UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE FÍSICA

LUCIANA DA MATA MÔNACO

Conectividade funcional cerebral no estado de repouso através de técnicas complementares de Imagens por Ressonância Magnética

Ribeirão Preto – SP

2017

LUCIANA DA MATA MÔNACO	**Conectividade funcional cerebral no estado de repouso através de técnicas complementares de Imagens por Ressonância Magnética**		**MESTRADO FFCLRP/USP 2017**

LUCIANA DA MATA MÔNACO

Conectividade funcional cerebral no estado de repouso através de técnicas complementares de Imagens por Ressonância Magnética

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração
Física Aplicada à Medicina e Biologia

Orientadora
Profª. Drª. Renata Ferranti Leoni

Ribeirão Preto – SP

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Mônaco, Luciana da Mata

Conectividade funcional cerebral no estado de repouso através de técnicas complementares de Imagens por Ressonância Magnética / Luciana da Mata Mônaco; orientadora, Renata Ferranti Leoni. Ribeirão Preto – SP, 2017.

132 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2017.

1. Redes Cerebrais de Repouso. 2. Conectividade funcional. 3. Arterial Spin Labeling. 4. Imagem funcional por ressonância magnética.

Nome: MÔNACO, Luciana da Mata

Título: Conectividade funcional cerebral no estado de repouso através de técnicas complementares de Imagens por Ressonância Magnética

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho a Deus.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por seus favores e graças, por ouvir cada oração e me conceder chegar até aqui. Agradeço à minha mãe, Lúcia Ribeiro da Mata por ser a mulher que é, mãe e pai, minha melhor amiga e apoio. Obrigada mãe, por todo incentivo, pelos esforços em me instruir e por cuidar de mim com tanto amor, amo você.

Aos amigos de faculdade, Marcela, Débora pelo companheirismo que permaneceu até aqui. Aos colegas do departamento que desde a Iniciação científica me ensinaram a amar a pesquisa e a fazer tudo do jeito certo, porque afinal, "se fizer certo, dá certo" – Wallance Pazin. Também agradeço ao professor Amando Ito que durante a graduação me incentivou com sua dedicação e paixão pela pesquisa. Agradeço a vocês, por marcarem o começo da minha formação acadêmica e por me introduzirem ao prazer pela ciência.

Sobre os colegas do laboratório Inbrain, primeiramente agradeço pela companhia, pelas conversas das mais diversas áreas do saber, pelos cafés, pelas dicas e artigos compartilhados e pelas piadas que sempre nos fazem rir mais de quem contou do que da própria piada em si. Sim, somos péssimos nisso!!! Mas somos felizes assim. Obrigada, a todos, inclusive aos que já saíram. Em especial, agradeço ao Jeam e ao Ícaro que me instruíram quando cheguei com muita atenção e boa vontade e me tiraram algumas dúvidas, bem poucas... a respeito do laboratório, dos programas, da vida, etc. Umas mil, cada um? Obrigada mesmo.

Renata, como eu agradeço a minha orientadora? Não sei se coloco com os colegas de laboratório, com os amigos, com incentivadores... Enfim, coloquei separado, porque você foi os três para mim. Obrigada por tudo, pelas ajudas, pela compreensão infinita, pelos conselhos, pela paciência e sabedoria em ensinar. Dizem que o primeiro orientado assim como o primeiro filho sempre sofre mais, mas eu discordo e com certeza, seu Pedrinho também poderá discordar. Aliás, não te falei, mas foi lindo ver você se tornando mamãe pela primeira vez. E quem disse que atrapalhou o trabalho? Você conseguiu! ...e lá vou eu falar de admiração. Já chega, né? Obrigada, "profa". Foi muito bom trabalhar e aprender com você.

Agradeço aos amigos de ABU (Aliança Bíblia Universitária), irmãos de alma que estiveram comigo até aqui, sendo apoio nos momentos difíceis, compartilhando textos, alegrias, sofrimentos e aprendizados de todos os cursos do campus... é cada história! E pelas muitas, muitas risadas! Conhecer vocês fez e faz toda a diferença em minha vida. "*Em todo o tempo ama o amigo, mas na angústia se faz o irmão*", obrigada Amigos.

Agradeço às pessoas mais chegadas que fazem minha vida melhor todos os dias, à Mamis, aos amigos e à família! Vocês perfumam minha vida nos momentos alegres e tristes.

Ao departamento de Física da FFCLRP-USP, ao HC-FMRP e seus funcionários, pelos procedimentos técnicos e disponibilização do aparelho de Ressonância Magnética e de toda a infra-estrutura, essenciais para este trabalho. Agradeço também à Capes financiadora deste projeto, obrigada pela oportunidade.

Obrigada a todos pelo carinho, pelas contribuições pessoais e científicas que me fizeram crescer nesta caminhada e ser uma pessoa e pesquisadora melhor. Este trabalho tem um pouquinho de todos nós.

"Os que forem sábios, resplandecerão como o fulgor do firmamento; e os que a muitos ensinam a justiça, como as estrelas sempre e eternamente. Daniel 12.3"

RESUMO

Mônaco, L. M. **Conectividade funcional cerebral no estado de repouso através de técnicas complementares de Imagens por Ressonância Magnética**. 2017. 132 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Física Aplicada à Medicina e Biologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2017.

A presença de redes cerebrais funcionais ativadas durante o repouso é bem conhecida e verificada por diferentes técnicas de imagens, como as Imagens por Ressonância Magnética funcionais (IRMf) baseadas no contraste dependente do nível de oxigenação do sangue (BOLD, *Blood Oxygenation Level Dependent*). Entretanto, apesar de ser atualmente o método não invasivo convencional para tais estudos, o contraste BOLD é sensível a diferentes parâmetros hemodinâmicos (fluxo sanguíneo cerebral, CBF; volume sanguíneo cerebral e extração de oxigênio), cuja relação não é completamente conhecida em diversas patologias. Por outro lado, o método de Marcação dos Spins Arteriais (ASL) é uma técnica de IRM não invasiva que fornece mapas quantitativos de CBF e pode ser usada para avaliar as redes de repouso. Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar a viabilidade de usar sequências de ASL (pulsada e pseudocontínua), disponíveis para o uso na rotina clínica, para o estudo da conectividade funcional do cérebro em estado de repouso. Imagens de ASL e BOLD, de 23 indivíduos jovens e saudáveis, foram adquiridas em um equipamento de 3T. Após o pré-processamento usual das imagens e cálculos dos mapas de perfusão, CBF e pseudo-BOLD (pBOLD), a partir das imagens de ASL, as redes cerebrais de repouso foram obtidas pela Análise de Componentes Independentes (ICA) e pelo método baseado em semente. Utilizando ICA, a análise em grupo conjunta de pBOLD e BOLD identificou cinco redes: rede de modo padrão (DMN), visual, auditiva, saliência e motora. Quando analisados separadamente, os dados de pBOLD mostraram apenas as redes DMN e visual, enquanto os dados de BOLD mostraram também as redes auditiva, saliência, motora, atentiva e frontoparietais direita e esquerda. Para ambas as análises, comparações entre as redes de pBOLD e BOLD apresentaram similaridades de moderadas a altas. Entretanto, nenhuma rede foi observada utilizando os dados de perfusão e CBF. Já as análises baseadas em sementes mostraram correlações significativas, para as séries temporais de

pBOLD e CBF, entre regiões que constituem algumas redes de repouso conhecidas (DMN, visual, sensorial-motora, atentiva e frontoparietal). Os valores obtidos para a força das conectividades nas redes de pBOLD e CBF se correlacionaram com aqueles obtidos nas redes de BOLD. As diferenças no desempenho de ASL e BOLD devem-se a uma combinação de fatores, como relação sinal ruído e resolução temporal. Além disso, a natureza dos sinais não é a mesma. O sinal BOLD é influenciado por diferentes parâmetros fisiológicos e é proveniente principalmente de grandes veias; enquanto o sinal de ASL é proveniente da rede de capilares, fornecendo especificidade espacial mais alta para a atividade neuronal, além de permitir a quantificação do CBF, que está relacionado mais diretamente ao metabolismo cerebral. Portanto, o presente estudo mostrou ser possível investigar a conectividade funcional do cérebro no estado de repouso com uma sequência comercial, apesar das limitações técnicas da ASL. Além disso, as séries temporais de CBF e BOLD refletem diferentes aspectos do cérebro em repouso, fornecendo informações complementares dos seus processos fisiológicos.

Palavras-chave: Redes cerebrais de repouso. Conectividade funcional. Marcação dos Spins Arteriais. Imagem por Ressonância Magnética funcional.

ABSTRACT

Mônaco, L. M. **Functional brain connectivity at resting state through complementary Magnetic Resonance Imaging techniques.** 2017. 132 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Física Aplicada à Medicina e Biologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2017.

The presence of functional brain networks activated during resting state is well known and has been verified by different imaging techniques, such as the functional Magnetic Resonance Imaging (fMRI) based on the Blood Oxygenation Level-Dependent (BOLD) contrast. Although BOLD-fMRI is currently the conventional non invasive method for such studies, BOLD contrast is sensitive to different hemodynamic parameters (Cerebral Blood Flow, CBF; cerebral blood volume and oxygen extraction fraction), whose relationship is not fully understood in several pathologies. In contrast, the Arterial Spin Labeling (ASL) MRI technique is a non invasive tool for CBF quantification and can be used to investigate resting-state networks. Therefore, the goal of the present study was to investigate the feasibility of using ASL sequences (pulsed and pseudocontinuous), available for clinical routine use, for the study of functional connectivity of the brain at rest. ASL and BOLD images of 23 healthy young subjects were acquired in a 3T machine. After the usual image pre-processing and quantification of perfusion, CBF and pseudo-BOLD (pBOLD) maps, from ASL images, resting-state brain networks were obtained by Independent Component Analysis (ICA) and a seed-based method. Five networks were identified in a joint analysis of pBOLD and BOLD: Default Mode Network (DMN), visual, auditory, salience, and motor. When analyzed separately, pBOLD showed only the DMN and visual networks, while BOLD also showed auditory, salience, motor, attentive, right and left frontoparietal networks. For both analyses, comparisons between pBOLD and BOLD networks showed from moderate to high similarities. However, no network was obtained from perfusion and CBF time series. Seed-based analysis showed significant correlations, for pBOLD e CBF time series, between regions that integrate some known networks (DMN, visual, sensorial-motor, attentive and frontoparietal). Functional connectivity strength obtained from pBOLD and CBF networks correlated with the ones from BOLD data. Differences in performance with ASL and BOLD are due

to a combination of factors, such as SNR and temporal resolution. Moreover, the nature of the signals is not the same. BOLD signal is influenced by different physiologic parameters and comes mainly from large veins; while ASL signal comes from small capillaries, providing higher spatial specificity regarding neural activity, in addition to allow the quantification of CBF, which is closer related to the cerebral metabolism. In conclusion, the present study showed the feasibility of investigating functional connectivity of the brain at rest using a commercial ASL sequence, even with its technical limitations. Moreover, CBF and BOLD time series reflect different aspects of the resting-state brain and provide complementary information on its physiological processes.

Keywords: Resting-state cerebral networks. Functional connectivity. Arterial Spin Labeling. Functional Magnetic Resonance Imaging.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Dinâmica de atividade do córtex pré-frontal medial. Figura adaptada de Raichle et al., 2001) 5

Figura 1.2: Diagrama ilustrativo da função da resposta hemodinâmica a uma atividade neural de curta duração. Algumas fases compõem o sinal: (A) linha de base, (B) BOLD negativo inicial (*initial dip*), (C) BOLD positivo crescente, (D) pico da resposta, (E) BOLD positivo decrescente, (F) BOLD negativo (*undershoot*), (G) retorno à linha de base 9

Figura 1.3: Representação das regiões envolvidas em cada etapa do processo de obtenção do par controle-marcado, pela técnica de ASL pulsada. Figura adaptada de: (http://mri-q.com/what-is-asl.html, acesso em 24/01/2017) 12

Figura 1.4: Representação esquemática dos spins fornecedores de sinal em um *voxel* para o cálculo dos mapas de Perfusão (Δ) e de CBF. Figura adaptada de: (BOROGOVAC; ASLLANI, 2012) 13

Figura 1.5: Representação da aquisição das imagens (a) controle e (b) marcada. Figura adaptada de: (PETERSEN; LIM; GOLAY, 2006) 15

Figura 1.6: (A) Representação das regiões de marcação e aquisição das imagens para os três principais métodos de ASL. (B) Diagrama esquemático da aplicação dos pulsos e aquisição da imagem para os métodos contínuo (CASL) e pseudocontínuo (pCASL). Figura adaptada de: (ALSOP et al., 2015) 17

Figura 1.7: Estudo de séries de IRMf através do método das sementes. (a) O voluntário permanece em estado de repouso, sendo pedido que não pense em nada especificamente, enquanto isso se faz a leitura da série de imagens. (b) Um uma tarefa convencional de IRMf pode ser aplicada a fim de encontrar uma região de interesse, ativada pelo mesmo. (c) Após a escolha da semente, informa-se a região/*voxels* com os quais se deseja comparar. E a correlação entre os sinais é calculada. (d) Para mapear todas as conexões

funcionais da semente escolhida, o sinal temporal da semente pode ser correlacionado com todos os *voxels* da imagem. Aqueles que exibirem alto coeficiente de correlação com a semente são considerados conectados funcionalmente a ela, resultando, após um limiar, no mapa de atividade final. Figura adaptada de: (VAN DEN HEUVEL; HULSHOFF POL, 2010). 21

Figura 1.8: Número de artigos em IRMf utilizando ICA, por ano e publicações relevantes da área. Figura adaptada de: (CALHOUN; ADALI, 2012) 22

Figura 1.9: Alguns tipos de rede, e sua representação do nível de organização das ligações e da conectividade entre os nós. Figura adaptada de: (BASSETT; BULLMORE, 2006) 24

Figura 1.10: Figura representante dos passos propostos por Bullmore. 1) Extração do sinal funcional ao longo do tempo. 2) Cálculo da correlação funcional entre os voxels ou regiões. 3) Aplicação do *thresholding* à matriz de correlação, para binarização. 4) Visualização da matriz binarizada, ou matriz de associação como um grafo. Figura adaptada de: (Wang et al., 2010) 26

Figura 3.1: Etapas do pré-processamento das imagens de ASL adquiridas pelo método pseudocontínuo 35

Figura 3.2: Etapas do pré-processamento das imagens de ASL adquiridas pelo método pulsado 36

Figura 3.3: Etapas do pré-processamento das imagens baseadas no contraste BOLD...36

Figura 3.4: Diagrama das principais etapas e escolha dos algoritmos na análise individual desempenhada no GIFT toolbox 38

Figura 3.5: Representação esquemática da ICA conjunta, juntamente com a seleção das componentes para o cálculo do coeficiente de similaridade DICE (CS_{DICE}) 40

Figura 3.6: (a)Atlas de regiões anatômicas, incluindo áreas corticais e subcorticais do FSL Harvard-Oxford Atlas. (b) Atlas de redes cerebrais 42

Figura 4.1: Imagens de quatro diferentes dinâmicos e imagens médias, de um indivíduo, baseadas no contraste BOLD e obtidas com a técnica pCASL (TE = 14ms) 44

Figura 4.2: Redes cerebrais de repouso (mapas de z) obtidas por ICA na análise de grupo (N = 22) conjunta de imagens BOLD e imagens pBOLD adquiridas por pCASL (TE = 14 ms). DMN: *default mode network* (rede de modo padrão), VIS: visual, AUD: auditiva, SALa: saliência anterior, MOT: motora 45

Figura 4.3: Redes cerebrais de repouso (mapas de z) obtidas por ICA na análise de grupo (N = 7) conjunta de imagens BOLD e imagens pBOLD adquiridas por pCASL (TE = 21 ms). DMN: *default mode network* (rede de modo padrão), FP-dir: frontoparietal direita, VIS: visual, AUD: auditiva, MOT: motora 46

Figura 4.4: Redes cerebrais de repouso (mapas de z) obtidas por ICA na análise de grupo (N = 18) conjunta de imagens BOLD e imagens pBOLD adquiridas por PASL. DMN: *default mode network* (rede de modo padrão), FP-esq: frontoparietal esquerda, VIS: visual, AUD: auditiva, ATT: atentiva, MOT: motora 47

Figura 4.5: Coeficientes de Similaridade Dice (CS_{DICE}) entre as redes cerebrais de repouso obtidas pela análise conjunta com imagens de diferentes técnicas 48

Figura 4.6: Redes cerebrais de repouso (mapas de z) obtidas por ICA na análise de grupo (N = 22) separada de imagens BOLD. DMN: *default mode network* (rede de modo padrão), FP-dir: frontoparietal direita, FP-esq: frontoparietal esquerda, VIS: visual, AUD: auditiva, ATT: atentiva, SALa: saliência anterior, MOT: motora 49

Figura 4.7: Redes cerebrais de repouso (mapas de z) obtidas por ICA na análise de grupo (N = 22) separada de imagens pBOLD adquiridas por pCASL (TE = 14 ms). DMN: *default mode network* (rede de modo padrão), VIS: visual 50

Figura 4.8: Redes cerebrais de repouso (mapas de z) obtidas por ICA na análise de grupo (N = 7) separada de imagens pBOLD adquiridas por pCASL (TE = 21 ms). DMN: *default mode network* (rede de modo padrão), VIS: visual 50

Figura 4.9: Redes cerebrais de repouso (mapas de z) obtidas por ICA na análise de grupo (N = 18) separada de imagens pBOLD adquiridas por PASL. DMN: *default mode network* (rede de modo padrão), FP-esq: Frontoparietal esquerda, VIS: visual, AUD: auditiva, ATT: atentiva 51

Figura 4.10: Redes cerebrais de repouso (mapas de z) reconstruídas para dois indivíduos, a partir da ICA da análise de grupo separada de imagens pBOLD adquiridas por pCASL (TE = 14 ms). DMN: *default mode network* (rede de modo padrão), VIS: visual 52

Figura 4.11: Redes cerebrais de repouso (mapas de z) reconstruídas para dois indivíduos, a partir da ICA da análise de grupo separada de imagens pBOLD adquiridas por PASL. DMN: *default mode network* (rede de modo padrão), VIS: visual 52

Figura 4.12: Coeficientes de Similaridade Dice (CS_{DICE}) entre as redes cerebrais de repouso obtidas por análises em grupo, separadas para cada técnica 53

Figura 4.13: Frequência de ocorrência das redes cerebrais de repouso obtidas com a análise individual realizada (a) nas imagens pBOLD e (b) nos mapas de perfusão. As frequências obtidas com as imagens BOLD estão apresentadas para comparação 55

Figura 4.14: Redes cerebrais de repouso (mapas de z) obtidas por ICA na análise de grupo (N = 22) separada de imagens BOLD com diferentes resoluções temporais (2, 8 e 12 s). DMN: *default mode network* (rede de modo padrão), FP-dir: frontoparietal direita, FP-esq: frontoparietal esquerda, VIS: visual, AUD: auditiva, ATT: atentiva, SALa: saliência anterior, MOT: motora 58

Figura 4.15: Relação sinal-ruído (RSR) média, calculada a partir do valor de cada indivíduo, ao longo dos 75 dinâmicos para as imagens BOLD com TR = 8 s e imagens de pBOLD, perfusão e CBF obtidas a partir de pCASL (TE = 14 ms) 60

Figura 4.16: Relação sinal-ruído (RSR) média, calculada a partir do valor de cada indivíduo, para imagens de pBOLD, perfusão e CBF obtidas a partir de pCASL (TE = 14 ms) e PASL. As barras de erro representam o desvio padrão. As linhas pontilhadas representam o valor da RSR obtida com BOLD (TR = 2 s), e seu desvio padrão. * p < 0,01 e ** p < 0,0001 vs. outros parâmetros da mesma técnica 60

Figura 4.17: Correlação entre a relação sinal-ruído (RSR) média e o CBF basal, calculados para cada indivíduo, a partir das imagens de CBF obtidas por pCASL (TE = 14 ms) 61

Figura 4.18: Flutuações espontâneas do sinal médio da substância cinzenta. (a) Série temporal BOLD (TR = 2s, 75 volumes). (b, c, d) Séries temporais de pBOLD, perfusão e CBF, obtidas com pCASL (TE = 14 ms) 64

Figura 4.19: Espectros de frequência das flutuações espontâneas do sinal médio da substância cinzenta. (a) Série temporal BOLD (TR = 2s, 75 volumes). (b, c, d) Séries temporais de pBOLD, perfusão e CBF, obtidas com pCASL (TE = 14 ms) 65

Figura 4.20: (a) Relação entre os valores de fluxo sanguíneo cerebral (CBF) basal, na substância cinzenta, de sete indivíduos, obtidos por imagens de pCASL com valores de TE iguais a 14 ms (eixo vertical) e 21 ms (eixo horizontal). O coeficiente de correlação de Pearson é igual a 0,57 (p = 0,18). (b) Os mesmos valores de CBF do item (a) apresentados de maneira diferente para que as diferenças entre os sujeitos possam ser mais bem observadas. Teste t bicaudal mostrou diferença significativa (p = 0,038) 64

Figura 4.21: Relação entre os valores médios de CBF, para cada indivíduo, obtidos a partir das máscaras espaciais das redes de pBOLD (CBFasl) e BOLD (CBFbold), das análises em grupo conjuntas 66

Figura 4.22: Relação entre os valores médios de CBF, para cada indivíduo, obtidos a partir das máscaras espaciais das redes de pBOLD (CBFasl) e BOLD (CBFbold), das análises em grupo separadas 67

Figura 4.23: (a) Número de *voxels* e (b) CBF para cada rede de repouso obtida pelas análises em grupo, conjunta e separada, das imagens BOLD e pBOLD (pCASL, TE = 14 ms). As barras de erro representam o desvio padrão para o grupo de indivíduos. ($^{+}$, * e ^{f} para $p < 0.05$ vs. Conjunta-BOLD, Separada-BOLD e Conjunta-pBOLD, respectivamente) 67

Figura 4.24: Redes cerebrais de repouso obtidas pela análise semente-*voxels* para as imagens BOLD (linha superior) e pBOLD (linha inferior) 69

Figura 4.25: Conexões (linhas cinzas) entre regiões anatômicas (círculos vermelhos), considerando o coeficiente de correlação de Pearson $r > 0,30$ ($p < 0,05$ corrigido FDR) para os dados de BOLD, pBOLD e CBF. O tamanho dos círculos está diretamente relacionado ao grau de conexões de cada região 70

Figura 4.26: Relação entre o comprimento médio do caminho (CMC) e o grau de conexões para regiões anatômicas consideradas como *hubs*, obtidas a partir de imagens (a) BOLD, (b) pBOLD e (c) CBF 72

Figura 4.27: Relação entre as forças da conectividade funcional (FC) obtidas a partir dos dados de pBOLD e BOLD para as cinco redes cerebrais de repouso investigadas 73

Figura 4.28: Relação entre as forças da conectividade funcional (FC) obtidas a partir dos dados de CBF e BOLD para as cinco redes cerebrais de repouso investigadas 74

Figura 4.29: Relação entre a força da conectividade funcional (FC) obtida a partir das séries temporais de CBF e os valores de CBF basal para a DMN 75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Diferenças entre ASL e BOLD 19

Tabela 1.2: Parâmetros de rede 27

Tabela 3.1: Parâmetros variados com a técnica de ASL pseudocontínua e pulsada 31

Tabela 4.1: Ocorrência das redes cerebrais de repouso utilizando a análise em grupo separada 51

Tabela 4.2: Ocorrência das redes cerebrais de repouso utilizando a análise em grupo separada para imagens BOLD com diferentes resoluções temporais 57

Tabela 4.3: Coeficientes de similaridade DICE entre as redes cerebrais de repouso obtidas por imagens BOLD com diferentes resoluções temporais 59

Tabela 4.4: Valores de grau (média e desvio padrão) para todas as regiões anatômicas estudadas 71

Tabela 4.5: Regiões cerebrais consideradas como *hubs*, por ter alto grau de conexões, coincidentes para os três tipos de imagens estudadas (BOLD, pBOLD e CBF) 71

