cerebral and systemic hemodynamic changes during cognitive and motor activation paradigms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005; 288(6):R1581-8.
 132. Siero JC, Hermes D, Hoogduin H, Luijten PR, Petridou N, Ramsey NF. BOLD consistently matches electrophysiology in human sensorimotor cortex at increasing movement rates: a combined 7T fMRI and ECoG study on neurovascular coupling. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013; 33(9):1448-56.
 133. Piper SK, Krueger A, Koch SP, Mehnert J, Habermehl C, Steinbrink J, Obrig H, Schmitz CH. A wearable multi-channel fNIRS system for brain imaging in freely moving subjects. *Neuroimage*. 2014; 85 Pt 1:64-71.
 134. Cheyne DO. MEG studies of sensorimotor rhythms: a review. *Experimental neurology*. 2013; 245:27-39.

135. Turner RS, Grafton ST, Votaw JR, Delong MR , Hoffman JM. Motor subcircuits mediating the control of movement velocity: a PET study. *J Neurophysiol.* 1998; 80(4):2162-76.
136. Badcock NA, Nye A , Bishop DV. Using functional transcranial Doppler ultrasonography to assess language lateralisation: Influence of task and difficulty level. *Laterality.* 2012; 17(6):694-710.
137. Roje-Bedekovic M, Lovrencic-Huzjan A, Bosnar-Puretic M, Seric V , Demarin V. Hemispheric asymmetry of visual cortical response by means of functional transcranial Doppler. *Stroke research and treatment.* 2012; 2012:615406.
138. Salinet AS, Panerai RB , Robinson TG. Effects of active, passive and motor imagery paradigms on cerebral and peripheral hemodynamics in older volunteers: a functional TCD study. *Ultrasound Med Biol.* 2012; 38(6):997-1003.
139. Olman CA, Pickett KA, Schallmo MP , Kimberley TJ. Selective BOLD responses to individual finger movement measured with fMRI at 3T. *Hum Brain Mapp.* 2012; 33(7):1594-606.
140. Ziemann U , Hallett M. Hemispheric asymmetry of ipsilateral motor cortex activation during unimanual motor tasks: further evidence for motor dominance. *Clin Neurophysiol.* 2001; 112(1):107-13.
141. Cabeza R. Cognitive neuroscience of aging: contributions of functional neuroimaging. *Scandinavian journal of psychology.* 2001; 42(3):277-86.
142. Ward NS. Compensatory mechanisms in the aging motor system. *Ageing research reviews.* 2006; 5(3):239-54.

143. Cabeza R, Daselaar SM, Dolcos F, Prince SE, Budde M , Nyberg L. Task-independent and task-specific age effects on brain activity during working memory, visual attention and episodic retrieval. *Cereb Cortex*. 2004; 14(4):364-75.
144. Przybyla A, Haaland KY, Bagesteiro LB , Sainburg RL. Motor asymmetry reduction in older adults. *Neuroscience letters*. 2011; 489(2):99-104.
145. Corey DM, Hurley MM , Foundas AL. Right and left handedness defined: a multivariate approach using hand preference and hand performance measures. *Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol*. 2001; 14(3):144-52.
146. Brown SG, Roy EA, Rohr LE , Bryden PJ. Using hand performance measures to predict handedness. *Laterality*. 2006; 11(1):1-14.
147. Volkmann J, Schnitzler A, Witte OW , Freund H. Handedness and asymmetry of hand representation in human motor cortex. *J Neurophysiol*. 1998; 79(4):2149-54.
148. Helmich I, Rein R, Niermann N , Lausberg H. Hemispheric differences of motor execution: a near-infrared spectroscopy study. *Advances in experimental medicine and biology*. 2013; 789:59-64.
149. Kobayashi M, Hutchinson S, Schlaug G , Pascual-Leone A. Ipsilateral motor cortex activation on functional magnetic resonance imaging during unilateral hand movements is related to interhemispheric interactions. *Neuroimage*. 2003; 20(4):2259-70.