Tabela 4.6: Valores dos parâmetros de conectividade, média (desvio padrão), calculados considerando todas das regiões de interesse definidas pelo atlas anatômico 76

LISTA DE ABREVIATURAS

ASL	*Arterial Spin Labeling*
BOLD	*Blood Oxygenation Level Dependent*
CASL	*Continuous Arterial Spin Labeling*
CBF	*Cerebral Blood Flow*
CBV	*Cerebral Blood Volume*
$CMRO_2$	*Cerebral Metabolic Rate of Oxygen*
CS_{DICE}	Coeficiente de Similaridade DICE
dHb	Hemoglobina desoxigenada
DMN	*Default Mode Network*
EEG	Eletroencefalograma
EPI	*Echo Planar Imaging*
EPISTAR	EPI and Signal Targeting with Alternative Radiofrequency
FCS	*Functional Connectivity Strength*
FDR	*False Discovery Rate*
FRH	Função de Resposta Hemodinâmica
FOV	*Field of View*
FWHM	*Full Width at Half Maximum*
GLM	*General Linear Model*
HCFMRP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
ICA	*Independent Component Analysis*
IRM	Imagens por Ressonância Magnética
IRMf	Imagens por Ressonância Magnética funcionais
MEG	Magnetoencefalograma
MNI	*Montreal Neurological Institute*
OEF	*Oxygen Extraction Fraction*
oxiHb	Hemoglobina oxigenada
PASL	*Pulsed Arterial Spin Labeling*
PCA	*Principal Component Analysis*
pCASL	*pseudocontinuous Arterial Spin Labeling*
PET	*Positron Emission Tomography*
PICA	*Parallel Independent Component Analysis*

PLD	*Post-Labeling Delay*
RBN	*Resting-state Brain Network*
ROI	*Region of Interest*
RM	Ressonância Magnética
RSR	Relação Sinal-Ruído
SPECT	*Single Photon Emission Computadorized Tomography*
T1	Tempo de Relaxação Longitudinal
T2	Tempo de Relaxação Transversal
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Tempo ao Eco
TI	Tempo de Inversão
TOF	*Time of Flight*
TR	Tempo de Repetição

LISTA DE SÍMBOLOS

$C(G)$	Coeficiente de clusterização
E_{global}	Eficiência global
E_{local}	Eficiência local
k_i	Grau do nó
L	Menor distância entre nós
M_0	Magnetização macroscópica inicial do tecido
m_a	Magnetização longitudinal arterial
M_t	Magnetização macroscópica do tecido
m_v	Magnetização longitudinal venosa
$P(k)$	Grau da distribuição
P_{custo}	Custo
$SI_{controle}$	Intensidade de sinal da imagem controle
$SI_{marcada}$	Intensidade de sinal da imagem marcada
$T_{1sangue}$	Tempo de relaxação longitudinal do sangue
T_{1t}	Tempo de relaxação longitudinal do tecido
T_{app}	Tempo de relaxação longitudinal aparente do tecido
α	Eficiência de marcação
Δ	Diferença de sinal
λ	Coeficiente de partição cérebro-sangue
σ	Medida de mundo pequeno
τ	Duração da marcação
ω	Tempo de atraso pós-marcação

SUMÁRIO

1. Fundamentação Teórica 1
1.1. Redes Cerebrais de Repouso 3
1.2. Contraste BOLD 6
1.3. Arterial Spin Labeling 10
1.3.1. ASL Pulsada 15
1.3.2. ASL Contínua 16
1.3.3. ASL Pseudocontínua 16
1.3.4. ASL e BOLD: Diferenças e Complementaridade 18
1.4. Análise das Imagens 20
1.4.1. Baseada em semente 21
1.4.2. Análise de Componentes Independentes 22
1.5. Conectividade Funcional por Teoria de Grafos..... 24
2. Objetivos 28
3. Metodologia 29
3.1. Participantes 29
3.2. Aspectos Éticos e Orientações 29
3.3. Aquisição das Imagens ..... .30
3.3.1. *Arterial Spin Labeling* pseudocontínua (pCASL) 30
3.3.2. *Arterial Spin Labeling* pulsada (PASL) 30
3.3.3. *Blood Oxygenation Level Dependent* (BOLD) 31
3.3.4. Imagens Anatômicas 31
3.4. Processamento e Análise dos Dados 32
3.4.1. Pré-processamento 32
3.4.2. Cálculo das Imagens de Perfusão 33
3.4.3. Cálculo dos Mapas de CBF 34
3.4.4. Cálculo das Imagens de pseudo-BOLD 35
3.4.5. Redes de Repouso 37
3.4.5.1. Análise das Componentes Independentes – Redes de Repouso ..37
3.4.5.2. Relação Sinal Ruído e Intensidade de Sinal 39
3.4.5.3. Análise Estatística 40
3.4.6. Conectividade Funcional por Teoria de Grafos 41

4. Resultados 43
4.1. Redes Cerebrais de Repouso 44
4.1.1. Análise em Grupo 44
4.1.1.1. Análise Conjunta 44
4.1.1.2. Análise Separada 48
4.1.2. Análise Individual 53
4.1.3. Resolução Temporal 56
4.1.4. Relação Sinal Ruído 59
4.1.5. Espectro do Sinal 61
4.2. Fluxo Sanguíneo Cerebral Basal 63
4.3. Conectividade Funcional e Grafos 68
5. Discussão 77
6. Conclusões 88
7. Referências Bibliográficas 90
I. ANEXOS 100

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O cérebro é o principal órgão do Sistema Nervoso Central e representa o ápice da complexidade humana em termos fisiológicos e funcionais. A existência de "redes" funcionais conectando regiões do cérebro para o desempenho de atividades é conhecida e tem sido alvo de vários estudos (JANN et al., 2015a; LIANG et al., 2013a; ZHU et al., 2013a). Tais redes compostas por neurônios, e devidamente irrigadas pelo sistema vascular, possuem "nós" de conectividade, que podem ser considerados como pequenas unidades cerebrais de comunicação (LIANG et al., 2013a).

As regiões cerebrais que constituem essas redes exibem um alto nível de metabolismo mesmo em repouso (BLONDEL et al., 2008). O metabolismo alto e, consequentemente, utilização de oxigênio e captação de glicose maiores, estão acompanhados pelo aumento do fluxo sanguíneo cerebral (CBF, *Cerebral Blood Flow*) nessas regiões. Esse importante mecanismo, denominado acoplamento neurovascular, é o responsável pelas mudanças locais no CBF em resposta às necessidades funcionais, de maneira que o fluxo aumenta em uma determinada região quando a atividade cerebral naquela região aumenta, controlando a entrega de substratos e a remoção de produtos metabólicos (IADECOLA; NEDERGAARD, 2007). Assim, o CBF regional pode ser usado no estudo do metabolismo cerebral tanto em repouso quanto na ativação induzida por alguma tarefa.

Neste contexto, as Imagens por Ressonância Magnética funcionais (IRMf), baseadas no contraste BOLD (*Blood Oxygenation Level Dependent*), surgiram como uma ferramenta útil e totalmente não invasiva para avaliação da atividade cerebral. Ao serem ativadas regiões cerebrais para a execução de tarefas, ocorre nestas um aumento do consumo de glicose e, então, um aumento regional de fluxo sanguíneo. Porém, a demanda por oxigênio permanece constante ou apresenta apenas pequenos acréscimos. Por isso, a fração de extração de oxigênio (OEF, *Oxygen Extraction Fraction*), que se trata de uma medida da diferença arterio-venosa entre a saturação de oxigênio nas hemoglobinas, tende a diminuir na região durante atividades. Como o sistema circulatório é eficaz, a oferta de CBF supera a demanda por oxigenação, de modo que tal excesso permite a detecção de um sinal. Portanto, através das flutuações do sinal BOLD, pode-se inferir áreas do cérebro ativadas durante a resposta a estímulos ou execução de tarefas (BUXTON, 2012,

2013; DETRE; WANG, 2002).

Existe, porém, um crescente interesse no estudo de um sistema de redes neurais que fica ativo durante o repouso, registrado com dados de Ressonância Magnética pela primeira vez por Greicius e colaboradores (GREICIUS et al., 2003a), que funciona apesar da ausência de estímulos ou tarefas, e parece competir com o sistema anterior – responsável pela atenção e execução de tarefas. Assim, com a IRMf e o indivíduo no estado de repouso, é possível identificar as redes cerebrais de repouso (RBN, *Resting-state Brain Networks*), que por vezes ocupam regiões cerebrais distintas, ligadas apenas pelo sincronismo funcional (LEE; SMYSER; SHIMONY, 2012).

Por ser uma técnica não invasiva e por não necessitar da cooperação do paciente para o exercício de tarefas, a IRMf em repouso é uma alternativa para o exame funcional de pacientes com dificuldades motoras e/ou cognitivas. Assim, ainda no início de seu desenvolvimento, suas aplicações são promissoras para diagnósticos, prognósticos de disfunções neuropsiquiátricas e planejamentos cirúrgicos para retirada de focos de epilepsia ou de tumores cerebrais.

Entretanto, as imagens baseadas no sinal BOLD, não fornecem informação quantitativa, mas diferenças relativas de perfusão, não permitindo a avaliação do CBF basal, sob normocapnia e repouso. Além disso, como variações na perfusão basal afetam o sinal BOLD (COHEN; UGURBIL; KIM, 2002) e como essa perfusão basal pode encontrar-se alterada em diferentes patologias (HARTKAMP et al., 2011; IADECOLA; DAVISSON, 2008a; MITSCHELEN et al., 2009a), é importante a utilização de uma técnica alternativa que permita a quantificação do CBF basal.

Nos últimos anos, a técnica de IRM denominada marcação dos spins arteriais (ASL, *Arterial Spin Labeling*) emergiu como uma ferramenta importante na obtenção de mapas quantitativos de perfusão (GOLAY; PETERSEN, 2007). ASL utiliza a água presente no sangue arterial como agente de contraste endógeno, oferecendo uma técnica completamente não invasiva, e se apresenta como um método quantitativo para medir CBF, que é superior em resoluções temporal e espacial quando comparado a outros métodos, como a Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET, *Pósitron Emission Tomography*) e a Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único (SPECT, *Single-Photon Emission Computed Tomography*) (PAIVA; TANNU, 2007; THOMAS et al., 2006; WINTERMARK et al., 2005).

Segundo Liang e colaboradores, a ASL além de possibilitar análises com a quantificação do CBF, abre horizontes para a avaliação do metabolismo regional, que está

diretamente relacionado ao fluxo sanguíneo, tanto no repouso como durante atividades estimuladas, possibilitando a obtenção de índices metabólicos, juntamente com a análise perfusional (LIANG et al., 2013a).

Estudos recentes em conectividade funcional mostram que os resultados obtidos com as técnicas BOLD e ASL são naturalmente complementares quando se deseja estudar a relação entre o fluxo sanguíneo e a topologia funcional do cérebro (JANN et al., 2015a; LIANG et al., 2013a; ZHU et al., 2013a). Estas informações oferecem o conhecimento da fisiologia cerebral das redes de repouso, além de sua organização funcional (JANN et al., 2015a). A combinação entre a boa resolução espacial dos mapas obtidos com as flutuações de sinal BOLD e as informações quantitativas obtidas com a ASL fornece uma abrangente caracterização cerebral das redes de repouso a respeito de sua localização e fisiologia. Essa caracterização mais completa é de especial interesse para estudos clínicos, longitudinais e farmacológicos.

Portanto, o presente estudo investigou a conectividade funcional cerebral no estado de repouso através de técnicas complementares de IRM. No presente capítulo, apresentaremos alguns aspectos teóricos que embasam o trabalho. No próximo capítulo, estão apresentados os objetivos específicos do estudo. A metodologia empregada, os resultados obtidos e a discussão desses resultados estão apresentados nos Capítulos 3, 4 e 5, respectivamente.

1.1. Redes Cerebrais de Repouso

O estado basal de funcionamento do cérebro chama atenção dos pesquisadores em neurociência, desde que se conhece que a alta demanda metabólica não apresenta grandes variações de consumo energético durante a execução de testes com aplicação de tarefas ou estímulos. Segundo Raichle e Gusnard, define-se como estado basal a ausência de “atividade” como é vista no contexto de imagens funcionais. Ou seja, fisiologicamente trata-se de um aumento de fluxo sanguíneo, não acompanhado por um aumento mensurável do consumo de oxigênio local (GUSNARD; RAICHLE, 2001).

Atribui-se grande parte da demanda energética cerebral aos processos metabólicos de transmissão de sinapses. Fatores hemodinâmicos como o fluxo e o volume sanguíneos, porém, apresentam maiores variações durante a execução de tarefas, sendo, por isso, largamente estudados, bem como a sua relação com o metabolismo basal a fim de melhor entender os mecanismos fisiológicos de funcionamento do cérebro (GUSNARD;

RAICHLE, 2001; MAGISTRETTI; PELLERIN, 1999).

Neste propósito, surgem os métodos de imagem relacionados a parâmetros físicos e fisiológicos, como PET, relacionada ao metabolismo celular; IRMf, sensível às variações hemodinâmicas e composição molecular; eletroencefalograma (EEG) e magnetoencefalograma (MEG), sensíveis aos impulsos eletromagnéticos responsáveis pelos potenciais de ação (LOGOTHETIS et al., 2001; MAGISTRETTI; PELLERIN, 1999; RAICHLE, 1998).

Através de estudos com PET, um conjunto de regiões funcionalmente conectadas, presentes no córtex cingulado posterior/precúneo, córtex pré-frontal medial, lóbulo parietal inferior bilateral, e giro temporal inferior, foi identificado (RAICHLE et al., 2001). Esse conjunto de regiões, denominado de Rede de Modo Padrão (DMN, *Default Mode Network*) apresenta maior atividade neuronal e consumo energético no estado de repouso em comparação à execução de tarefas (DI; BISWAL, 2014).

Raichle descreve em seu estudo com voluntários saudáveis, acordados, de olhos fechados, que a atividade desta rede é favorecida durante o estado de repouso do indivíduo, enquanto decresce com o desempenho de tarefas cognitivas (Figura 1.1). Sendo assim, a DMN estaria positivamente relacionada à dinâmica de introspecção, auto referência dos indivíduos, e à localização biológica dos membros do corpo, conforme evidenciado posteriormente por outros estudos (CASTELLI et al., 2000; GUSNARD; RAICHLE, 2001).

A definição das redes de repouso é análoga à das redes funcionais convencionais, seguindo a mesma definição de Friston: regiões espacialmente separadas que apresentam flutuações síncronas de sinal, ou seja, mesma frequência de funcionamento (FRISTON, 1994), porém ativas no estado de repouso. Por não exigir a aplicação de tarefas moduladas, recebimento de estímulos ou qualquer teste funcional propriamente, diz-se que se trata de flutuações espontâneas cerebrais. Sendo assim, a sincronia de operação de diferentes regiões passa a ser vista não apenas por uma aplicação de estímulo ou tarefa, mas pelo próprio funcionamento basal do cérebro.

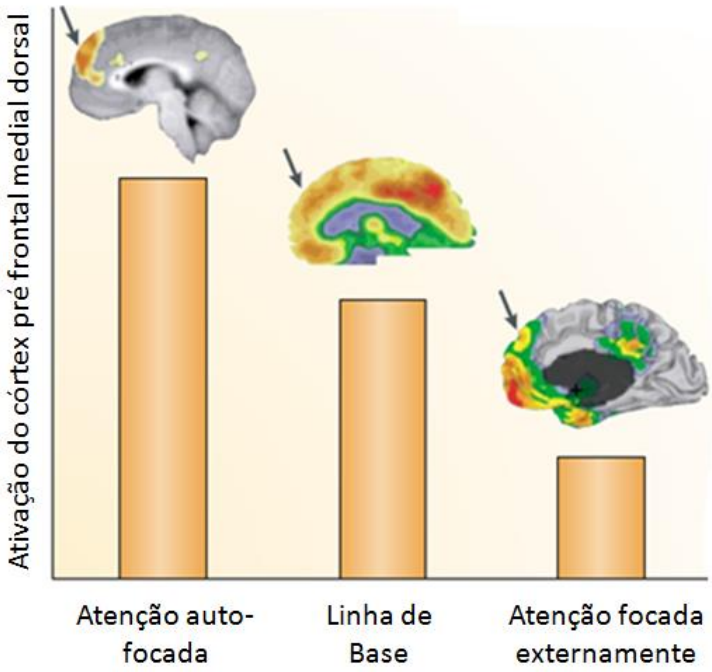


Figura 1.1: Dinâmica de atividade do córtex pré-frontal medial. Figura adaptada de Raichle et al., 2001).

As flutuações espontâneas podem ser observadas durante o repouso do indivíduo acordado, ou mesmo durante uma tarefa em estado constante, apresentando correlação das flutuações dentro das regiões de uma rede e anticorrelações entre redes (BECKMANN et al., 2005a; FOX et al., 2005; NEWTON et al., 2011). Tais flutuações espontâneas são de baixa frequência no intervalo de flutuações funcionais comuns, entre 0,01 e 0,1 Hz. Em 2002, Goldman e colaboradores demonstrou que oscilações alfa obtidas por EEG e IRMf estão correlacionadas, apontando para a origem neuronal das flutuações espontâneas encontradas com IRMf (BECKMANN et al., 2005a; GOLDMAN et al., 2002).

O primeiro a identificar as flutuações síncronas de sinal no estado de repouso por IRMf foi Biswal e colaboradores (BISWAL et al., 1995a). Neste estudo, observou-se que em regiões opostas dos lóbulos parietais havia flutuações de mesma frequência, apontando para uma região análoga à da rede motora, porém no desempenho de outras funções.

Alguns anos depois, Greicius e colaboradores investigaram uma rede cerebral constituída por regiões do córtex cingulado posterior e córtex cingulado ventral anterior, ativada apenas durante o repouso, o que foi chamado de hipótese do modo padrão. Assim,

a rede recebeu o nome de Rede de Modo Padrão (DMN) (GREICIUS et al., 2003b). Com exceção da DMN, as redes de repouso que se conhece possuem uma rede correspondente ativa durante a execução de tarefas ou aplicação de estímulos, como por exemplo, redes visual, auditiva e atentiva.

A ideia de trabalhar com redes de repouso tem como principal motivação a compreensão da demanda metabólica cerebral e seu funcionamento. Apesar de apresentar menores percentuais de variação de sinal em comparação às imagens com aplicação de tarefas e estímulos, por se tratar de um sinal inerente à linha base, as imagens funcionais em repouso têm sido utilizadas com êxito para estudos de conectividade, e variações regionais da hemodinâmica cerebral (FOX; GREICIUS, 2010).

O conhecimento das redes de repouso encontradas principalmente por IRM revelou fundamental importância para a compreensão neurofisiológica da dinâmica cerebral bem como a relação com sua estrutura, detentora de propriedades semelhantemente complexas (BULLMORE et al., 2009).

Das aplicabilidades clínicas, as redes de repouso são de grande interesse por não exigirem colaboração do paciente, muitas vezes inviabilizado de movimentos, fala ou cognição, o que dificulta a execução de tarefas. Além disso, as imagens no estado de repouso dispensam qualquer aparato experimental. Por estes fatores os estudos do estado basal do cérebro têm obtido destaque na literatura científica, tanto com voluntários saudáveis, quanto em pacientes (FOX; GREICIUS, 2010; LEE; SMYSER; SHIMONY, 2013).

Em IRM o método convencionalmente utilizado para identificar as redes cerebrais de repouso e avaliar a conectividade funcional é o baseado no contraste BOLD. Na próxima seção, abordaremos os aspectos teóricos deste tipo de contraste.

1.2. CONTRASTE BOLD

O grande e rápido avanço do estudo do cérebro nas últimas décadas aconteceu, em grande parte, pela descoberta de que mudanças no metabolismo cerebral afetam o sinal local de certos tipos de IRM, promovendo, assim, um mecanismo endógeno para detecção da atividade cerebral, baseado no nível de oxigenação do sangue.

O primeiro passo para a descoberta do contraste BOLD, no início dos anos 90, foi o estudo do químico Linus Pauling, que, em 1936, demonstrou que a hemoglobina apresenta diferentes propriedades magnéticas dependendo de sua oxigenação. Quando

ligada a uma molécula de oxigênio (oxiHb, oxihemoglobina), a hemoglobina se comporta de forma diamagnética, ou seja, seu momento magnético é igual a zero. Já quando não está ligada ao oxigênio (dHb, deoxihemoglobina), ela se torna paramagnética, apresentando momento magnético significativo. Portanto, a susceptibilidade magnética é aumentada em cerca de 20% quando comparada à hemoglobina oxigenada (BELLIVEAU et al., 1991).

Quando colocamos um objeto com susceptibilidade magnética diferente de zero na presença de um campo magnético, ocorre uma defasagem de seus spins, resultando em decaimento da magnetização transversal. Assim, é possível concluir que as IRM ponderadas no tempo de relaxação transversal (T2) são sensíveis à oxigenação sanguínea. Essa premissa foi demonstrada experimentalmente por Thulborn e colaboradores no início dos anos 80 (THULBORN et al., 1982).

Alguns anos depois, Ogawa e colaboradores hipotetizaram que ao manipular a proporção de oxigênio sanguíneo, a visibilidade dos vasos seria alterada em IRM ponderadas em T2*. Em seus experimentos notaram que quanto menor a quantidade de oxigênio inalada, maior a visibilidade de linhas escuras em imagens adquiridas por sequências do tipo eco de gradientes. Concluíram, então, que as finas linhas deveriam ser vasos que, preenchidos por maior quantidade de dHb, apresentavam maior susceptibilidade magnética e portanto maior distorção no campo local, diminuindo o sinal de ressonância magnética (OGAWA et al., 1990).

No mesmo estudo, foi realizada uma série de experimentos *in vitro* para comparar as imagens de sangue oxigenado e desoxigenado, obtidas por sequências eco de spins e eco de gradientes. Observou-se uma diminuição significativa de sinal nas imagens de sangue desoxigenado obtidas por uma sequência eco de gradientes (OGAWA et al., 1990).

A partir desse estudo, estava demonstrado um mecanismo de contraste endógeno que refletia o nível de oxigenação do sangue. Assim, especulou-se se tais achados, que posteriormente seriam chamados de contraste BOLD, poderiam viabilizar medidas funcionais não invasivas da atividade cerebral.

Neste contexto, duas hipóteses, não excludentes, foram formuladas para explicar o contraste BOLD. Na primeira, a atividade neuronal geraria um aumento na demanda metabólica e, portanto, um aumento no consumo de oxigênio, aumentando então a quantidade de dHb. A segunda hipótese levava em consideração o aumento do CBF sem aumento considerável do consumo de oxigênio, o que diminuiria a quantidade de dHb.

Na tentativa de esclarecer se e como a atividade cerebral estava relacionada a alterações do contraste BOLD, Ogawa e colaboradores manipularam a inalação de gases em ratos com diferentes níveis de anestesia, monitorando a atividade cerebral por EEG. Verificaram, então, que quanto mais anestesiados estavam os ratos, menor era a alteração do contraste, indicando que a demanda metabólica é pré-requisito para o contraste BOLD. Já buscando avaliar o efeito do fluxo sanguíneo, compararam duas condições: inalação de 100% de oxigênio, e inalação de 90% de oxigênio com 10% de CO_2. Considerando que o CO_2 é um agente vasodilatador, há aumento do CBF global sem aumento da demanda metabólica, e a dHb é diluída no sistema venoso, diminuindo o contraste BOLD (OGAWA; LEE, 1990).

Assim, embora pareça claro que o aumento da atividade neural leva a um aumento de consumo de oxigênio, aumento da dHb e, portanto uma diminuição do sinal BOLD, os experimentos mostram um aumento do sinal BOLD relacionado à atividade neural. Este aumento observado é devido ao aumento do CBF que compensa a diminuição do oxigênio local (FOX et al., 1986). A causa dessa desproporcionalidade do aumento do fluxo sanguíneo em relação ao consumo de oxigênio ainda não está bem elucidada. Uma das hipóteses é que a extração de oxigênio atinge as necessidades metabólicas e o excesso de oxigênio presente no sangue é uma forma de compensar a ineficiência de sua difusão passiva quando sob influência de altas taxas de fluxo (WONG; BUXTON; FRANK, 1997).

Em resumo, o contraste BOLD trata-se de um contraste endógeno do próprio corpo humano, baseado na diferença de susceptibilidade magnética das moléculas de hemoglobina ligadas ou não ao oxigênio. Com a atividade neural local, há demanda de oxigênio, que é fornecido pelo sistema cardiovascular por meio de aumento local de CBF. Como esse aumento é maior do que o necessário, há diminuição da razão entre as quantidade locais de dHb e oxiHb, resultando em um aumento de sinal em IRM ponderada em T2* (OGAWA et al., 1990).

A evolução temporal do sinal BOLD em resposta a um estímulo de curta duração é conhecida como Função da Resposta Hemodinâmica (FRH) (Figura 1.2). Logo após a apresentação do estímulo (Figura 1.2A), há um aumento do consumo local de oxigênio, levando a um rápido decréscimo da resposta (Figura 1.2B), denominado, em inglês, de *initial dip*. Entretanto, esse decréscimo não é observado consistentemente em todo tipo de tarefa. Após a depressão do sinal, a resposta inicia uma etapa de sinal positivo (Figura 1.2C), atingindo um máximo usualmente após 7 a 10 s (Figura 1.2D). A duração da

resposta nesse platô máximo dependerá da duração da tarefa executada. Então, há um decréscimo da resposta (Figura 1.2E), seguido por uma nova depressão do sinal, negativo em relação à linha de base (*undershoot*, Figura 1.2 F), devido ao escoamento de sangue pelo sistema venoso. Por fim, o sinal retorna aos valores comparáveis aos da linha de base inicial (Figura 1.2G) (BUXTON, 2012, 2013).

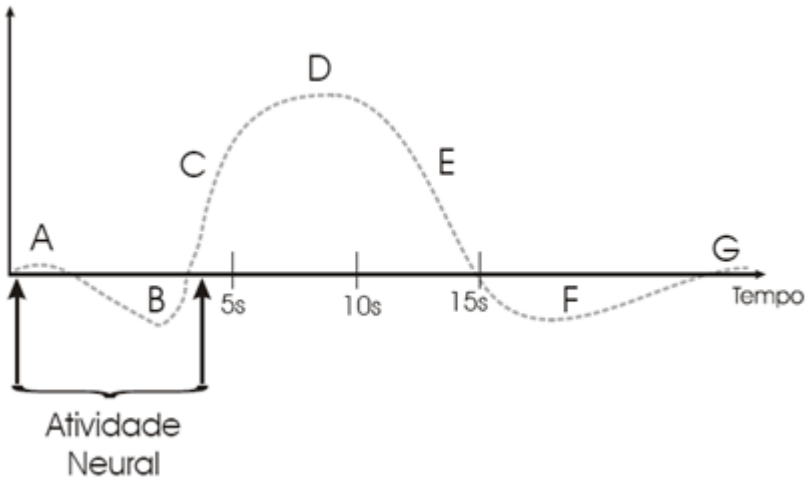


Figura 1.2: Diagrama ilustrativo da função da resposta hemodinâmica a uma atividade neural de curta duração. Algumas fases compõem o sinal: (A) linha de base, (B) BOLD negativo inicial (*initial dip*), (C) BOLD positivo crescente, (D) pico da resposta, (E) BOLD positivo decrescente, (F) BOLD negativo (*undershoot*), (G) retorno à linha de base.

A resposta hemodinâmica é influenciada por três fatores fisiológicos principais: CBF, volume sanguíneo cerebral (CBV, *Cerebral Blood Volume*) e taxa de consumo de oxigênio ($CMRO_2$, *Cerebral Metabolic Rate of Oxygen*). A relação entre eles não está completamente elucidada, principalmente nos casos de patologias neurológicas (CHEN; JANN; WANG, 2015; FEDERSPIEL et al., 2006).

Assim, o método BOLD-IRMf apresenta contraste relativo, gerando imagens funcionais semi-quantitativas, ou seja, com valores da resposta hemodinâmica dados em porcentagem de variação de sinal em relação à linha de base. Portanto, imagens BOLD não fornecem diretamente valores de parâmetros fisiológicos específicos. É possível, porém, realizar uma calibração das imagens BOLD para obtenção dos valores de $CMRO_2$,

por exemplo, uma vez medido o CBF concomitantemente, pela técnica de ASL (BUXTON, 2013).

Devido ao sinal BOLD ser proveniente de vênulas, há uma baixa especificidade espacial em relação à atividade neural. Porém, por sua boa relação sinal ruído (RSR), a IRMf tem sido extensivamente empregada em estudos funcionais, com ou sem execução de tarefas específicas (DETRE; WANG, 2002).

As imagens funcionais BOLD, como qualquer tipo de sinal que se avalia ao longo do tempo, necessitam possuir resolução temporal adequada para não apresentarem artefatos devido à baixa frequência de amostragem, como o aparecimento de sinais com a frequência alterada, o que compromete a veracidade da amostra por informações falsas que não representam a realidade, ou mesmo na transformação de um sinal modulado em ruído, sem frequência identificável (MISHALI; ELDAR, 2010).

O processo de aquisição de IRM, diferentemente do que ocorre com Raios-X ou imagens PET, é feito ao longo de um maior espaço de tempo. Para acelerar o processo de aquisição das IRM, desenvolveram sequência de pulsos com leitura eco planar (EPI, *Echo Planar Imaging*), as quais são a primeira opção quando se trata de imagens BOLD (DELAPAZ, 1994; ZELLER et al., 2013)

Por utilizar uma sequência combinada de eco de gradientes, as sequências do tipo EPI são mais rápidas, permitindo a aquisição de um volume de imagens, cobrindo todo o cérebro, em cerca de 1 a 2 segundos, para equipamentos de ressonância magnética (RM) clínicos de 3T (ZELLER et al., 2013). Além disso, as imagens adquiridas possuem ponderação de sinal em T2*, sendo sensíveis ao contraste BOLD.

Entretanto, apesar de todas as vantagens, as IRMf baseadas no contraste BOLD apresentam baixa especificidade espacial em relação à atividade neural e são influenciadas por diferentes fatores fisiológicos (CBF, CBV e $CMRO_2$). Portanto, é de grande interesse científico e clínico, a utilização de um método não invasivo e quantitativo que permita o estudo funcional do cérebro.

1.3. ARTERIAL SPIN LABELING

Nos últimos anos, a técnica de IRM denominada marcação dos spins arteriais (ASL, *Arterial Spin Labelling*) emergiu como uma ferramenta não invasiva importante na avaliação da perfusão cerebral, por meio da obtenção de mapas quantitativos de CBF (GOLAY; PETERSEN, 2007).

O CBF indica a quantidade de sangue que irriga um determinado volume de tecido cerebral por unidade de tempo e é comumente expressado em $mL.100g^{-1}.min^{-1}$. Sua obtenção é feita a partir da análise da cinética de um traçador, enquanto esse perfunde o tecido cerebral, no nível dos capilares. Portanto, para quantificar o CBF, são necessários um agente de contraste, uma técnica para a detecção da variação do sinal no tecido devido a esse agente, e um modelo que descreva o comportamento do agente de contraste permitindo estimar o CBF.

Há dois tipos de traçadores para esse fim, intravasculares e difusíveis. Atualmente, o método convencional de IRM para quantificação de CBF na rotina clínica, é o contraste de susceptibilidade dinâmico (DSC, *Dynamic Susceptibility Contrast*), que utiliza um agente de contraste intravascular, o gadolínio (CALAMANTE et al., 1999; JAHNG et al., 2014). Esse traçador não atravessa a barreira hemato-encefálica quando ela está intacta, permanecendo nos vasos sanguíneos, e alterando o sinal de RM de tecidos próximos a esses vasos.

Por outro lado, a ASL utiliza a água presente no sangue arterial como agente de contraste endógeno, difusível, oferecendo uma técnica completamente não invasiva para quantificação do CBF. Seu princípio baseia-se na diferenciação entre spins fluindo com sangue marcado por pulsos de radiofrequência e os spins estacionários no tecido cerebral. À medida que os spins marcados atingem os capilares e realizam trocas com o tecido pela barreira hemato-encefálica, a magnetização do tecido é alterada, sendo possível obter imagens cujo contraste é proporcional à perfusão (BARBIER; LAMALLE; DÉCORPS, 2001).

Em ASL, as imagens são adquiridas distalmente ao local da marcação após o sangue marcado fluir até o tecido alvo. Essas imagens são alternadas com imagens controles em que a marcação não é aplicada (Figura 1.3). Assim, a diferença de sinal entre imagens marcadas e controles é proporcional ao sangue entregue na fatia adquirida (AGUIRRE; DETRE, 2002).

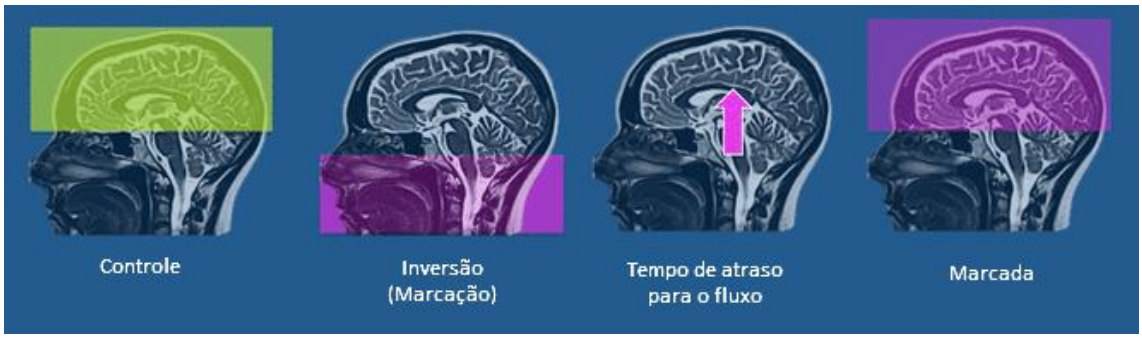


Figura 1.3: Representação das regiões envolvidas em cada etapa do processo de obtenção do par controle-marcado, pela técnica de ASL pulsada. Figura adaptada de: (http://mri-q.com/what-is-asl.html, acesso em 24/01/2017).

A Figura 1.4 apresenta um diagrama representativo da dinâmica dos spins geradores de sinal. Quando a imagem controle é adquirida (primeiro quadro, à esquerda), sem a aplicação de pulsos de marcação, todos os spins do meio estarão sob o efeito do campo magnético externo. No diagrama representamos apenas aqueles spins que estão em excesso, alinhados paralelamente ao campo externo, responsáveis pelo sinal resultante. Durante a circulação sanguínea os spins intravasculares serão substituídos, após o tempo de atraso (representado na Figura 1.3) por aqueles vindos da região inferior, onde houve a marcação (inversão dos spins; segundo quadro da Figura 1.4). O resultado da subtração entre as duas imagens está representado no terceiro quadro, em que os spins não marcados e, portanto com a mesma orientação nas duas imagens, se cancelam, enquanto que os spins de magnetização oposta têm sinal somado promovendo um sinal resultante nas regiões perfundidas.

A partir da imagem de perfusão (diferença de sinal, Δ), calcula-se o mapa de CBF, que depende de uma função de T_1, da fração de partição entre tecido e água presente no sangue, da duração e da eficiência da marcação, e do tempo de atraso para chegada dos spins marcados.

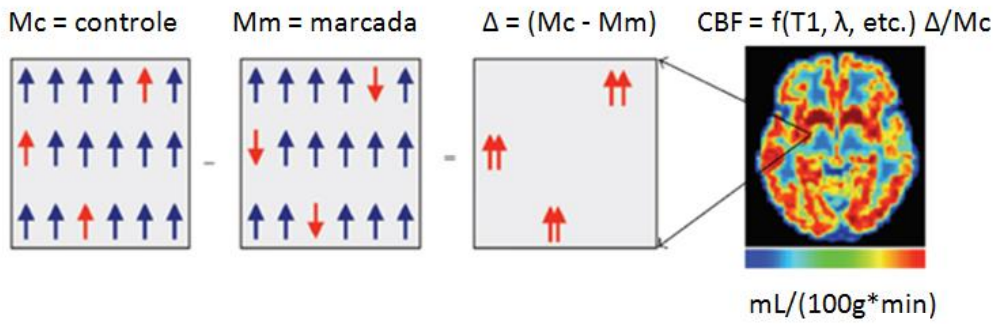


Figura 1.4: Representação esquemática dos spins fornecedores de sinal em um *voxel* para o cálculo dos mapas de Perfusão (Δ) e de CBF. Figura adaptada de: (BOROGOVAC; ASLLANI, 2012)

Como em IRM a magnetização de um sistema de spins sob ação de um campo magnético é descrita pela equação de Bloch (BLOCH, 1946), esta pode ser modificada para incluir os efeitos do fluxo sanguíneo. Assim, a evolução da magnetização longitudinal na fatia da imagem pode ser descrita por (DETRE et al., 1992):

$$\frac{dM_t(t)}{dt} = \frac{M_t^0 - M_t(t)}{T_{1t}} + CBF[m_a(t) - m_v(t)] \quad [1.1]$$

Em que M_t é a magnetização longitudinal (por grama de tecido); M_t^0 é a magnetização longitudinal no equilíbrio; T_{1t} é o tempo de relaxação longitudinal do tecido; m_a e m_v são as magnetizações longitudinais (por mL de sangue) arterial e venosa, respectivamente.

Considerando o coeficiente de partição tecido-sangue para a água (λ), que relaciona as magnetizações do tecido e do sangue, e a troca total entre a água do tecido e a do sangue, a equação acima pode ser reescrita como:

$$\frac{dM_t(t)}{dt} = \frac{M_t^0 - M_t(t)}{T_{1app}} - 2\alpha(t)\frac{CBF}{\lambda}M_t^0 \quad [1.2]$$

Em que T_{1app} é o tempo de relaxação longitudinal aparente para a água presente no tecido no caso em que existe perfusão, e α é a eficiência da marcação.

O contraste nas imagens de perfusão depende essencialmente da eficiência da marcação e do T1 do sangue (DETRE; WANG, 2002). A primeira está relacionada à fração de spins no sangue arterial, presentes na região de marcação, que são invertidos pelo pulso de radiofrequência. Ela depende do método de marcação, e influencia na quantificação do CBF.

Existem três métodos principais da técnica ASL, que diferem fundamentalmente pelo modo como é aplicado o pulso de marcação dos spins: pulsado, contínuo e pseudocontínuo. Esses métodos serão discutidos posteriormente.

Além disso, após a marcação, os spins levam um tempo para fluírem da região de marcação até a região de interesse. Durante esse tempo, há perda de magnetização devido à relaxação longitudinal T_1. Essa redução de sinal também deve ser levada em conta na quantificação do CBF.

Assim, com as imagens adquiridas e os modelos de quantificação obtidos a partir da equação 1.2, calcula-se o mapa de CBF basal. Por apresentarem RSR baixa, vários pares de imagens controle/marcada são adquiridos a fim de se obter um mapa médio de CBF com boa RSR e bom contraste entre as substâncias branca e cinzenta. Assim, esses mapas são utilizados em estudos visando entender melhor a perfusão do cérebro saudável e suas alterações na presença de neuropatologias.

Entretanto, os estudos do funcionamento basal do cérebro de indivíduos saudáveis por ASL também têm sido impulsionados, visto que é uma técnica que fornece imagens funcionais e não necessita da administração de contraste, assim como a técnica BOLD, não oferecendo riscos aos voluntários. A técnica de ASL tem se mostrado eficiente em trabalhos que exploram a dinâmica cerebral, gerando dados de conectividade funcional com a vantagem de fornecer mapas quantitativos que descrevem a fisiologia das redes cerebrais, tanto em repouso, como em atividade (CHEN, Y et al., 2011; LEE; SMYSER; SHIMONY, 2013; MACINTOSH et al., 2010).

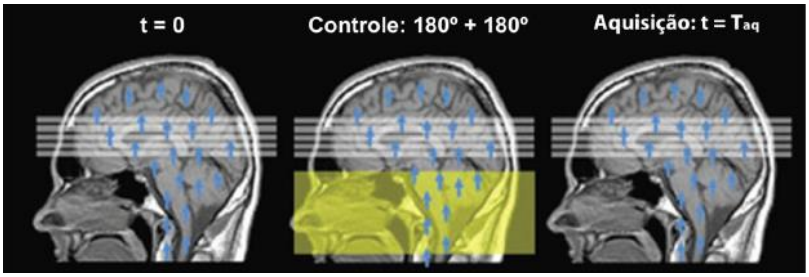
Além de possibilitar análises com a quantificação do CBF, a ASL abre horizontes para a avaliação do metabolismo regional, o qual está diretamente relacionado ao fluxo sanguíneo, tanto no repouso como durante atividades estimuladas, o que possibilita a obtenção de índices metabólicos, juntamente com a análise perfusional (LIANG et al., 2013b).

1.3.1. ASL PULSADA

A técnica de ASL no modo pulsado (PASL, *Pulsed ASL*) caracteriza-se pela aplicação de um único pulso curto para marcação dos spins, em uma região volumétrica grande localizada poucos centímetros abaixo da área de leitura do sinal. A ideia desta técnica é que uma vez marcada uma grande região, o volume sanguíneo arterial fluirá pelas vias vasculares e chegará à região de interesse com uma mesma perda de magnetização ao longo de todo o volume marcado, dependendo das condições cardiovasculares do paciente (BARBIER; LAMALLE; DÉCORPS, 2001; CALAMANTE et al., 1999).

Na Figura 1.5, está esquematizada a aplicação dos pulsos de radiofrequência para uma sequência PASL, a EPISTAR (*Echo Planar Imaging and Signal Targeting with Alternative Radiofrequency*), em que se aplicam dois pulsos de 180° na região de marcação para o caso das imagens controles. Já para a aquisição das imagens marcadas, apenas um pulso de 180° é aplicado para inverter os spins presente na região de marcação (PETERSEN et al., 2006). A aquisição das imagens é feita após um tempo da inversão dos spins, chamado de atraso pós-marcação (PLD, *Post-labeling Delay*) ou tempo de inversão (TI), que também é respeitado para as imagens controle, com o propósito de garantir as mesmas condições entre as duas aquisições.

a)



b)

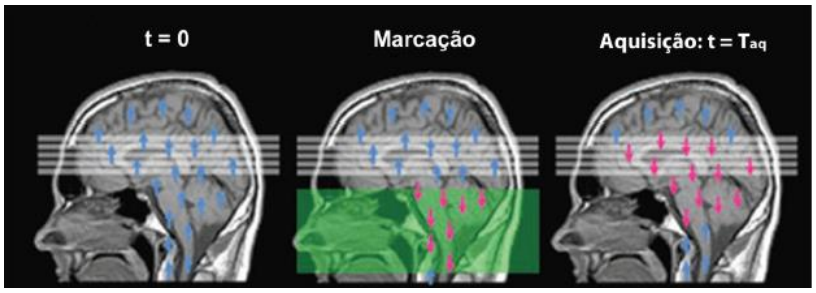


Figura 1.5: Representação da aquisição das imagens (a) controle e (b) marcada. Figura adaptada de: (PETERSEN; LIM; GOLAY, 2006).

1.3.2. ASL CONTÍNUA

No modo contínuo (CASL), o sangue fluindo para o cérebro é continuamente marcado até que um estado estacionário seja atingido (ALSOP; DETRE, 1998). Em 1992, Williams e colaboradores propuseram um método de inversão baseado na técnica conhecida por *flow-driven adiabatic fast passage*, em que os spins no sangue arterial, movendo-se através de um gradiente de campo magnético, são invertidos adiabaticamente por um pulso de radiofrequência (WILLIAMS et al., 1992). Se o pulso for longo, da ordem de alguns segundos, os spins da água presente no sangue arterial serão invertidos durante o período de aplicação do pulso e um estado estacionário relacionado ao fluxo será atingido. Nesse caso, a eficiência da marcação será máxima, ou seja, igual a 1. Entretanto, devido à relaxação longitudinal que ocorre durante o tempo de trânsito dos spins entre os planos de marcação e da imagem, parte da marcação é perdida.

Entretanto, a aplicação de um pulso de radiofrequência longo, fora da ressonância, causa saturação das macromoléculas do tecido cerebral, que trocam magnetização com a água livre presente no tecido, reduzindo o sinal no plano de marcação. Para eliminar os efeitos de transferência de magnetização, foi proposta a utilização de uma bobina dedica à marcação, posicionada no pescoço do indivíduo, para que o pulso não atinja o plano da imagem (DETRE et al., 1992; SILVA et al., 1995). Porém, nesse caso há necessidade de hardware adicional nem sempre disponível. Além disso, para realizar a marcação e a leitura das imagens com apenas uma bobina de cabeça este método gera uma deposição de energia próxima à região dos olhos podendo causar aquecimento local, e por conseguinte desconforto ao paciente. A fim de fugir destas complicações método pseudo-contínuo foi desenvolvido.

1.3.3. ASL PSEUDOCONTÍNUA

O modo pseudocontínuo (pCASL) caracteriza-se por uma combinação das vantagens dos modos contínuo e pulsado, ou seja, alta RSR e alta eficiência de marcação, sem a necessidade de uma bobina dedicada à marcação (DAI et al., 2008).

Para isso, um trem de pulsos de radiofrequência curtos (~ 1 ms) e gradientes de campo sincronizados são utilizados para inverter os spins do sangue arterial fluindo através do plano de marcação (Figura 1.6A). Pulsos seletivos do tipo Hanning podem ser aplicados com igual espaçamento e um estado estacionário similar ao de CASL pode ser

atingido com menos restrições técnicas (NEZAMZADEH et al., 2010).

Como os pulsos são curtos comparados ao tempo de relaxação do sangue arterial, perturbações causadas pelo trem de pulsos são basicamente as mesmas daquelas causadas por um pulso de marcação longo (WONG, 2013). Além disso, pCASL fornece menos deposição de potência e menos efeitos de transferência de magnetização quando comparada à CASL. Entretanto, ela pode ser suscetível a inomogeneidades do campo magnético estático (WU et al., 2007).

A Figura 1.6B mostra um esquema temporal da aplicação dos pulsos de radiofrequência e aquisição das imagens. Inicialmente, aplica-se um trem de pulsos de marcação, por um período comumente chamado de duração da marcação, diferindo do pulso único aplicado PASL. Após um tempo de espera pós-marcação (PLD), sangue marcado chega à região de interesse e realiza-se a leitura do sinal (ALSOP et al., 2015; WONG; BUXTON; FRANK, 1998).

Estudos recentes têm reportado quantificações de CBF consistentes com pCASL, e valores regionais médios concordantes com aqueles obtidos por outras técnicas, como PET (CHEN; WANG; DETRE, 2011; GUOFAN et al., 2009). Além disso, pCASL fornece dados com alta reprodutibilidade mesmo com longos períodos entre as aquisições (CHEN; WANG; DETRE, 2011; GEVERS et al., 2011; WU et al., 2014), que pode ser melhorada por meio de correções para sensibilidade da bobina e eficiência de marcação (WU et al., 2011).

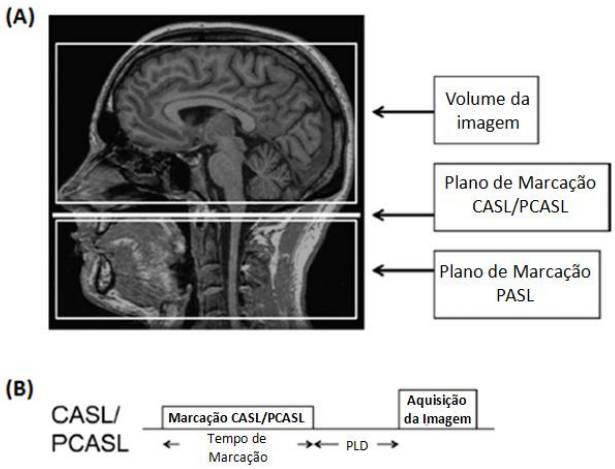


Figura 1.6: (A) Representação das regiões de marcação e aquisição das imagens para os três principais métodos de ASL. (B) Diagrama esquemático da aplicação dos pulsos e aquisição da imagem para os métodos contínuo (CASL) e pseudocontínuo (pCASL). Figura adaptada de: (ALSOP et al., 2015).

1.3.4. ASL E BOLD: DIFERENÇAS E COMPLEMENTARIDADE

As diferenças elementares entre BOLD e ASL como técnicas funcionais surgem da flexibilidade de parâmetros em que se pode basear o contraste das IRM. Ambas são técnicas não invasivas, que não necessitam da administração de contraste exógeno via fármacos. Porém, enquanto a BOLD detém-se às variações de sinal promovidas pela própria hemodinâmica, de forma completa, a técnica de ASL é mais seletiva e detém-se ao fluxo sanguíneo cerebral.

Devido à natureza dos sinais, ocorre também uma diferença de localização dos spins no sistema vascular. Nas imagens BOLD, os spins que geram o contraste encontram-se nos grandes vasos, onde a direção do fluxo é praticamente constante e a contribuição das moléculas de oxihemoglobina se soma (BUXTON, 2012, 2013; DETRE; WANG, 2002). Já nas imagens de ASL, durante a leitura de sinal, os spins marcados já chegaram aos capilares e permearam a barreira hemato-encefálica, onde interagem magneticamente com os spins estáticos, enquanto ocorrem as trocas gasosas (LEONI, 2011). Além disso, outra diferença importante está na necessidade de aquisição de duas imagens para o método de ASL, diminuindo a resolução temporal e a RSR das imagens. Estas e demais comparações estão sintetizadas na Tabela 1.1, adaptada de (DETRE; WANG, 2002).

As imagens baseadas no sinal BOLD, apesar de serem a técnica convencional para IRMf sem contraste aplicado, não fornecem informação quantitativa, mas diferenças relativas a uma linha de base. Além disso, como variações na perfusão basal afetam o sinal BOLD (COHEN; UGURBIL; KIM, 2002) e como essa perfusão basal pode encontrar-se alterada em diferentes patologias, como nas doenças cerebrovasculares (HARTKAMP; BOKKERS, 2011; IADECOLA; DAVISSON, 2008b; MITSCHELEN et al., 2009b), é importante a utilização de uma técnica alternativa que permita a quantificação do CBF basal, como é o caso da ASL.

Estudos recentes em conectividade funcional mostram que os resultados obtidos com as técnicas BOLD e ASL são naturalmente complementares quando se deseja estudar a relação entre o fluxo sanguíneo e a topologia funcional cerebral (JANN et al., 2015b; LIANG et al., 2013b; ZHU et al., 2013b). Estas informações oferecem o conhecimento da fisiologia cerebral das redes de repouso, além de sua organização funcional (JANN et al., 2015a). A combinação entre a boa resolução espacial dos mapas obtidos com as flutuações de sinal BOLD e as informações quantitativas obtidas com a ASL fornece uma

abrangente caracterização cerebral das RBNs a respeito de sua localização e fisiologia. Essa caracterização mais completa é de especial interesse para estudos longitudinais, estudos farmacológicos, e também para análise das RBNs em diferentes grupos de pacientes (JANN et al., 2015b; LIANG et al., 2013b).

Tabela 1.1: Diferenças entre ASL e BOLD.

	ASL	**BOLD**
Mecanismo do sinal	Fluxo sanguíneo	Fluxo sanguíneo Volume sanguíneo Consumo de oxigênio
Parâmetro de Contraste	T1	T2*
Variação de Sinal	< 1%	0,5 a 5%
Método de Aquisição	Eco de gradiente	Eco de gradiente
Taxa de Amostragem (TR)	3 a 8 s, por mapa.	1 a 3 s, por volume
RSR	Baixa	Alta
Variabilidade entre sujeitos	Baixa	Alta
Cobertura	Maior parte do córtex	Todo o encéfalo
Artefatos	Artefatos vasculares, artefatos de movimento.	Susceptibilidade magnética, movimento e deslocamento da linha de base.

1.4. ANÁLISE DAS IMAGENS

Os métodos de análises de imagens funcionais são diversos, dentre os mais usados temos: Método das Sementes, GLM (*General Linear Model*), PCA (*Principal Component Analysis*), ICA, pICA (*Paralell Independent Component Analysis*), entre outros. Trata-se de diferentes formulações matemáticas com a finalidade de modelar o sinal recebido e identificar por meio da análise de parâmetros matemáticos e estatísticos, as oscilações temporais referentes à fisiologia cerebral de atividade neuronal.

Para cada desenho experimental e tipo de dados, existem métodos mais adequados ou menos adequados, dependendo da combinação dos mesmos com a finalidade de cada método, e com suas suposições iniciais.

Abaixo, descrevemos os métodos de análises por sementes e por separação de

componentes independentes, comumente utilizados quando se trata de IRMf no estado de repouso (JANN et al., 2013; LEE; SMYSER; SHIMONY, 2013).

1.4.1. Baseada em Semente

Este método foi utilizado por Biswal e colaboradores, no primeiro estudo a relatar flutuações espontâneas com IRMf, e tem como base o cálculo da correlação temporal ou de análises de covariância de uma região ou *voxel* de interesse, previamente escolhido de acordo com interesses do estudo, com demais regiões ou *voxels* do cérebro (BISWAL et al., 1995a). Sua definição condiz com a definição de conectividade funcional, considerando as correlações de sinais temporais em diferentes regiões (FRISTON, 2011).

A região escolhida para a comparação será a "semente", podendo-se fazer uso de máscaras de redes, ou de regiões anatômicas para tal. Nas análises por voxel, as oscilações temporais do mesmo são diretamente comparadas com as dos demais *voxels*; enquanto que com o uso de regiões ou máscaras, é necessário fazer a média dos sinais de cada *voxel* a fim de se encontrar a flutuação média da região, e essa então ser comparada com as oscilações de demais *voxels* ou regiões. Um esquema do modelo de análise baseada em sementes pode ser observado na Figura 1.7.

Sempre que se opta por calcular a média de um sinal, os ruídos aleatórios tendem a se cancelar conforme o número de amostras envolvidas contendo o sinal de interesse (número de *voxels*, por exemplo), o que se tratando de oscilações próximas à linha base do sinal, como é o caso de dados obtidos no estado de repouso do voluntário, é de especial interesse.

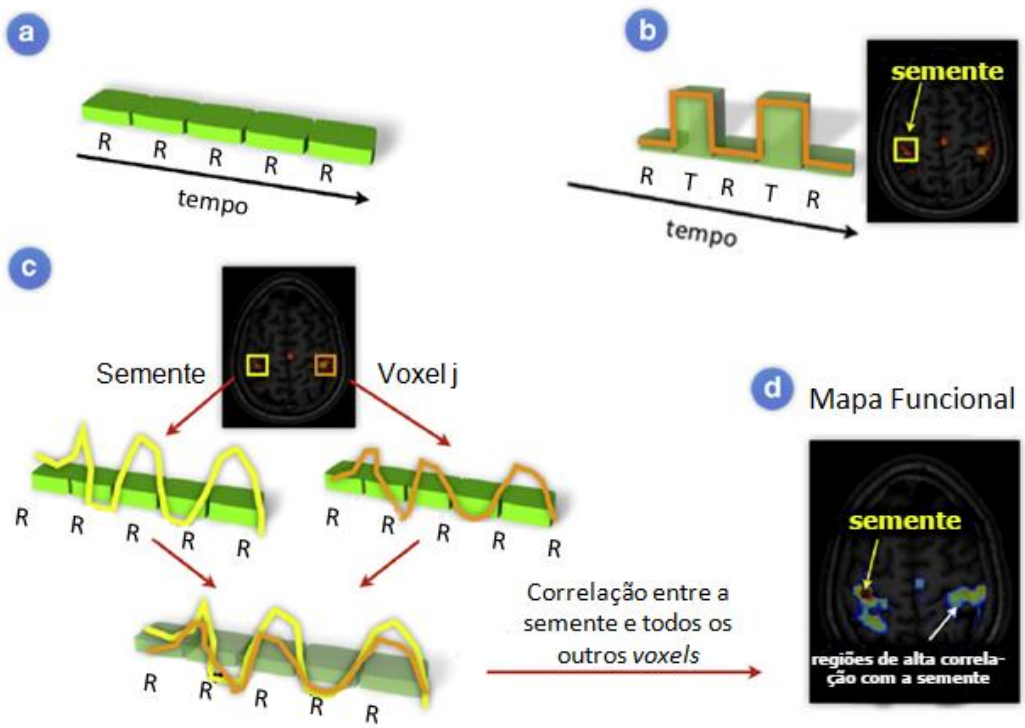


Figura 1.7: Estudo de séries de IRMf através do método das sementes. (a) O voluntário permanece em estado de repouso, sendo pedido que não pense em nada especificamente, enquanto isso se faz a leitura da série de imagens. (b) Um uma tarefa convencional de IRMf pode ser aplicada a fim de encontrar uma região de interesse, ativada pelo mesmo. (c) Após a escolha da semente, informa-se a região/*voxels* com os quais se deseja comparar. E a correlação entre os sinais é calculada. (d) Para mapear todas as conexões funcionais da semente escolhida, o sinal temporal da semente pode ser correlacionado com todos os *voxels* da imagem. Aqueles que exibirem alto coeficiente de correlação com a semente são considerados conectados funcionalmente a ela, resultando, após um limiar, no mapa de atividade final. Figura adaptada de: (VAN DEN HEUVEL; HULSHOFF POL, 2010).

1.4.2. Análise de Componentes Independentes

O método de Análise de Componentes Independentes (ICA, *Independent Component Analysis*) foi desenvolvido a partir do método de PCA, para identificar voxels com informações mútuas, ou correlação de variâncias. Em IRMf, ICA é usada para identificar espacialmente diferentes redes cerebrais, que apresentem sincronia de

oscilação temporal (MCKEOWN et al., 1998a).

A sua principal vantagem é ser um método “cego” que não necessita de muitas condições prévias a respeito dos resultados, como o conhecimento de regiões de atividade cerebral, ou uma modulação de sinal, como para o método GLM. Assim, ICA pode ser utilizada sem muitas suposições prévias em dados de indivíduos no estado de repouso para análises mais exploratórias (BECKMANN et al., 2005a). Seu uso vem crescendo no contexto de procura por redes cerebrais, principalmente no estado de repouso, no qual não há a aplicação de atividades moduladas, conforme se vê no gráfico da Figura 1.8.

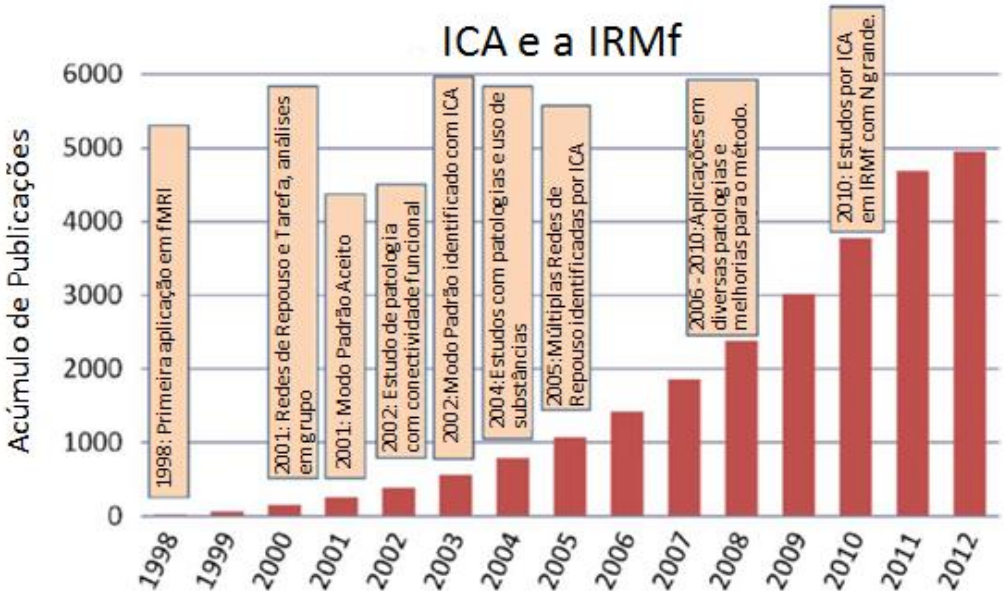


Figura 1.8: Número de artigos em IRMf utilizando ICA, por ano e publicações relevantes da área. Figura adaptada de: (CALHOUN; ADALI, 2012).

O método é empregado em IRMf com a finalidade de analisar grupos de dados não gaussianos que possuam componentes de sinal estatisticamente independentes no tempo ou no espaço (HYVÄRINEN; OJA, 2000). A necessidade de uma independência perfeita tem sido alvo de discussões, podendo afetar a constância da acurácia do método em algumas regiões cerebrais (CALHOUN et al., 2003a). O método separa uma série temporal de cada *voxel* do volume da imagem e encontra aqueles que apresentam as flutuações de sinal semelhantes, a fim de agrupá-los como pertencentes a uma mesma “fonte de sinal” – a atividade neuronal correspondente.

A ICA espacial procura por mapas de atividade coerentes no tempo, separados de acordo com a covariância dos *voxels* e procurando minimizar a informação mútua entre eles (BROWN; YAMADA; SEJNOWSKI, 2001). Neste quesito a ICA supera em eficiência métodos que se baseiam apenas na correlação de pares de *voxels* ou em análises de covariância, pois se muitos *voxels* com atividade simultânea, pode ocorrer perda de informação relevante, resultando na perda de cobertura dos padrões gerais de associações, os padrões globais (MCKEOWN et al., 1998b).

O número de componentes escolhido para decompor o sinal é de fundamental importância no método de ICA. Pelo alto índice de ruído que ocorre em IRMf, pode-se acabar sobre estimando o número de componentes adequado o que compromete a independência e confiabilidade da separação de sinais de interesse. Considera-se que o número de componentes independentes seja menor do que a dimensão da matriz de dados. Vários estudos foram realizados sobre um número ideal de componentes, os quais tendem à recomendação de 20 a 30 para o sinal BOLD (LI; ADALI; CALHOUN, 2007; WANG; LI, 2015). Viu-se também que o ideal é estimar para cada grupo (ou indivíduo) o número de componentes pertinente, a fim de melhor separar as redes e fontes de sinal de acordo com o conjunto de dados (HIMBERG; HYVÄRINEN, [s.d.]; LI; ADALI; CALHOUN, 2007).

A aplicabilidade da ICA espacial em IRMf possui motivações bem fundamentadas, pois neste caso considera-se que exista uma cobertura sistemática das regiões ativadas ao longo do tempo, o que já foi visto por diversos estudos (BISWAL et al., 1995a; FRISTON, 2011; GREICIUS et al., 2003c). Assim, cada imagem é tida como sendo composta pela soma linear dos mapas de todas as componentes espacialmente independentes, havendo para cada um deles, o sinal temporal correspondente. Um modo análogo deste raciocínio é empregado para o caso da ICA temporal, aplicável para estudos com EEG, onde se assume a cobertura sistemática de intervalos de tempo nos quais ocorrerá a atividade (CALHOUN et al., 2003a; CALHOUN; ADAL, 2012; CHEN et al., 2003).

1.5. CONECTIVIDADE FUNCIONAL POR TEORIA DE GRAFOS

Na definição de Conectividade Funcional, como mencionada no primeiro tópico deste capítulo, tem-se que as regiões cerebrais temporalmente correlacionadas, porém, separadas espacialmente não necessariamente possuam influências de “disparo de

ativação" entre suas regiões. Para que haja a conectividade funcional, é necessário apenas que tais regiões sejam estimuladas pelos mesmos estímulos neuro-disparadores ou neuro-moduladores (VAN DIJK et al., 2010). A influência entre as regiões e sua relação de causalidade de disparo é estudada como conectividade efetiva (Friston, 1995).

Em um estudo de redes se avalia as relações entre determinados elementos, os nós, que se conectam por "arestas" ou "ligações". Tais relações podem ser diretas ou indiretas; porém aqui focaremos nas ligações diretas, em que o grau do nó representa o número de ligações que o mesmo possui, não especificando a direcionalidade destas ligações (caso indireto) (ONIAS et al., 2014).

A forma como essas relações ocorrem define o tipo de rede em questão, podendo estas serem classificadas como redes de mundo pequeno (*small-word* networks), rede aleatória, e rede regular (Figura 1.9) (BASSETT; BULLMORE, 2006). A definição de redes aleatórias veio de Erdos Rény, e diz que os nós são randomicamente dispostos com propriedades de conexão constantes. Hoje, usa-se que uma rede aleatória possui alguns de seus parâmetros como sendo constantes enquanto outros podem variar aleatoriamente (ONIAS et al., 2014; WANG et al., 2010).

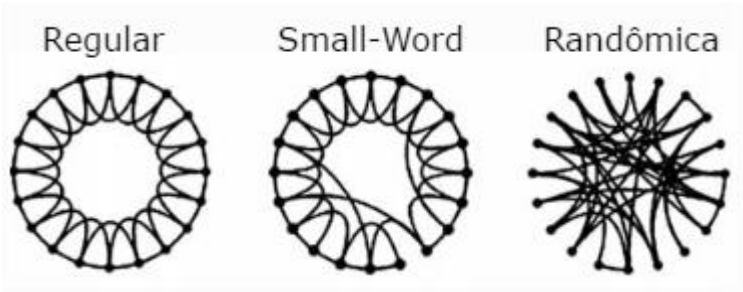


Figura 1.9: Alguns tipos de rede, e sua representação do nível de organização das ligações e da conectividade entre os nós. Figura adaptada de: (BASSETT; BULLMORE, 2006).

As redes cerebrais são classificadas como redes de mundo pequeno, em que ocorre uma grande 'clusterização' local da distribuição de nós, associada a um caminho livre médio pequeno entre quaisquer nós (WANG et al., 2010).

Tem sido demonstrado que as redes de repouso, bem como as demais redes funcionais são passíveis de estudos com a Teoria de Grafos, fazendo jus à nomenclatura (BOCCALETTI et al., 2014; BULLMORE et al., 2009; LIANG; CONNELLY;

CALAMANTE, 2014a). Em 2009, Bullmore e colaboradores propuseram quatro passos práticos para o estudo de conectividade funcional por Teoria de Grafos, que são em síntese (Figura 1.10) (BULLMORE et al., 2009):

1º Definir os nós das redes cerebrais; por exemplo, partir de atlas de regiões anatômicas de interesse.

2º Estimar parâmetros contínuos de associação entre os nós, como a coerência espectral ou o coeficiente de causalidade de Granger.

3º Construir uma matriz adjacente binária com os valores de correlação calculados par a par entre os nós, já limiarizados, ou um gráfico de medidas indiretas.

4º Calcular os parâmetros de redes aleatórias de interesse.

Dentre os parâmetros mais comuns calculados para redes cerebrais estão os apresentados na Tabela 1.2, com suas respectivas definições matemáticas e conceituais, conforme (ONIAS et al., 2014).

Liang e colaboradores apontam que a intensidade da conexão funcional (FCS, *Functional Connectivity Strength*) nas redes de repouso BOLD possui uma correlação espacial com o CBF basal, e que os centros de longo alcance possuem esta relação ainda mais pronunciada. Análises estruturais feitas em paralelo mostraram que a rede de modo padrão (DMN) constituída por regiões permeadas de nós centrais de conectividade no repouso, exibem um alto nível metabólico durante o mesmo. Esta relação espacial entre metabolismo e conectividade em repouso sugere uma ligação entre as áreas ativas basais do cérebro, a perfusão sanguínea e a conectividade funcional (LIANG et al., 2013b).

Os estudos de rede permitem ir além da visualização dos padrões de conectividade, fornecendo medidas e análises quantitativas a respeito dos mecanismos de organização funcional do cérebro, de forma global (WANG et al., 2010). Portanto, através de estudos de conectividade funcional é possível fazer inferência a respeito da fisiologia cerebral, no que diz respeito à sua organização e às propriedades dos sistemas neurais, estudando-os como redes (VAN DIJK et al., 2010).

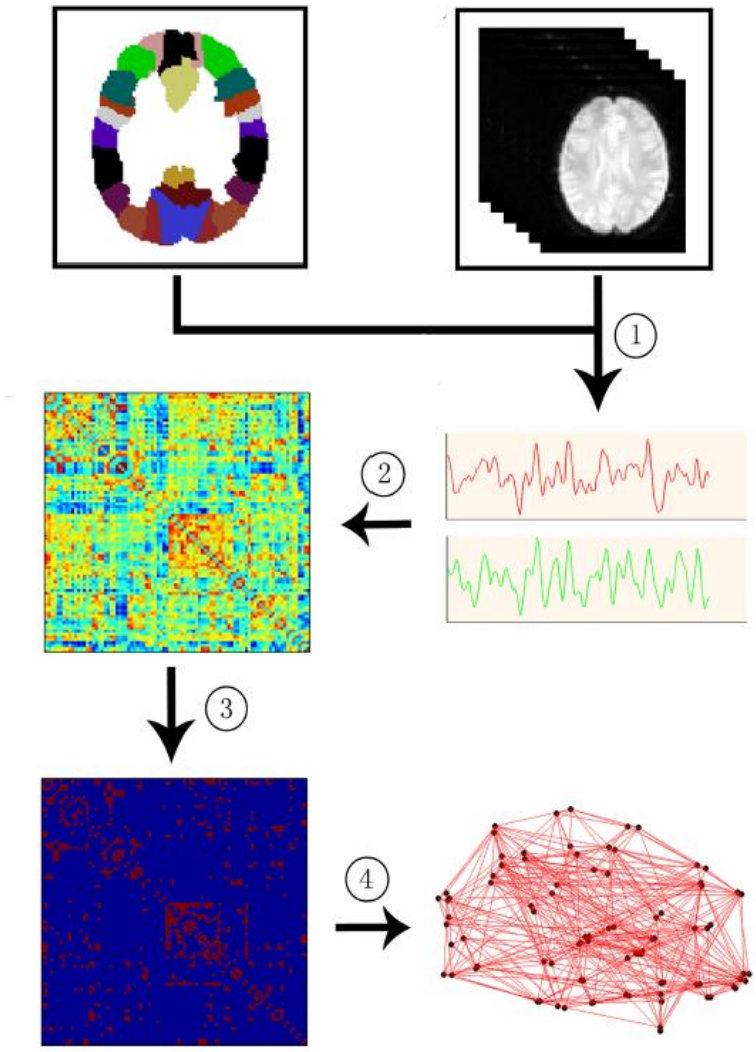


Figura 1.10: Figura representante dos passos propostos por Bullmore. 1) Extração do sinal funcional ao longo do tempo. 2) Cálculo da correlação funcional entre os voxels ou regiões. 3) Aplicação do *thresholding* à matriz de correlação, para binarização. 4) Visualização da matriz binarizada, ou matriz de associação como um grafo. Figura adaptada de: (Wang et al., 2010).

Tabela 1.2: Parâmetros de rede.

Parâmetro	Equação	Definição
Grau do nó i-ésimo	$k_i = \sum_{j \in G} a(i,j)$	G representa o conjunto completo da rede. a(i,j) é o elemento da matriz adjacente, binária. a(i,j) = 1 quando existe conexão, e zero caso contrário.
Grau da Distribuição	$P(k) = \frac{n_k}{N}$	n_k é o número total de nós com grau k. N é o número total de nós.
Custo ou probabilidade da conexão	$P_{custo} = \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j \in G} k_i$	Esta medida avalia a rede como um todo. G representa a rede.
Coeficiente de Clusterização	$C(G) = \frac{1}{N} \sum_{(i,j,h) \in G} \frac{2a(i,j)a(i,h)a(j,h)}{k_i(k_i-1)}$	Diz respeito ao nível de segregação da rede.
Eficiência Local	$E_{local}(i) = \frac{1}{N_{G_i}(N_{G_i}-1)} \sum_{(j,k) \in G_i} \frac{1}{d(j,k)}$	Reflete a eficiência de comunicação entre os nós, ao se retirar um (i). G_ié o conjunto de vizinhos de i.
Menor distância entre os nós	$L = \frac{1}{N(N-1)} \sum_{i,j \in G, i \neq j} d(i,j)$	d(i,j) é a menor distância entre dois nós.
Eficiência Global	$E_{global} = \frac{1}{N(N-1)} \sum_{i \neq j \in G} \frac{1}{d(i,j)}$	E_{global} reflete a eficiência de comunicação da rede como um todo.
Medida de mundo pequeno	$\sigma = \frac{C/C_{al}}{L/L_{al}}$	C_{al} e L_{al} são os coeficientes de clusterização e menor distância, avaliados a rede aleatória obtida a partir da rede original. A rede é considerada de mundo pequeno se σ >>1.

Tabela adaptada de (ONIAS et al., 2014).

1. OBJETIVOS

O objetivo principal do presente trabalho foi investigar a viabilidade de usar uma sequência de ASL, comercial, disponível para o uso na rotina clínica, e otimizada para a quantificação de CBF basal, para o estudo da conectividade funcional do cérebro em repouso.

Assim, o trabalho incluiu os seguintes objetivos específicos:

- Identificar as redes cerebrais de repouso a partir das séries temporais de BOLD e ASL;
- Avaliar a conectividade funcional entre as regiões que constituem as redes de repouso;
- Realizar análises em grupo e individuais a fim de proporcionar análises a nível dos sujeitos como seria em uso clínico;
- Quantificar o fluxo sanguíneo cerebral basal nas regiões que constituem as redes de repouso, e investigar sua correlação com a conectividade funcional;
- Comparar os resultados obtidos com dados de ASL pulsada, que apresenta melhor relação sinal ruído, e pseudocontínua, que apresenta melhor quantificação do CBF;
- Avaliar a influência do tempo ao eco sobre as redes encontradas com ASL e definir os melhores parâmetros de aquisição a serem utilizados;
- Investigar os parâmetros que caracterizam as redes cerebrais de repouso por meio da teoria dos grafos.

3. METODOLOGIA

3.1. PARTICIPANTES

Vinte e quatro voluntários saudáveis, sendo dezesseis homens e oito mulheres, maiores de 18anos (média: 25 ± 6 anos), estudantes de graduação e de pós-graduação de cursos e áreas variados, participaram deste estudo.

Os critérios de exclusão foram: hipertensão, diabetes e histórico de doenças neurológicas; presença de estenose carotídea parcial ou total, unilateral ou bilateral; presença de lesão por acidente vascular cerebral ou tumor cerebral; presença de marca-passo e próteses incompatíveis com a realização de exame de ressonância magnética; claustrofobia; e não assinatura do termo de consentimento.

3.2. ASPECTOS ÉTICOS E ORIENTAÇÕES

O presente estudo e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexos I e II) foram aprovados pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP), e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP).

Cada voluntário recebeu o TCLE da pesquisa, e teve a oportunidade de ler na presença dos pesquisadores e esclarecer as dúvidas. No termo estavam inclusas as informações sobre os objetivos e procedimentos do estudo; os possíveis desconfortos do exame, como por exemplo, claustrofobia; a ausência de efeitos colaterais comprovados para exames de ressonância magnética; e a possibilidade de saírem da pesquisa a qualquer momento, mesmo durante o exame. Além disso, todos os voluntários foram convidados a participar da pesquisa sem nenhum tipo de remuneração e recebendo apenas o benefício de terem suas IRM anatômicas laudadas por um radiologista do HCFMRP. Após esse procedimento, os voluntários afirmaram o consentimento de sua participação mediante assinatura do TCLE.

Antes de entrar na máquina de ressonância magnética, todos os voluntários foram encaminhados a um enfermeiro responsável pela entrevista de triagem para averiguar se

o participante em questão possuía algum tipo de restrição ao exame, como marca-passos e objetos metálicos pelo corpo.

Todos os voluntários foram instruídos a permanecer acordados, se movimentar o mínimo possível, e a olhar através de um espelho para uma cruz fixada atrás do magneto durante todo o exame.

3.3. AQUISIÇÃO DAS IMAGENS

As IRM foram adquiridas em um sistema de Ressonância Magnética Achieva 3T (Philips Medical Systems, Holanda) instalado no HCFMRP, instituição coparticipante do estudo. Este sistema é equipado com gradientes capazes de gerar amplitudes de 80 mT/m e tempo de subida de 200 mT/m/ms. Foram utilizadas uma bobina transmissora de corpo inteiro e uma bobina receptora de cabeça de 32 canais.

Os parâmetros de aquisição utilizados para cada sequência de pulsos estão descritos a seguir.

3.3.1. *Arterial Spin Labeling* Pseudocontínua (pCASL)

Imagens axiais de ASL foram adquiridas pelo método pseudocontínuo, utilizando uma sequência 2D do tipo EPI (do inglês, *Echo Plannar Imaging*) com os seguintes parâmetros: ângulo de excitação = 90º, matriz = 80 x 80, FOV = 240 x 240 mm^2, número de fatias = 20, espessura das fatias = 5 mm, duração da marcação = 1650 ms, atraso pós-marcação = 1525 ms, número de pares(controle/marcação) = 75. Durante o trabalho, variou-se o Tempo ao Eco (TE) da sequência para investigação de sua influência na qualidade das séries temporais das imagens. Na Tabela 3.1 estão os valores de TE e Tempo de Repetição (TR), e do número de indivíduos para cada sequência.

3.3.2. *Arterial Spins Labeling* Pulsada (PASL)

Imagens axiais de ASL foram adquiridas pelo método pulsado, utilizando uma sequência 2D do tipo EPI com os seguintes parâmetros: ângulo de excitação = 90º, matriz = 64 x 64, FOV = 240 x 240 mm^2, número de fatias = 20, espessura das fatias = 5 mm, atraso pós-marcação = 1500 ms, número de pares(controle/marcação) = 100. Durante o trabalho, variou-se o TE da sequência para investigação de sua influência na qualidade das séries temporais das imagens. Em relação aos TEs de 21 e 24ms, tanto na análise

individual quanto nas análises em grupo, o desempenho foi o mesmo, confirmando a plausibilidade de colocar os dois conjuntos de dados em um único grupo. Já os dados com TE de 14 ms apresentaram resultados muito ruins; portanto, exceto quando especificado, todos os resultados apresentados com PASL são para TE igual a 21 e 24 ms. Na Tabela 3.1 estão os valores de TE e TR, e do número de indivíduos para cada sequência.

Apesar de ter relação sinal-ruído conhecidamente inferior à pCASL(ALSOP et al., 2015; BOROGOVAC; ASLLANI, 2012; POLLOCK et al., 2009; WU et al., 2007), utilizar PASL teve como objetivo investigar a influência do TR e, consequentemente, da resolução temporal nos resultados.

Tabela 3.1: Parâmetros variados com a técnica de ASL pseudocontínua e pulsada.

	pCASL(14)	pCASL(21)	PASL(14)	PASL(21-24)
TE (ms)	14	21	14	21
TR (ms)	4000	4200	3000	3000
Número de participantes	22	7	4	18

3.3.3. *Blood Oxygenation Level Dependent* (BOLD)

Imagens baseadas no contraste BOLD também foram adquiridas utilizando uma sequência 2D do tipo EPI, com os seguintes parâmetros: TR/TE = 2000/30 ms, ângulo de excitação = 90º, matriz = 80 x 80, FOV = 240 x 240 mm^2, número de fatias = 31, espessura das fatias = 4 mm, intervalo entre fatias (*gap*) = 0,5 mm, número de repetições = 300.

3.3.4. Imagens Anatômicas

Para referência anatômica, imagens de alta resolução, ponderadas em T1, foram adquiridas utilizando uma sequência do tipo gradiente eco com os seguintes parâmetros: TR/TE = 7/3 ms, ângulo de excitação = 8º, matriz = 240 x 240, FOV = 240 x 240 mm^2, número de fatias = 160, espessura das fatias = 1 mm.

Para confirmação da ausência de oclusões artérias, imagens de angioressonância foram obtidas utilizando uma sequência tridimensional TOF (*Time of Flight*), com os seguintes parâmetros: TR/TE = 20/3,5 ms, ângulo de excitação = 20º, matriz = 512 x 512, FOV = 220 x 220 mm^2, número de fatias = 175, espessura das fatias = 1,1 mm.

3.4. PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

As imagens foram processadas e analisadas utilizando rotinas próprias desenvolvidas em MATLAB (TheMathWorks, Natick, EUA), além do SPM12 (*Statistical Parametric Mapping*, University College London, UK), ASL *toolbox*(WANG et al., 2008), GIFT *toolbox* (CALHOUN et al., 2001) e CONN (Neuroimaging Informatics Tools and Resources Clearinghouse, National Institutes of Health, EUA).

3.4.1. Pré-Processamento

As etapas de pré-processamento foram realizadas usando o SPM12 e diferiram para as diferentes técnicas de imagem utilizadas (BOLD e ASL), devido às suas peculiaridades, como RSR, e os tipos de imagens obtidas. Todas, porém, envolveram as seguintes etapas:

- Reorientação tendo a comissura anterior de cada participante como referência;

-Realinhamento da série de imagem sem relação à primeira imagem da série para correção de artefatos de movimento da cabeça do participante;

- Corregistro entre as imagens funcionais, de baixas RSR e resolução espacial, e as imagens anatômicas, de alta resolução espacial;

- Suavização espacial com filtro gaussiano de 4 mm ou 10 mm de largura à meia altura (FWHM, do inglês *Full Width at Half Maximum*), para aumentar a RSR;

- Normalização para o espaço padrão MNI (*Montreal Neurological Institute*) a fim de padronizar as dimensões anatômicas e reduzir a variabilidade espacial entre os indivíduos.

Os diagramas das figuras 3.1, 3.2 e 3.3 apresentam a ordem de aplicação dos processos descritos para as imagens de pCASL, PASL e BOLD, respectivamente. Para pCASL, a suavização espacial e a normalização foram realizadas sobre as imagens obtidas a partir da subtração ou média de cada par controle/marcada. Para PASL, cujas imagens apresentam menor RSN, realizar a suavização e a normalização das imagens

controle e marcada se mostrou mais eficaz do que realizar estas etapas sobre as imagens obtidas a partir da subtração ou média de cada par controle/marcada.

Já no caso das imagens BOLD, realizou-se mais uma etapa, a correção do tempo de aquisição entre as fatias. Isso é necessário, pois para cada volume adquirido, uma fatia é adquirida de cada vez, fazendo com que as fatias fiquem defasadas temporalmente. A correção utiliza-se de interpolação, de modo que todas as fatias do volume dão analisadas como se tivessem sido obtidas no mesmo instante de tempo.

Além disso, as imagens anatômicas também foram normalizadas para o espaço MNI e segmentadas em regiões de substâncias branca e cinzenta.

3.4.2. Cálculo das Imagens de Perfusão

Os mapas de perfusão sanguínea foram obtidos através da subtração das imagens marcadas em relação às imagens controles, utilizando o método de interpolação "*sinc-subtraction*" (AGUIRRE et al., 2002; WANG et al., 2008). Como as imagens controle e marcada são adquiridas em diferentes tempos, espaçadas de um TR, este método (Equação 3.1) realiza uma interpolação *sinc* das imagens do tipo controle para retirar a diferença de sinal ocorrida entre os tempos de aquisição. Assim, ao subtrair cada par controle-marcada, a imagem resultante será ponderada na diferença de sinal devido aos spins marcados nos pequenos vasos.

$$[C_1, C_2, \dots C_{\frac{n}{2}}] \rightarrow \left[C_{\frac{1}{2}}, C_1, C_{\frac{3}{2}}, \dots C_{n-\frac{1}{2}}, C_{\frac{n}{2}}\right] \rightarrow \left[C_{\frac{1}{2}}, C_{\frac{3}{2}}, \dots C_{n-\frac{1}{2}}\right] \qquad [3.1]$$

Em que C e n se referem, respectivamente, à matriz da imagem Controle e ao número do dinâmico, sendo n/2 o número total de pares de imagem controle-marcada.

Na prática, a "*sinc subtraction*" tem um efeito de filtro passa bandas, o qual minimiza a contaminação de sinal BOLD sobre as imagens de perfusão (AGUIRRE et al., 2002), diminuindo o sinal proveniente dos grandes vasos, efeitos da vasodilatação, ou extração de oxigênio.

As imagens de perfusão foram obtidas para as séries de imagens adquiridas por PASL e pCASL.

3.4.3. Cálculo dos Mapas de CBF

Os mapas de CBF foram obtidos a partir das imagens de perfusão, para pCASL, conforme o modelo de Buxton, e como descrito por Alsop e colaboradores (ALSOP et al., 2015):

$$CBF = \frac{6000*\lambda*(SI_{controle}-SI_{marcada})*e^{\frac{\omega}{T_{1,sangue}}}}{2\alpha*T_{1,sangue}*M_0*(1-e^{\frac{-\tau}{T_{1,sangue}}})} \quad [ml\ /100g/min] \qquad [3.2]$$

Em que λ representa o coeficiente da fração de partição tecido cerebral/sangue (0,98 mL/g para substância cinzenta e 0,84 mL/g para substância branca); SI é a intensidade de sinal em cada *voxel* das imagens controle e marcada; ω é o tempo de atraso após a marcação, necessário para o sangue marcado chegar à região de interesse; $T_{1,sangue}$ é o tempo de relaxação longitudinal do sangue (1680 ms, para 3T); α é a eficiência de marcação dos spins (0,85);M_0 é um mapa com os valores da intensidade média das cincoprimeiras imagens controle adquiridas (proporcional à densidade protônica); e τ é a duração da marcação.

Cada par de imagens controle/marcada adquirido por pCASL gerou uma imagem ponderada em perfusão e, consequentemente, um mapa de CBF. A série temporal de mapas de CBF foi utilizada para avaliar as redes cerebrais de repouso. Além disso, um mapa médio foi obtido a partir dessa série de mapas para a avaliação regional do CBF basal na substância cinzenta e nas regiões das redes cerebrais de repouso.

As análises com os mapas de CBF calculados a partir das imagens de PASL não foram realizadas, pois não é recomendado quantificar CBF com a sequência de pulsos que utilizamos com apenas um tempo de inversão (ou atraso pós-marcação), pois não é possível determinar qual volume de sangue foi marcado pelo pulso de radiofrequência (ALSOP et al., 2015).

3.4.4. Cálculo das Imagens de pseudo-BOLD

As imagens que chamamos de pseudo-BOLD (ou pBOLD) são também descritas na literatura como BOLD concorrentes, ou concomitantes devido ao fato de que representam a recuperação do sinal “BOLD” ainda presente nas imagens de ASL, sendo extraídas destas. Elas são obtidas pela média aritmética simples entre as imagens controle

e marcada, e possuem maior intensidade de brilho (maior sinal) do que as imagens de perfusão obtidas por subtração. Este fato é importante tratando-se da análise de redes, principalmente as basais que não possuem um grande aumento de sinal devido à execução de tarefas, por exemplo. Além da maior qualidade, com estas imagens as comparações com as redes obtidas por BOLD tendem a ser mais próximas (WONG; BUXTON; FRANK, 1997; ZHU et al., 2013b).

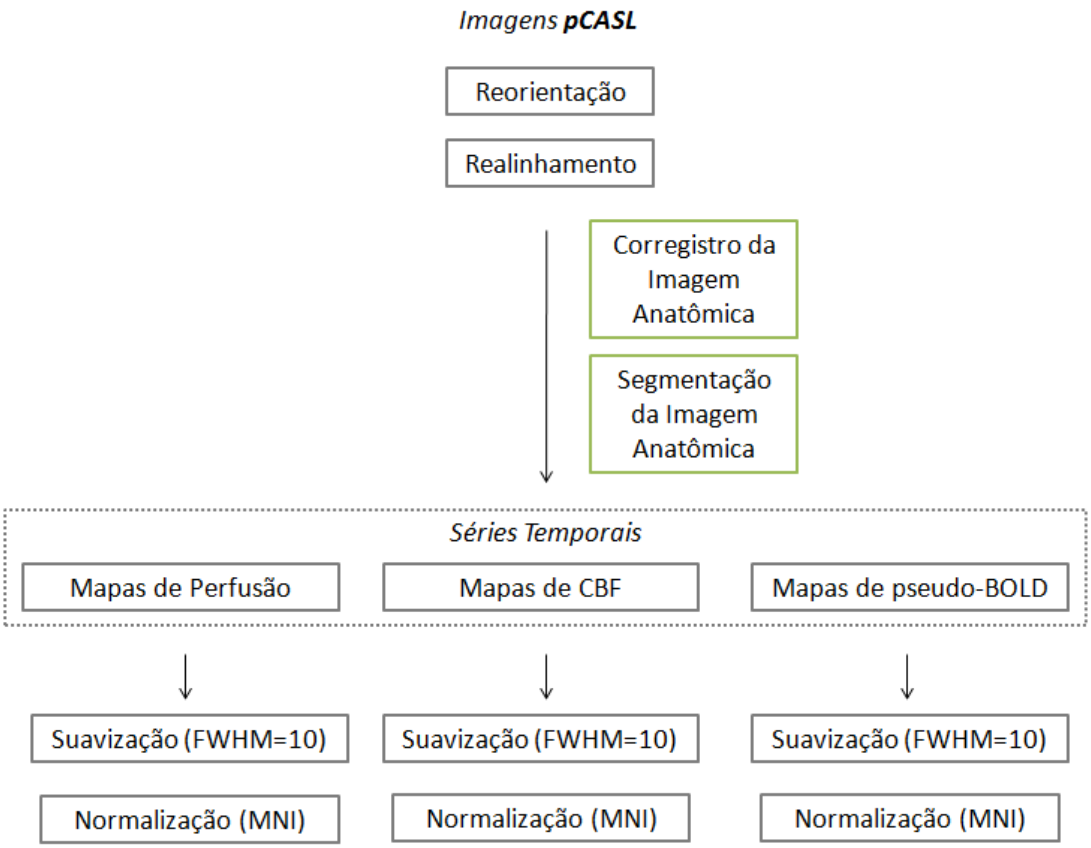


Figura 3.2:Etapas do pré-processamento das imagens de ASL adquiridas pelo método pseudocontínuo.

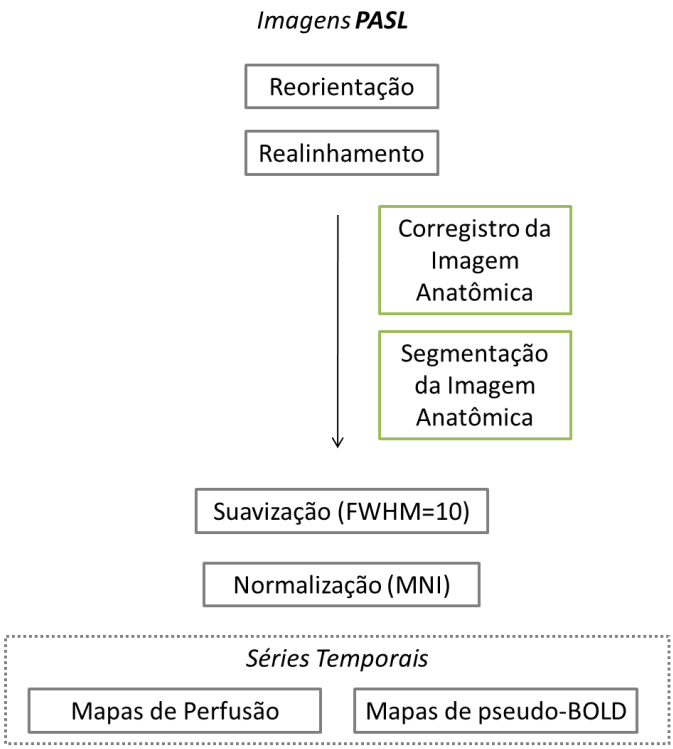


Figura 3.3:Etapas do pré-processamento das imagens de ASL adquiridas pelo método pulsado.

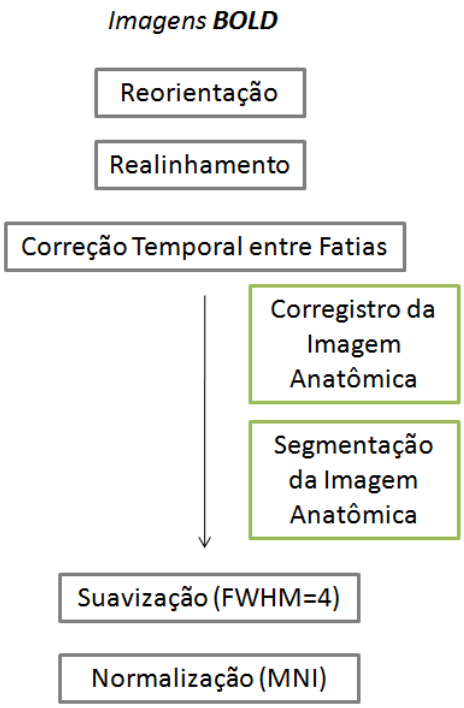


Figura 3.3: Etapas do pré-processamento das imagens baseadas no contraste BOLD.

3.4.5. Redes de Repouso

3.4.5.1. Análise das Componentes Independentes

O método de Análise das Componentes Independentes (ICA)(CALHOUN et al., 2003b; MCKEOWN et al., 1998b) foi utilizado para obtenção das redes de repouso a partir das séries de imagens de perfusão, CBF, pBOLD e BOLD(BECKMANN et al., 2005a). Para a obtenção do número de componentes, empregamos o critério MDL (do inglês, *Minimum Description Length*), conforme a literatura (CALHOUN et al., 2001; LI; ADALI; CALHOUN, 2007) e disponível no pacote GIFT, pioneiro neste tipo de análise. O GIFT foi escolhido para realizar todas as etapas da análise de componentes por sua completude, diversidade de algoritmos e citações.

Foram realizadas análises individuais, a partir apenas dos dados de cada indivíduo, e análises em grupo, utilizando os dados de todos os indivíduos. Dois tipos de análises em grupo foram empregados, seguindo a metodologia de Jann e colaboradores (2015), as análises “separadas” e as análises “conjuntas”. No primeiro tipo de análise, consideraram-se as imagens de todos os indivíduos, porém de apenas um tipo (perfusão, CBF, pBOLD ou BOLD), sendo uma única série temporal inserida como “sessão” para cada indivíduo. No segundo tipo de análise, utilizamos cada tipo de imagem de ASL (perfusão, CBF e pBOLD), acompanhada da série BOLD. Neste caso, as análises de variância, o número de componentes calculado e todo o processo de ICA ocorreram dispondo das informações das duas séries, que apesar de possuírem número de dinâmicos diferentes, podem ser associadas por representarem o mesmo estado de atividade basal em cada indivíduo. Trata-se de uma análise única para o grupo e de informações pareadas entre as séries.

Para ambas as análises em grupo, o algoritmo Icasso foi utilizado para otimizar a estabilidade das análises, realizando duas vezes o método de ICA e considerando nas componentes encontradas o índice de confiabilidade, medidas dos tamanhos dos domínios obtidos, e quantas componentes dos indivíduos estes englobam, a fim de proporcionar uma melhor reconstrução das componentes individuais e médias (ERHARDT et al., 2011; HIMBERG; HYVA; ESPOSITO, 2004; HIMBERG; HYVÄRINEN, [s.d.]; HYVÄRINEN; OJA, 2000).Devido ao maior volume de dados, a reconstrução das séries temporais a partir da ICA espacial foi feita pelo método de *Dual Regression*, o qual concatena os dados do grupo temporalmente (considerando para isso

uma coerência espacial entre os volumes) e reconstrói as séries temporais de cada indivíduo e sessão a partir de mapa espacial médio comum de cada componente entre os indivíduos e sessões. Deste modo, a reconstrução individual a partir de análises em grupo levou em consideração as informações espaciais médias entre todos os dados fornecidos, para a reconstrução das séries temporais individuais das redes (CALHOUN; ADALI, 2012).

A Figura 3.4 apresenta as etapas do método de ICA aplicadas nas análises individuais, com apenas uma série temporal.

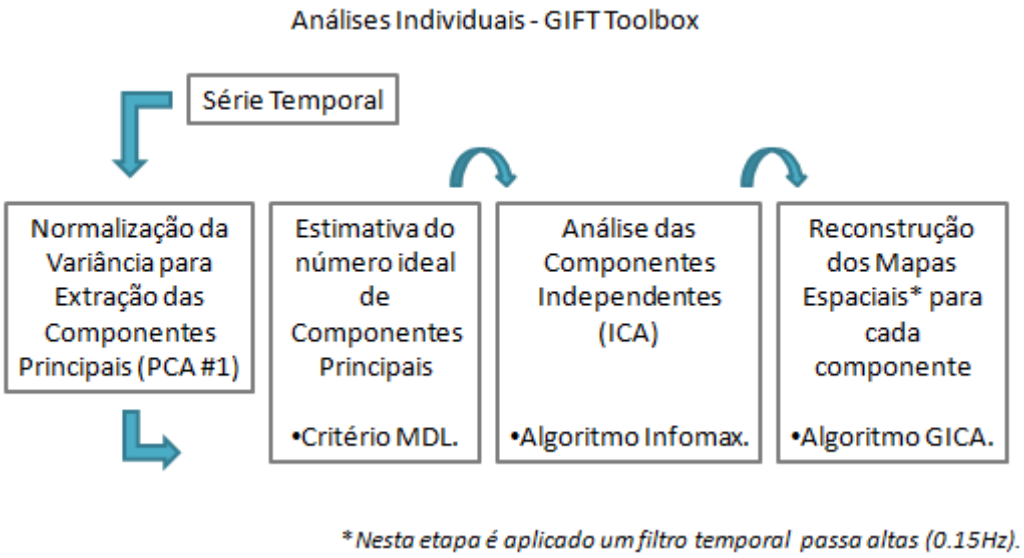


Figura 3.4: Diagrama das principais etapas e escolha dos algoritmos na análise individual desempenhada no GIFT toolbox.

As redes podem ser identificadas visualmente, pela presença dos picos de atividade, por apresentarem domínios (ou '*clusters*') bem delimitados e por estarem em regiões condizentes com as apresentadas na literatura. Apesar disso, podem ocorrer mais de uma componente com regiões de atividade semelhantes, ou ainda, domínios de uma mesma rede podem aparecer separados, em mais de uma componente. Para optar pela componente mais adequada, usamos como critério decisivo, em todas as seleções de componentes do trabalho, o resultado da ferramenta "*spatial sorting*" disponível no GIFT *toolbox*. Essa ferramenta utiliza um modelo espacial com 99 regiões, separadas em 14 redes de repouso: DMN dorsal e ventral, pré-cúneo, frontoparietais direita e esquerda,

visual primária, visuo-espacial, auditiva, atentiva, saliência anterior, saliência posterior, motora, linguagem, gânglios basais. Há as opções de escolha das componentes a partir do cálculo do coeficiente de correlação ou curtose, regressão linear de múltiplos parâmetros, ou ainda a partir do *voxel* de intensidade máxima nos mapas.

No presente estudo, utilizamos os coeficientes de correlação entre todas as componentes independentes de cada indivíduo, obtidas por ICA, e o modelo de cada rede fornecido pelo GIFT. Além disso, critérios visuais também foram empregados a partir de recomendações da literatura para a identificação das redes e eliminação de componentes de ruído, as quais podem apresentar altos coeficientes de correlação com os modelos. Os critérios foram pouca cobertura de sinal nos ventrículos e regiões de grandes vasos, ausência de artefatos de susceptibilidade magnética os quais são caracterizados por manchas de sinal próximas a grandes vasos, e presença de clusters bem definidos em torno de picos de atividade localizados na substância cinzenta (ALLEN et al., 2011a), além da coerência das regiões com os mapas apresentados por demais artigos (CALHOUN; ADAL, 2012; JANN et al., 2015b; SMITH et al., 2009; ZHU et al., 2013b).

Após a seleção das componentes, selecionamos os mapas de z para apresentar as redes, com limiar mínimo de z = 1, e apenas valores positivos, sem aplicação da correção para múltiplas comparações.

3.4.5.2. Relação Sinal Ruído

Para calcular a relação sinal-ruído (RSR) das séries temporais, utilizou-se a razão entre a média do valor de sinal de todos os *voxels* da região de substância cinzenta e o seu desvio padrão. Calculou-se a RSR para cada dinâmico (volume) das séries temporais obtidas com ASL (PASL e pCASL), bem como para as séries temporais de BOLD.

3.4.5.3. Análise Estatística

Os mapas de z das redes de repouso obtidas pelas séries temporais de ASL foram comparados com os mapas das redes de BOLD por teste t pareado de duas amostras, com contraste (-1, 1). Além disso, calculamos os coeficientes de similaridade DICE (CS_{DICE})(DICE, 1945) entre as redes obtidas de cada análise, reconstruídas por cada técnica (JANN et al., 2015a). Este coeficiente quantifica a relação dos *voxels* comuns para as duas imagens em relação à quantidade total de *voxels*, conforme a Equação 3.3, em que A e B seriam as duas imagens (mapas) de interesse.

$$CS_{DICE} = \frac{2\,(A \cap B)}{(A \cup B)} \tag{3.3}$$

Consideramos interessante calcular o coeficiente DICE não apenas entre os pares de redes obtidas por cada análise conjunta, mas também uma análise cruzada das redes referentes às imagens adquiridas por pCASL, para diferentes valores de TE, a fim de avaliar a diferença entre os mapas ao variarmos apenas o TE. Na Figura 3.5, apresentamos o procedimento de obtenção e comparação destas redes.

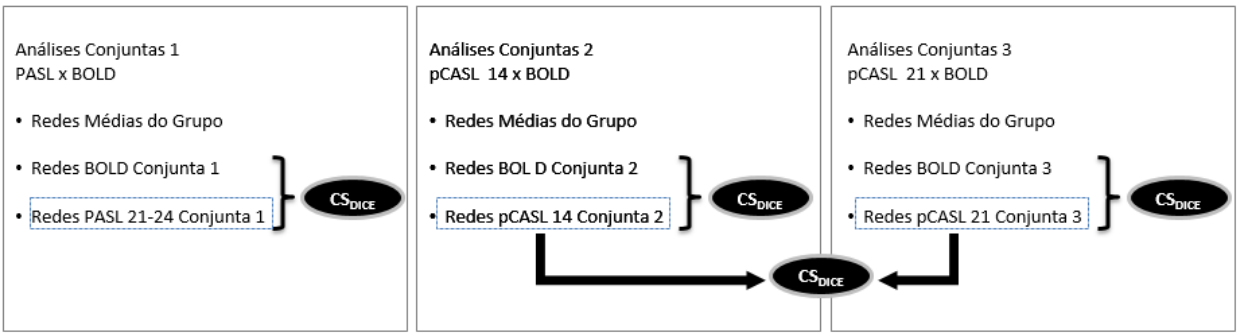


Figura 3.5: Representação esquemática da ICA conjunta, juntamente com a seleção das componentes para o cálculo do coeficiente de similaridade DICE (CS_{DICE}).

Para comparar os resultados de RSR entre as diferentes técnicas, utilizou-se ANOVA para amostras correlacionadas e teste post-hoc de Tukey.

3.4.6. Conectividade Funcional por Teoria de Grafos

A avaliação da conectividade funcional pela Teoria de Grafos foi realizada utilizando o software CONN e as séries temporais de pBOLD e CBF, obtidas por pCASL (TE = 14 ms), e BOLD, pré-processadas no SPM12. Primeiramente, uma regressão linear e uma filtragem temporal foram aplicadas para remover artefatos e ruídos indesejáveis no sinal de interesse devido a movimentos da cabeça e efeitos fisiológicos. Os sinais provenientes da substância branca e fluido cerebrospinal, e os parâmetros de realinhamento de cada indivíduo foram utilizados como covariáveis na regressão.

Após a regressão, um filtro temporal passa-banda foi aplicado, com intervalo escolhido de 0,01 a 0,1 Hz. Além disso, foi removida qualquer tendência linear (*linear detrending*) e reduzida a influência de *outliers* (*despiking*) nas séries temporais.

Redes cerebrais de repouso foram investigadas pela análise semente-*voxels*, em que a série temporal média de cada semente foi correlacionada com as séries temporais de todos os *voxels* da imagem. Foram consideradas conexões se o coeficiente de correlação de Pearson fosse maior do que 0,30, com $p < 0,0001$, não corrigido para múltiplas comparações. As sementes foram definidas a partir de regiões anatômicas do atlas do FSL Harvard-Oxford Atlas (Figura 3.6a), que inclui áreas corticais e subcorticais do cérebro.

Realizou-se também uma análise *ROI-to-ROI*, ou seja, calculou-se a correlação de Pearson entre as séries temporais médias de regiões de interesse, definidas a partir de regiões anatômicas do atlas do FSL Harvard-Oxford Atlas, e também de áreas que constituem redes cerebrais comumente investigadas (Figura 3.6b). As redes analisadas foram: rede de modo padrão (córtex pré-frontal medial, regiões parietais laterais esquerda e direita, córtex cingulado posterior), sensório-motor (porções laterais esquerda e direita, e superior), visual (áreas primária, ventral e dorsais esquerda e direita), saliência (córtex cingulado anterior, porção anterior da ínsula, córtices pré-frontais rostrais esquerdo e direito, giros supramarginais esquerdo e direito), atentiva dorsal (áreas de visão frontal esquerda e direita, sulcos intraparietais esquerdo e direito) e frontoparietal (córtices pré-frontais laterais esquerdo e direito, córtices parietais posteriores esquerdo e direito).

No caso da análise *ROI-to-ROI*, considerou-se a conexão entre duas regiões para o coeficiente de correlação de Pearson $r > 0,30$ e $p < 0,05$ corrigido para múltiplas comparações (FDR, *False Discovery Rate*). A partir dessas correlações, sete parâmetros foram calculados para cada indivíduo: eficiências global e local, centralidade, custo, comprimento médio do caminho, coeficiente de clusterização e grau. Além disso, calculou-se também, para cada indivíduo, a força da conectividade funcional (FC) como sendo a correlação média de cada região de interesse com todas as outras da mesma rede. A comparação dos resultados obtidos foi feita por regressão e ANOVA, com teste *post-hoc* de Tukey, considerando significância para $p < 0,05$.

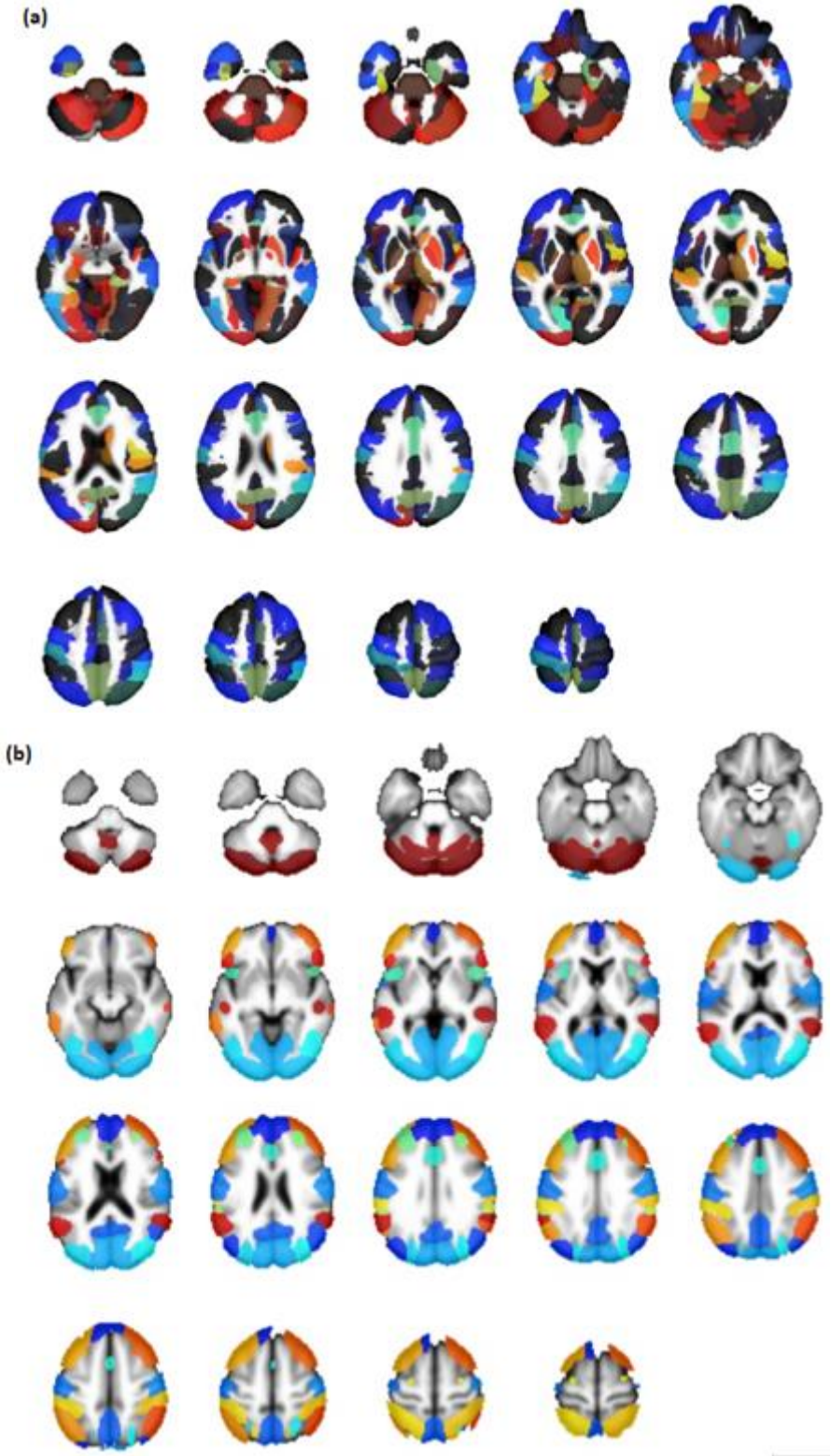


Figura 3.6: (a)Atlas de regiões anatômicas, incluindo áreas corticais e subcorticais. (b) Atlas de redes cerebrais. Ambos do FSL Harvard-Oxford Atlas.

4. RESULTADOS

Com o objetivo de investigar a viabilidade de estudar redes cerebrais de repouso e a conectividade funcional entre as regiões que as compões por uma técnica de ASL comumente utilizada para quantificação de CBF, adquirimos em indivíduos jovens saudáveis imagens de ASL pseudocontínua e pulsada durante dez minutos de repouso, e comparamos com imagens baseadas no contraste BOLD.

Na Figura 4.1 apresentamos imagens de quatro dinâmicos diferentes e a imagem média de todos os dinâmicos de um indivíduo, baseadas no contraste BOLD e obtidas com a técnica de pCASL (imagens de pBOLD, mapas de perfusão e CBF). É possível observar a diferença de contraste entre elas. Os mapas de perfusão são ponderados na proporção de spins marcados que perfundiram cada região, enquanto os mapas de CBF mostram os valores regionais de fluxo sanguíneo calculados a partir da Equação 3.2, considerando características do tecido cerebral e parâmetros da aquisição.

As séries de imagens BOLD e pBOLD foram as que apresentaram melhor qualidade visual, sem presença de artefatos ou grande quantidade de ruído visível, mostrada pela semelhança de seus volumes, adquiridos ao longo do tempo, com a imagem média de todos os seus dinâmicos. No caso das séries dos mapas de perfusão, bem como de CBF, nota-se uma grande diferença dos volumes para a imagem média, bem como a presença de ruído e pouca definição das regiões de substância cinzenta e branca. A qualidade das imagens, com as análises quantitativas da intensidade de sinal e relação sinal-ruído será discorrida ao longo dos resultados.

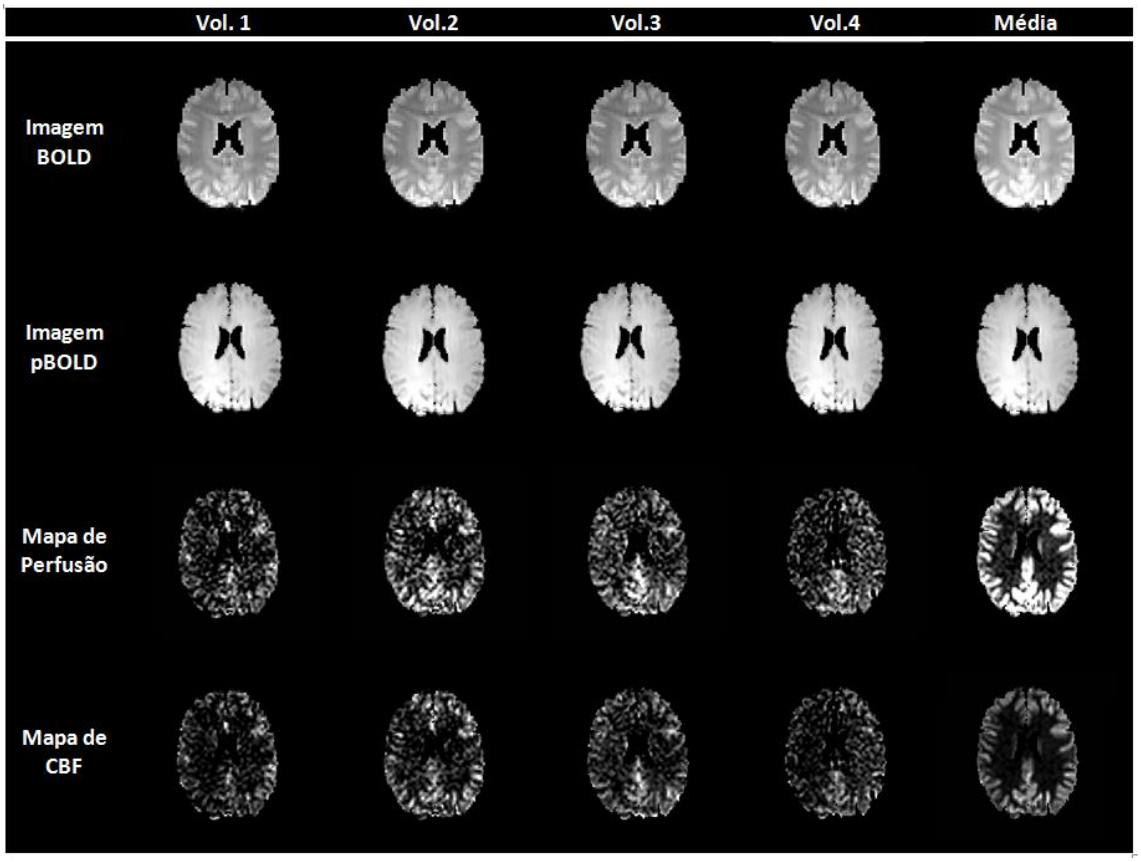


Figura 4.4: Imagens de quatro diferentes dinâmicos e imagens médias, de um indivíduo, baseadas no contraste BOLD e obtidas com a técnica pCASL (TE = 14ms).

4.1. Redes Cerebrais de Repouso

4.1.1. Análise em Grupo

Considerando as metodologias atualmente utilizadas para avaliação das redes cerebrais de repouso com ASL, iniciamos o estudo com as análises em grupo. Realizamos tanto análises conjuntas, em que aplicamos ICA em um conjunto de imagens obtidas por ASL (perfusão, CBF ou pBOLD) e BOLD, e análises separadas, em que a ICA foi aplicada em cada tipo de imagem separadamente.

4.1.1.1. Análise Conjunta

No método de ICA procura-se por “fontes de sinal” que seriam representadas pelas componentes independentes. Dado isso, imagens obtidas por diferentes métodos, mas

contendo as flutuações de uma mesma “fonte”, como por exemplo, as flutuações espontâneas cerebrais de uma rede em imagens funcionais de PET e IRM, podem ser encontradas em uma análise em grupo deste tipo, e a reconstrução do sinal da fonte considera as informações dos diferentes tipos de dados. Assim como para imagens obtidas por diferentes técnicas, o método pode tratar várias sessões de um mesmo experimento, ou diferentes tipos de contraste, desde que contenham o mesmo tipo de flutuações.

No presente estudo, optamos por realizar as análises conjuntas das séries de cada tipo de imagens adquiridas por pCASL (TE = 14 ms e TE = 21 ms) e PASL, juntamente com a série de imagens BOLD, que é o método convencional de imagens funcionais por Ressonância Magnética. Os resultados de cada análise conjunta, para o caso de pBOLD e BOLD, com as reconstruções das componentes médias das duas técnicas estão apresentados nas Figuras 4.2 a 4.4. Com o objetivo de comparar os mapas obtidos para cada rede com diferentes técnicas, apresentamos também os resultados do teste-t realizado.

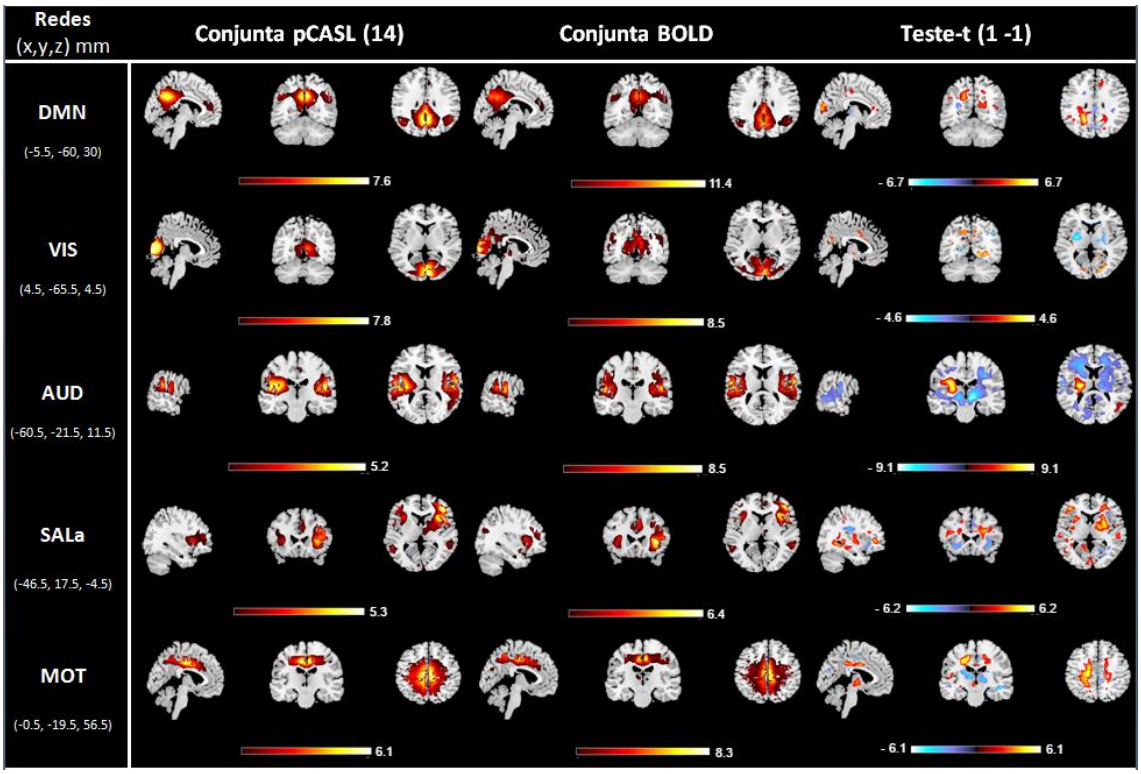


Figura 4.2: Redes cerebrais de repouso (mapas de z) obtidas por ICA na análise de grupo (N = 22) conjunta de imagens BOLD e imagens pBOLD adquiridas por pCASL (TE = 14 ms). DMN: *default mode network* (rede de modo padrão), VIS: visual, AUD: auditiva, SALa: saliência anterior, MOT: motora.

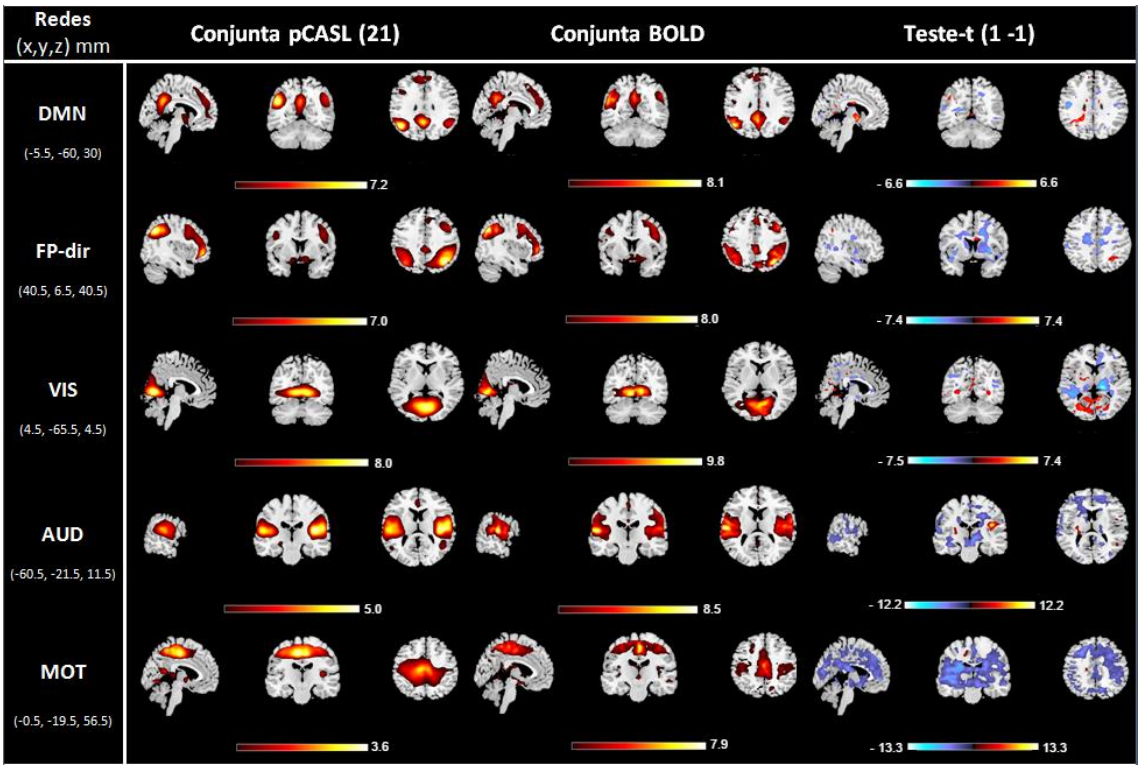


Figura 4.3: Redes cerebrais de repouso (mapas de z) obtidas por ICA na análise de grupo (N = 7) conjunta de imagens BOLD e imagens pBOLD adquiridas por pCASL (TE = 21 ms). DMN: *default mode network* (rede de modo padrão), FP-dir: frontoparietal direita, VIS: visual, AUD: auditiva, MOT: motora.

Quatro redes foram observadas para as imagens pBOLD adquiridas pelas três sequências de ASL: DMN, visual (VIS), auditiva (AUD) e motora (MOT). Demais redes como Saliência Anterior (SALa), Frontoparietal direita (FP-dir) e esquerda (FP-esq) e atentiva (ATT) foram observadas apenas com uma técnica de ASL (Figuras 4.2 a 4.4). Os testes-t para os dados obtidos por ASL pulsada apresentaram melhores resultados, ou seja, menor diferença na comparação com as redes obtidas por BOLD.

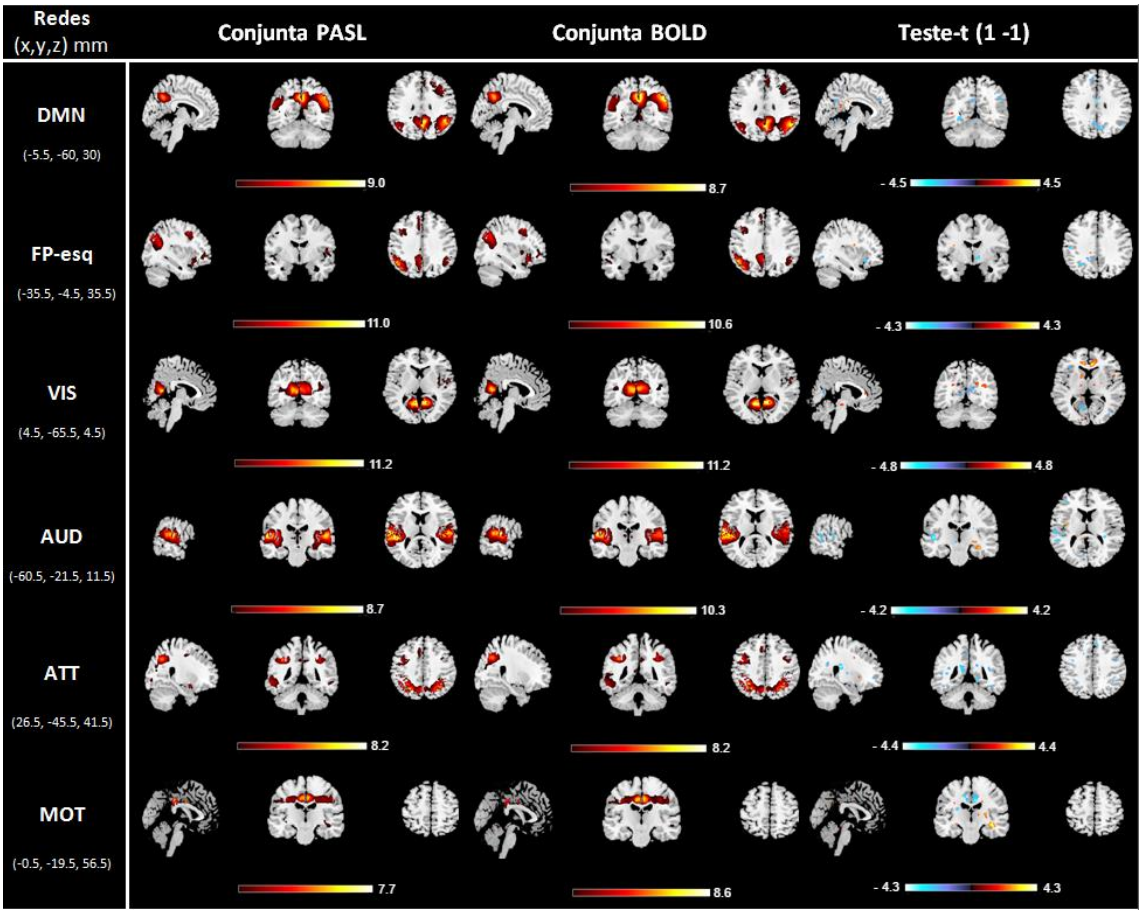


Figura 4.4: Redes cerebrais de repouso (mapas de z) obtidas por ICA na análise de grupo (N = 18) conjunta de imagens BOLD e imagens pBOLD adquiridas por PASL. DMN: *default mode network* (rede de modo padrão), FP-esq: frontoparietal esquerda, VIS: visual, AUD: auditiva, ATT: atentiva, MOT: motora.

Ainda em uma análise comparativa, calculamos os coeficientes de similaridade DICE (CS_{DICE}) entre as redes obtidas de cada análise conjunta, reconstruídas para cada técnica. Os resultados estão no gráfico da Figura 4.5, em que a numeração (1, 2 e 3) acompanhando o termo RS-BOLD refere-se a cada análise conjunta realizada entre a série temporal de BOLD e as séries de pBOLD obtidas por diferentes métodos de ASL.

Pode-se observar uma similaridade ($CS_{DICE} > 0,7$) entre as redes de ASL e BOLD obtidas pela análise conjunta em relação ao tamanho e posição das regiões que constituem as redes. Este resultado também pode ser observado nas Figuras 4.2 a 4.4. As redes com melhor convergência foram as obtidas por PASL, porém as redes obtidas por pCASL, principalmente com TE igual a 14 ms, também mostraram um bom resultado.

Entretanto, ao compararmos as redes obtidas pelas duas sequências de pCASL, com TEs diferentes, a similaridade se mostrou próxima a 50% para as redes auditiva e visual, e 30% para DMN e motora. Isso mostra que o valor de TE utilizado para a aquisição das imagens tem influência no número e distribuição espacial dos *voxels* pertencentes às redes de interesse.

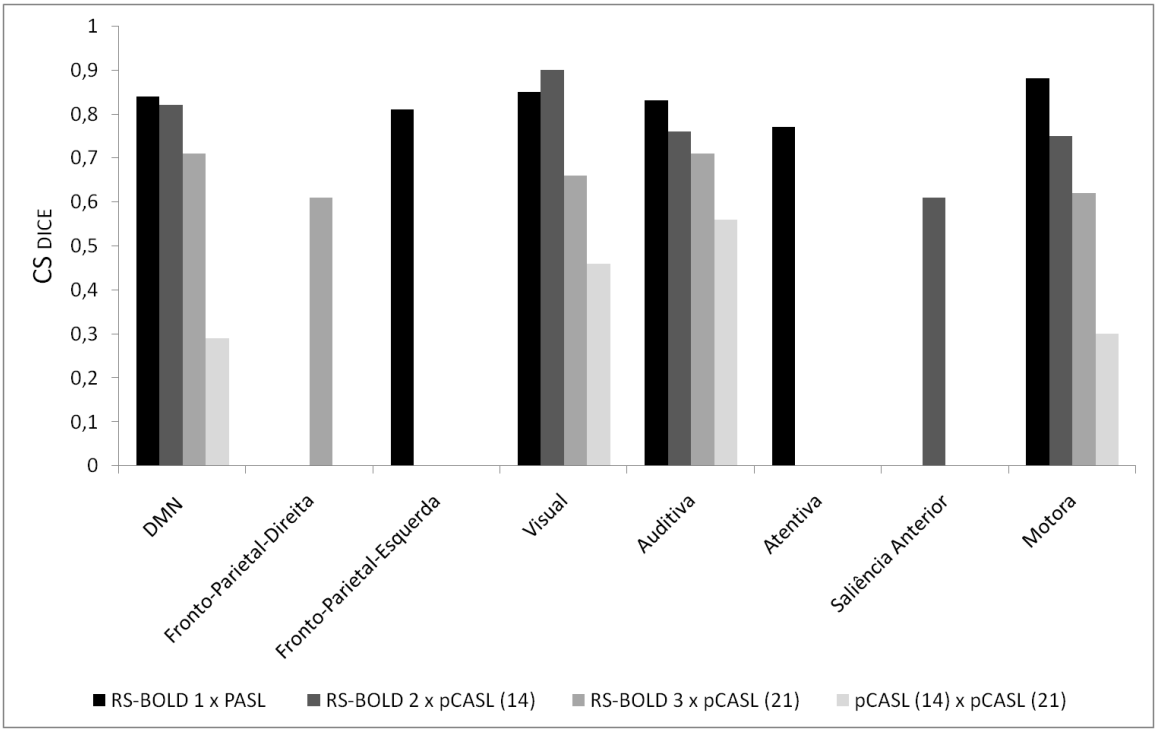


Figura 4.5: Coeficientes de Similaridade Dice (CS_{DICE}) entre as redes cerebrais de repouso obtidas pela análise conjunta com imagens de diferentes técnicas.

4.1.1.2. Análise Separada

Apesar de a análise conjunta com imagens BOLD ser normalmente utilizada para investigação das redes cerebrais de repouso em dados de ASL com ICA, um dos objetivos do presente estudo foi avaliar os resultados quando a análise é feita aplicando ICA para cada técnica separadamente. Assim, não há influência de uma modalidade de imagem no resultado da ICA de outra modalidade.

As redes de repouso encontradas em imagens BOLD estão apresentadas na Figura 4.6, sendo elas: DMN, frontoparietais direita e esquerda, visual, auditiva, atentiva, saliência anterior e motora.

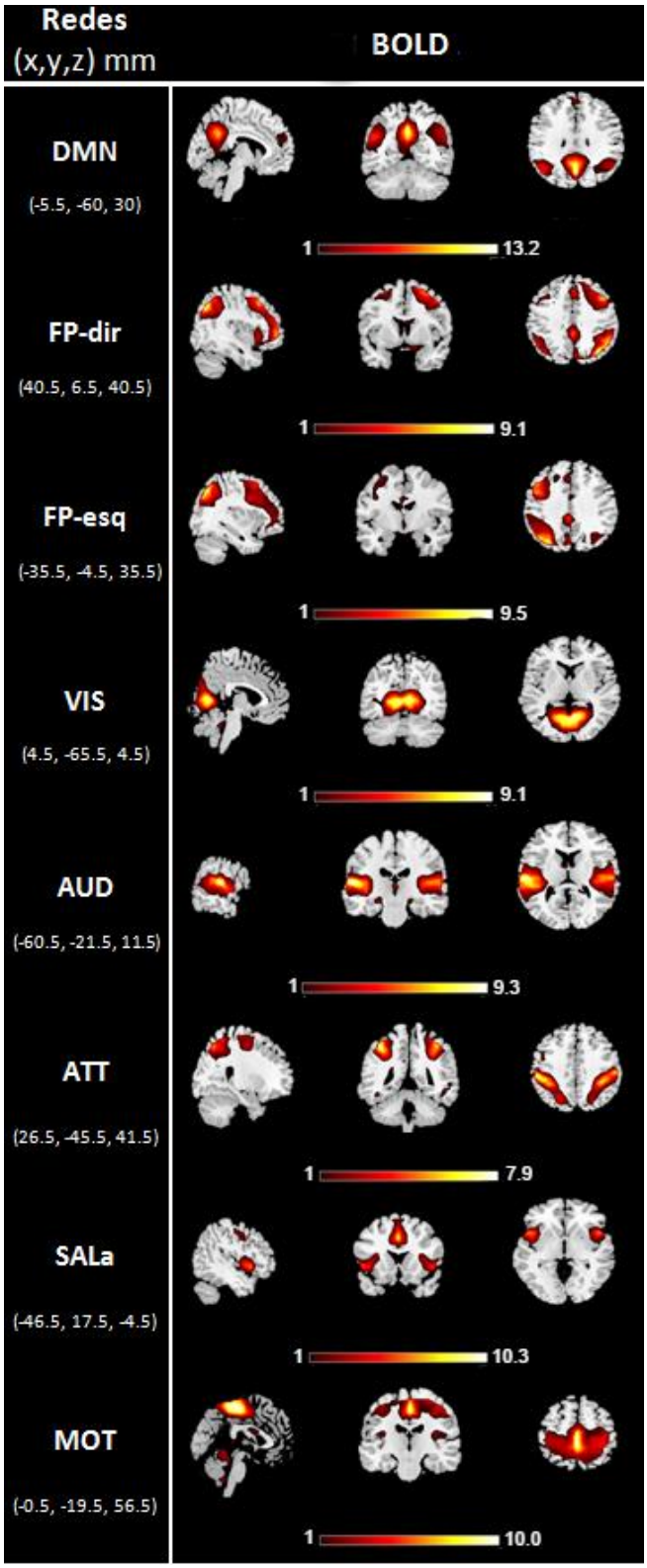


Figura 4.6: Redes cerebrais de repouso (mapas de z) obtidas por ICA na análise de grupo (N = 22) separada de imagens BOLD. DMN: *default mode network* (rede de modo padrão), FP-dir: frontoparietal direita, FP-esq: frontoparietal esquerda, VIS: visual, AUD: auditiva, ATT: atentiva, SALa: saliência anterior, MOT: motora.

Nas Figuras 4.7 a 4.9, estão apresentadas as redes cerebrais de repouso obtidas pela análise de imagens pBOLD adquiridas por pCASL e PASL, bem como o resultado dos testes t realizados para comparação das mesmas com as redes obtidas pela análise de imagens BOLD. Na Tabela 4.1 apresentamos um resumo dos resultados obtidos.

Observamos que, para a análise em grupo separada, os melhores resultados foram obtidos com PASL, em que cinco redes foram observadas. Para o caso de PASL com TE igual a 14 ms, três redes foram obtidas, porém com qualidade muito baixa, ou seja, redes bastante ruidosas. Já pra pCASL, para ambos os valores de TE, apenas duas redes foram observadas, DMN e visual, porém bastante nítidas.

Como esperado, as redes obtidas a partir de imagens de ASL apresentaram menor poder estatístico, resultando em diferenças significativas nos resultados dos testes-t.

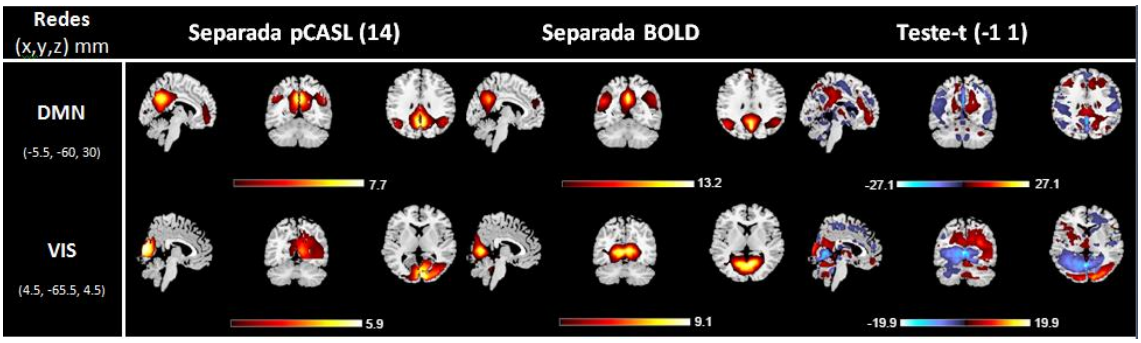


Figura 4.7: Redes cerebrais de repouso (mapas de z) obtidas por ICA na análise de grupo (N = 22) separada de imagens pBOLD adquiridas por pCASL (TE = 14 ms). DMN: *default mode network* (rede de modo padrão), VIS: visual.

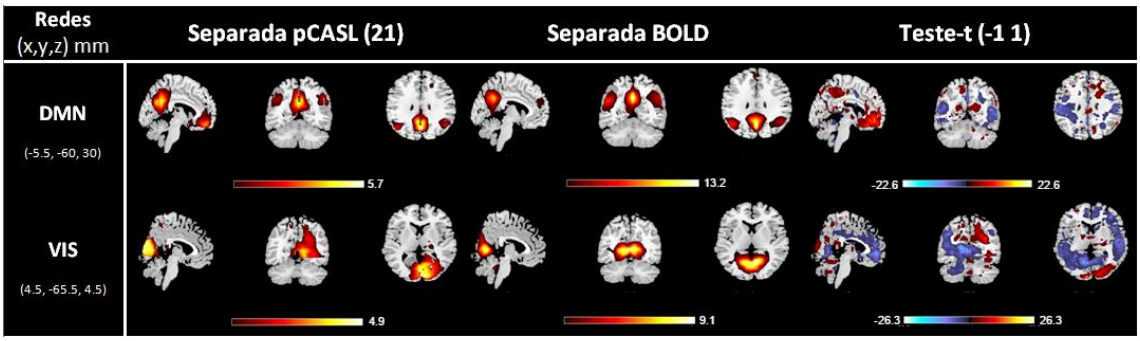


Figura 4.8: Redes cerebrais de repouso (mapas de z) obtidas por ICA na análise de grupo (N = 7) separada de imagens pBOLD adquiridas por pCASL (TE = 21 ms). DMN: *default mode network* (rede de modo padrão), VIS: visual.

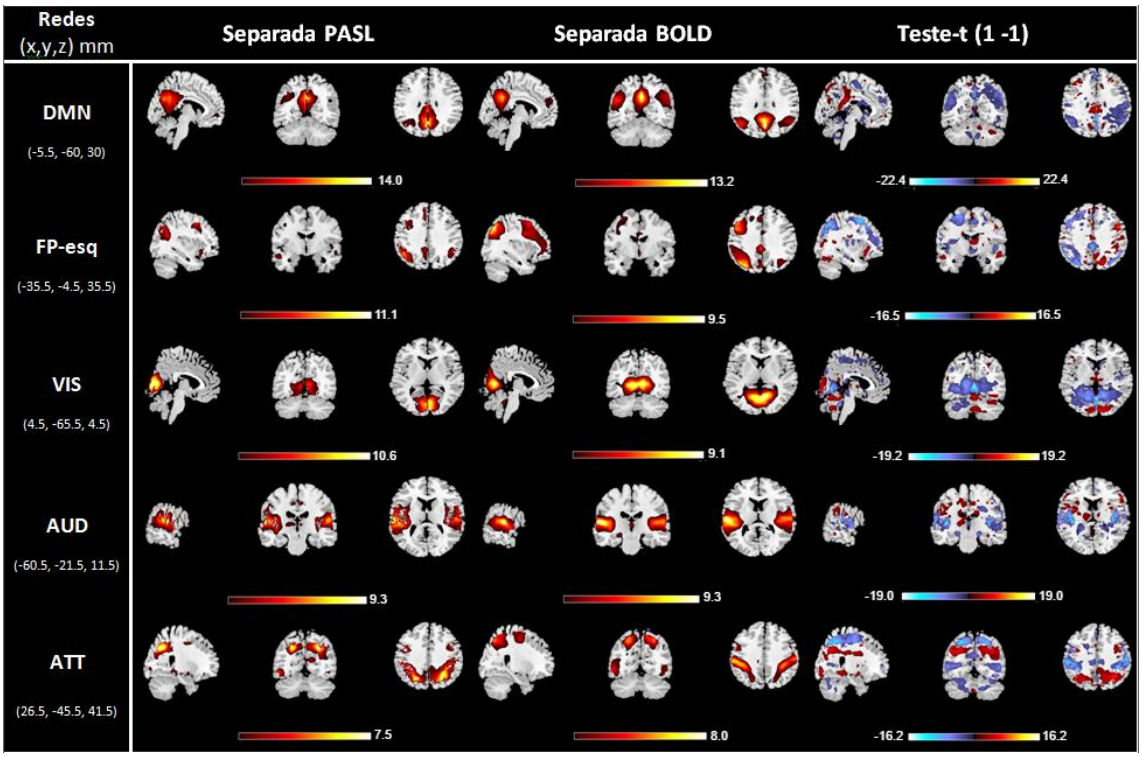


Figura 4.9: Redes cerebrais de repouso (mapas de z) obtidas por ICA na análise de grupo (N = 18) separada de imagens pBOLD adquiridas por PASL. DMN: *default mode network* (rede de modo padrão), FP-esq: Frontoparietal esquerda, VIS: visual, AUD: auditiva, ATT: atentiva.

Tabela 4.1: Ocorrência das redes cerebrais de repouso utilizando a análise em grupo separada.

Rede / Ocorrência	BOLD	pBOLD			
		pCASL (14)	pCASL (21)	PASL (14)*	PASL (21-24)
	N = 23	N = 22	N = 7	N = 4	N = 18
DMN	X	X	X	X	X
Frontoparietal direita	X				X
Frontoparietal esquerda	X				X
Visual	X	X	X	X	X
Auditiva	X				X
Atentiva	X				
Saliência anterior	X				X
Motora	X			X	X

Os números entre parêntesis indicam o valor de TE usado na aquisição das imagens.
* Redes com bastante ruído, difíceis de serem identificadas.

Além da reconstrução das componentes para o grupo, é possível reconstruí-las para cada indivíduo. As Figuras 4.10 e 4.11 apresentam duas redes de repouso, DMN e visual, para imagens obtidas com pCASL (TE = 14 ms) e PASL, de dois indivíduos. É possível observar a variabilidade existente entre os sujeitos.

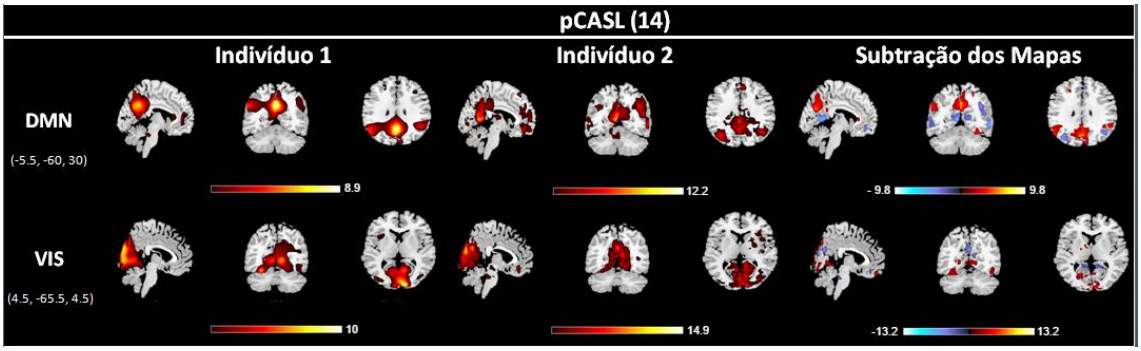


Figura 4.10: Redes cerebrais de repouso (mapas de z) reconstruídas para dois indivíduos, a partir da ICA da análise de grupo separada de imagens pBOLD adquiridas por pCASL (TE = 14 ms). DMN: *default mode network* (rede de modo padrão), VIS: visual.

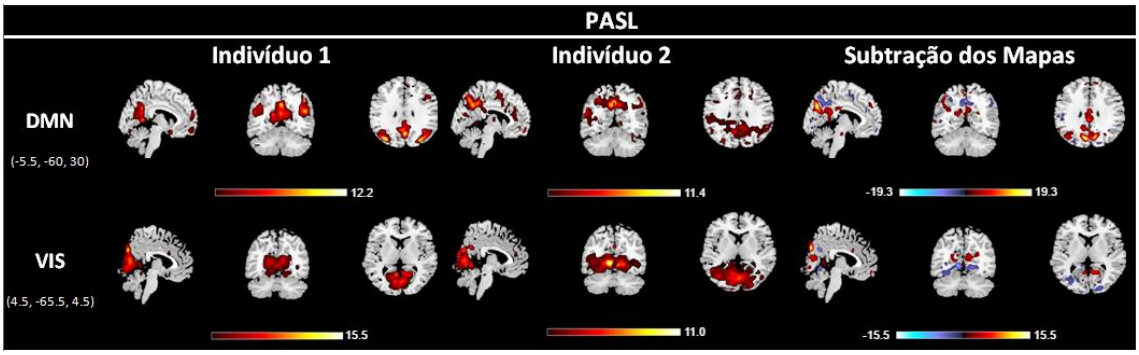


Figura 4.11: Redes cerebrais de repouso (mapas de z) reconstruídas para dois indivíduos, a partir da ICA da análise de grupo separada de imagens pBOLD adquiridas por PASL. DMN: *default mode network* (rede de modo padrão), VIS: visual.

Novamente, optamos por calcular o CS_{DICE} para quantificar a similaridade entre as redes de repouso. Neste caso, comparamos as redes médias obtidas para o grupo na análise separada de cada técnica.

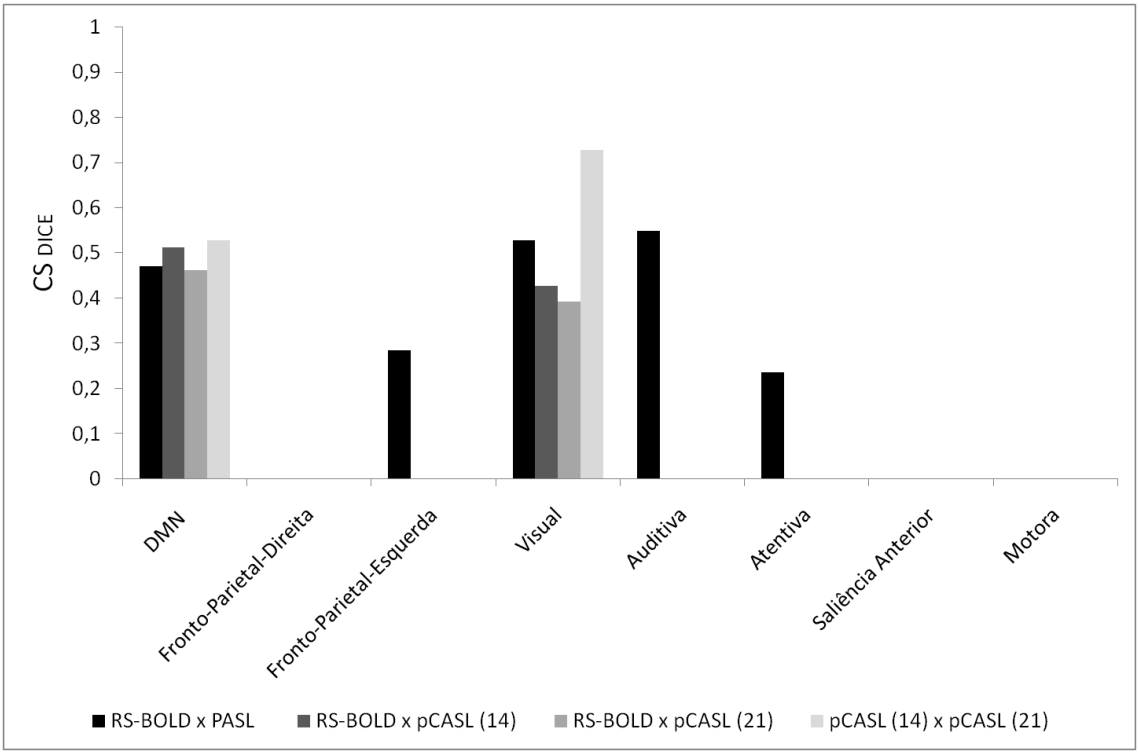


Figura 4.12: Coeficientes de Similaridade Dice (CS_{DICE}) entre as redes cerebrais de repouso obtidas por análises em grupo, separadas para cada técnica.

Comparando os resultados apresentados nas Figuras 4.5 e 4.12, é possível observar que a similaridade entre as redes é menor para o caso da análise separada. Isso era esperado já que nesse caso as séries temporais de BOLD não influenciaram nos resultados das séries temporais obtidas por ASL. Além disso, mais uma vez os resultados mostram que dados obtidos por PASL se apresentam melhores na comparação com BOLD.

Devemos ressaltar que apresentamos os resultados para séries temporais de pBOLD, pois não foi possível obter redes de repouso com as séries temporais de CBF. Além disso, os resultados obtidos para a análise em grupo com as séries temporais de perfusão foram ruins, mesmo para a análise conjunta, apresentando componentes com bastante ruído, dificultando a identificação das redes.

4.1.2. Análise Individual

Além das análises em grupo, foi realizada também uma análise individual, aplicando ICA para os dados de cada indivíduo, apenas uma técnica por vez, a fim de se

conhecer o desempenho de cada técnica separadamente e assim, investigar a viabilidade de estudar redes cerebrais de repouso individualmente com ASL.

As análises individuais também foram desenvolvidas com as séries temporais de imagens BOLD, e com as séries temporais de pBOLD, bem como de mapas de perfusão, obtidas por pCASL e PASL. No caso das séries temporais de CBF obtidas a partir de pCASL, para ambos os valores de TE, poucas redes foram observadas, sendo DMN e visual as mais recorrentes. Similarmente ao que ocorreu com as análises em grupo, para os mapas de CBF, os resultados apresentaram qualidade muito abaixo daquela obtida com imagens BOLD e pBOLD.

Nos gráficos da Figura 4.13 estão apresentadas as frequências de ocorrência das redes de repouso obtidas com as séries temporais de perfusão e pBOLD, em comparação com a técnica BOLD.

Nas análises individuais, as redes que não obtiveram expressão no grupo, porém presentes no sujeito puderam ser vistas. Nesta análise, portanto, as redes de cada indivíduo foram identificadas considerando apenas seus próprios dados, não sofrendo influências de um grupo de sujeitos, como na análise em grupo “separada”, ou técnicas, como na análise em grupo “conjunta”.

A maior frequência das redes DMN e visual mostra que é possível estudá-las, no estado de repouso, em um único indivíduo com a técnica de ASL, sendo que os resultados com as imagens adquiridas por PASL foram os que mais se aproximaram dos resultados de BOLD. O melhor desempenho do método pulsado pode estar associado à sua maior frequência de amostragem, devido ao menor TR utilizado na aquisição das imagens, e maior contaminação BOLD.

Para as imagens pBOLD, os resultados mostraram maior número de redes de repouso (Figura 4.13a) do que para os mapas de perfusão (Figura 4.13b). Além disso, para ambas as aquisições de pCASL (TE = 14 ms e TE = 21 ms), a ocorrências das redes foi baixa e os resultados foram similares, sendo difícil escolher um valor de TE como sendo o melhor para o estudo individual do cérebro em repouso.

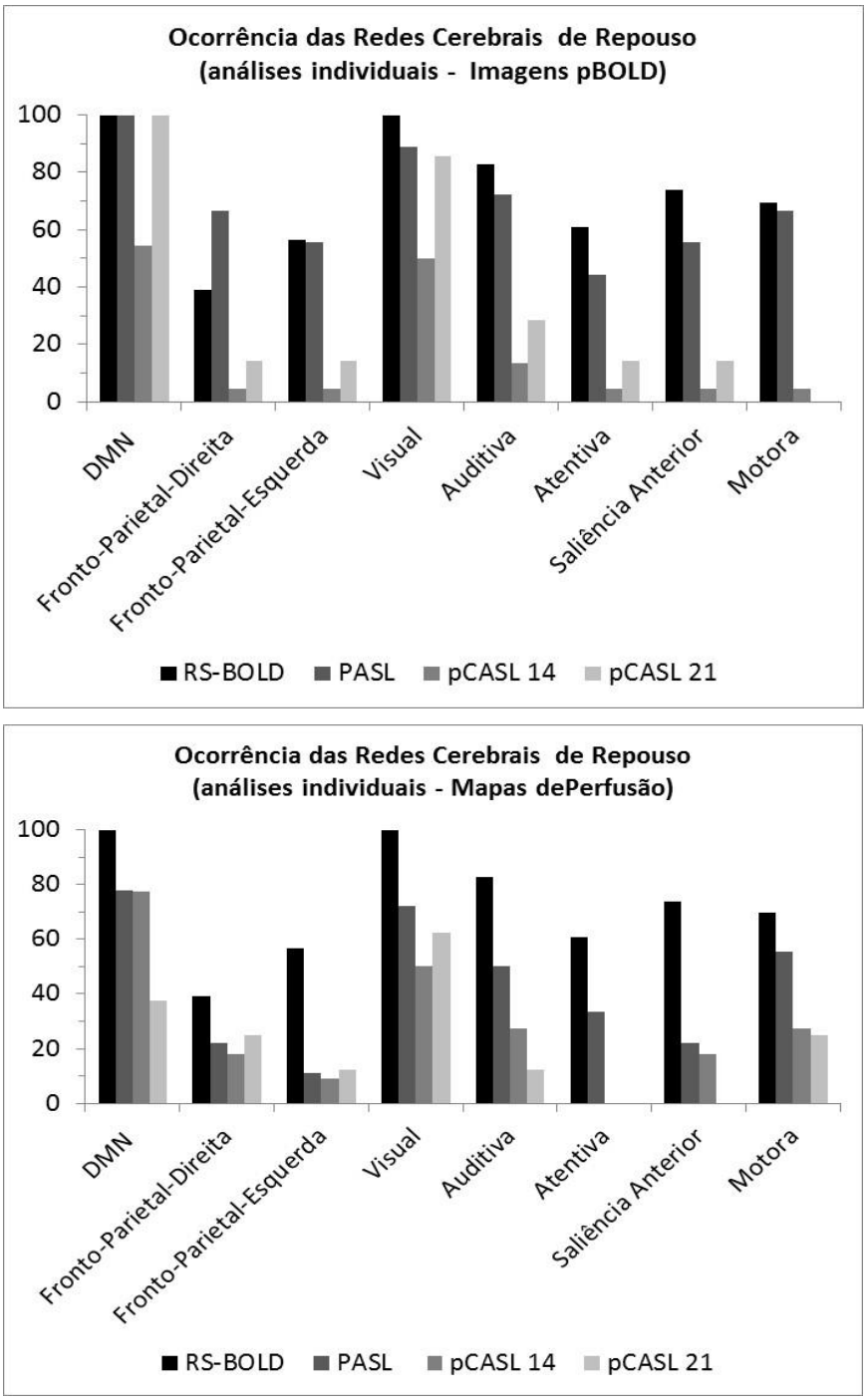


Figura 4.13: Frequência de ocorrência das redes cerebrais de repouso obtidas com a análise individual realizada (a) nas imagens pBOLD e (b) nos mapas de perfusão. As frequências obtidas com as imagens BOLD estão apresentadas para comparação.

Em resumo, os resultados apresentados tanto para as análises em grupo quanto para as análises individuais, mostram que é possível estudar as redes cerebrais de repouso com ASL, porém com algumas limitações. Considerando que os melhores resultados

ocorreram para a análise em grupo conjunta e com PASL, pode-se inferir que as diferenças em relação às redes obtidas por imagens BOLD estão relacionadas com as limitações da técnica de ASL, como RSR e resolução temporal baixas. Além disso, a natureza de cada sinal, BOLD e perfusão, são diferentes, também influenciando nos resultados. Esses pontos serão discutidos no próximo capítulo.

A seguir estão apresentados os resultados de algumas análises feitas para investigar o que foi inferido acima.

4.1.3. Resolução Temporal

Nos resultados mostrados nas seções anteriores, as análises foram feitas utilizando todos os dados da maneira como foram adquiridos; assim, imagens BOLD, de PASL e de pCASL tinham resoluções temporais iguais a 2, 6 e 8 segundos, respectivamente. Ou seja, como cada sequência foi adquirida durante dez minutos de repouso, as séries temporais tinham 300, 100 e 75 dinâmicos, respectivamente, para BOLD, PASL e pCASL.

Com o objetivo de avaliar a influência do TR na obtenção das redes, diminuímos a resolução temporal da série de imagens BOLD, re-amostrando a série de imagens com 300 dinâmicos (TR = 2 s) para ficar com 75 e 50 dinâmicos, o que seria equivalente a aquisições com TRs de 8 e 12 segundos, respectivamente. Portanto, não foram feitas novas aquisições de imagens BOLD com diferentes TRs.

Na Tabela 4.2 apresentamos a ocorrência das redes cerebrais de repouso obtidas com as análises em grupo para todos os TR testado.

Nesta análise comparativa englobando alterações de resolução temporal das séries BOLD, vemos que o efeito deste parâmetro torna-se relevante a partir de TR igual a 12s, mostrando um resultado semelhante ao obtido com as séries pBOLD de PASL. Neste caso, a série temporal possui um TR de 3s para cada volume (imagens controle e marcada), resultando em um TR final de 6s para a série temporal.

É válido ressaltar que a significância estatística das componentes apresentadas é reduzida para todas as redes, conforme o aumento do TR (Figura 4.14). Tal resultado condiz com o esperado, devido à redução da taxa amostral das séries temporais. Esta redução resultou na não identificação de três redes de repouso para TR = 12 s.

Além disso, a similaridade entre as redes obtidas foi maior do que 80% apenas para uma comparação (Tabela 4.3), mostrando que a taxa de amostragem dos dados é

fator importante tanto na observação do fenômeno e no desempenho da ICA. É interessante ressaltar que nessa comparação, os dados apenas foram re-amostrados, portanto refletem um mesmo estado de repouso, diferentemente das comparações entre BOLD e ASL, em que as imagens foram adquiridas separadamente.

Portanto, foi possível observar que a resolução temporal influencia no desempenho da ICA em obter as redes cerebrais de repouso; entretanto, a resolução temporal apenas não é determinante para as diferenças encontradas entre BOLD e ASL.

Tabela 4.2: Ocorrência das redes cerebrais de repouso utilizando a análise em grupo separada para imagens BOLD com diferentes resoluções temporais.

Rede / Ocorrência	BOLD		
	TR = 2 s	TR = 8 s	TR = 12 s
DMN	X	X	X
Frontoparietal direita	X	X	
Frontoparietal esquerda	X	X	X
Visual	X	X	X
Auditiva	X	X	X
Atentiva	X	X	
Saliência anterior	X	X	
Motora	X	X	X

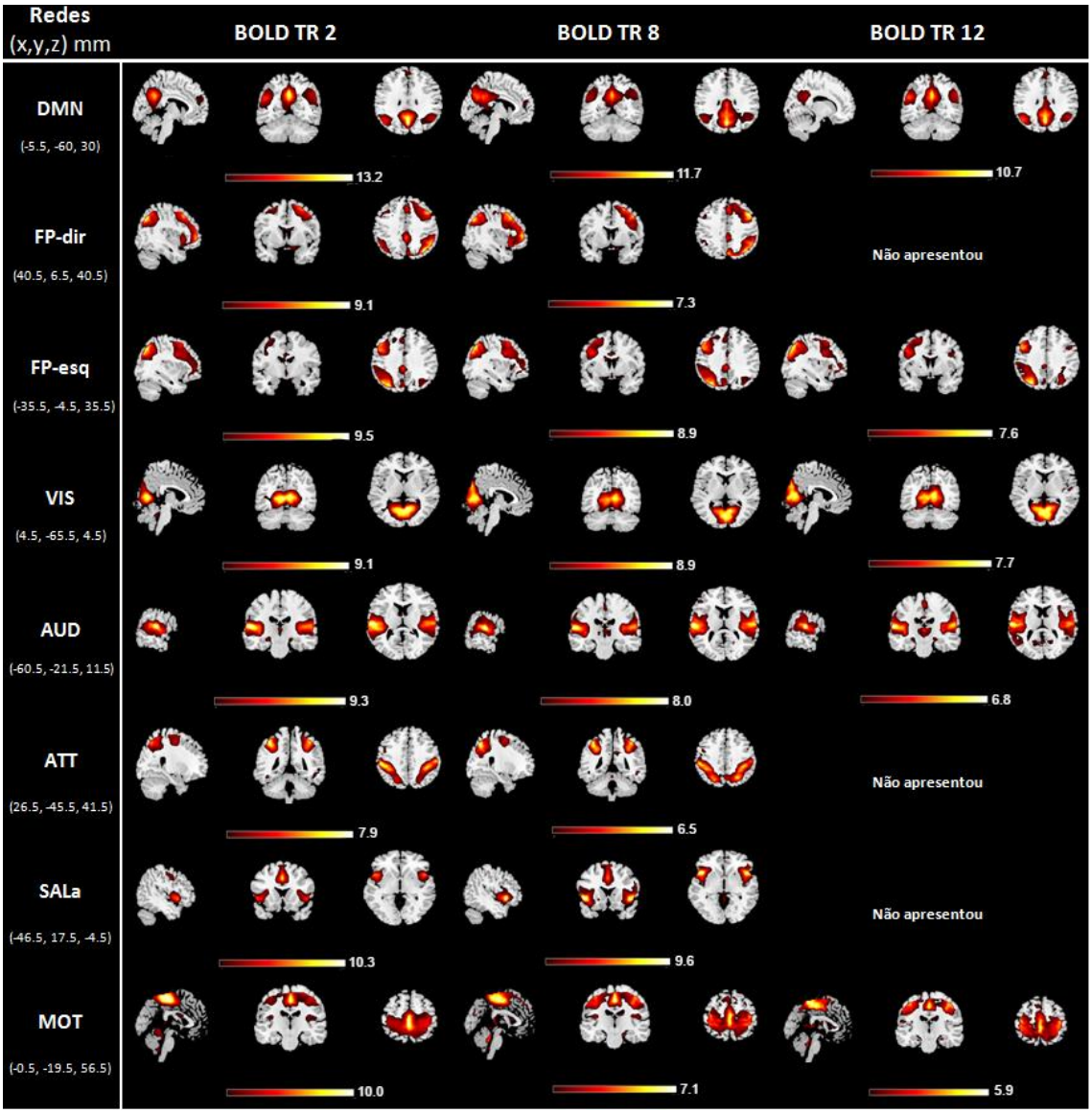


Figura 4.14: Redes cerebrais de repouso (mapas de z) obtidas por ICA na análise de grupo (N = 22) separada de imagens BOLD com diferentes resoluções temporais (2, 8 e 12 s). DMN: *default mode network* (rede de modo padrão), FP-dir: frontoparietal direita, FP-esq: frontoparietal esquerda, VIS: visual, AUD: auditiva, ATT: atentiva, SALa: saliência anterior, MOT: motora.

Tabela 4.3: Coeficientes de similaridade DICE entre as redes cerebrais de repouso obtidas por imagens BOLD com diferentes resoluções temporais.

Rede	BOLD		
	TR 2 x TR 8	TR 2 x TR 12	TR 8 x TR 12
DMN	0.64	0.78	0.71
Frontoparietal direita	0.64	-	-
Frontoparietal esquerda	0.78	0.55	0.55
Visual	0.76	0.78	0.91
Auditiva	0.73	0.62	0.74
Atentiva	0.66	-	-
Saliência anterior	0.48	-	-
Motora	0.68	0.47	0.59

4.1.4. Relação Sinal-Ruído

Outro fator que pode influenciar na qualidade das redes obtidas é a RSR. Portanto, calculamos a RSR para a substância cinzenta, que deve apresentar intensidade de sinal homogênea no cérebro, para cada indivíduo e técnica utilizada (BOLD, PASL e pCASL).

A Figura 4.15 apresenta a RSR ao longo dos 75 dinâmicos das séries obtidas a partir de pCASL (TE = 14 ms) e de sua BOLD "equivalente" (TR = 8 s). Pode-se observar a estabilidade da RSR ao longo dos dinâmicos de BOLD e pBOLD, melhores do que para as séries de perfusão e CBF, que apresentaram uma oscilação maior, porém ainda bem delimitada.

Os valores médios da RSR para todos os indivíduos e dinâmicos estão na Figura 4.16. As relações sinal-ruído para os dados de perfusão e CBF foram significativamente menores ($p < 0,01$), quase metade daquela apresentada pelos dados de BOLD. Já os dados de pBOLD apresentou RSR cerca de 17% maior do que para BOLD, o que pode ser explicado pelo fato de que as imagens pBOLD são obtidas por uma média das imagens controle e marcada, tendo seu ruído aleatório minimizado.

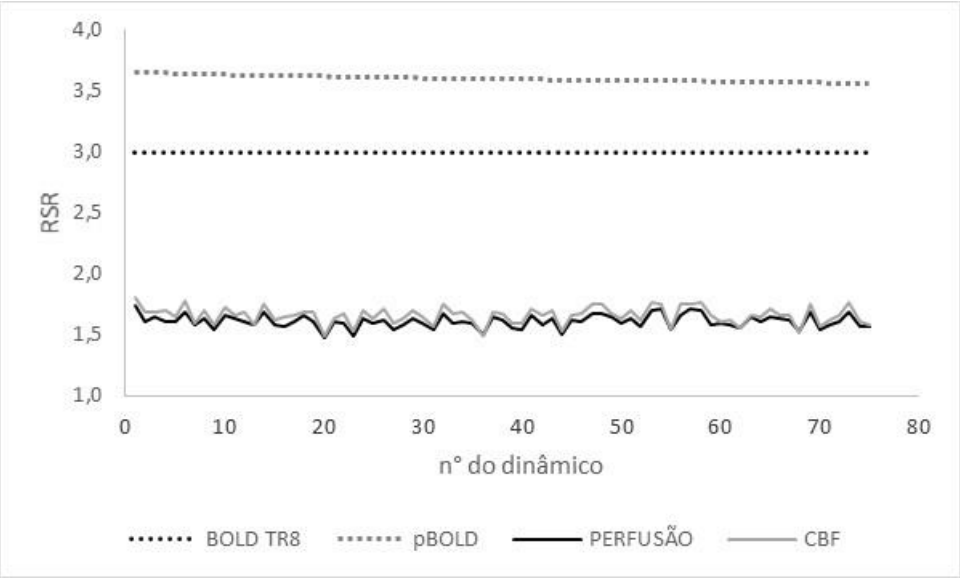


Figura 4.15: Relação sinal-ruído (RSR) média, calculada a partir do valor de cada indivíduo, ao longo dos 75 dinâmicos para as imagens BOLD com TR = 8 s e imagens de pBOLD, perfusão e CBF obtidas a partir de pCASL (TE = 14 ms).

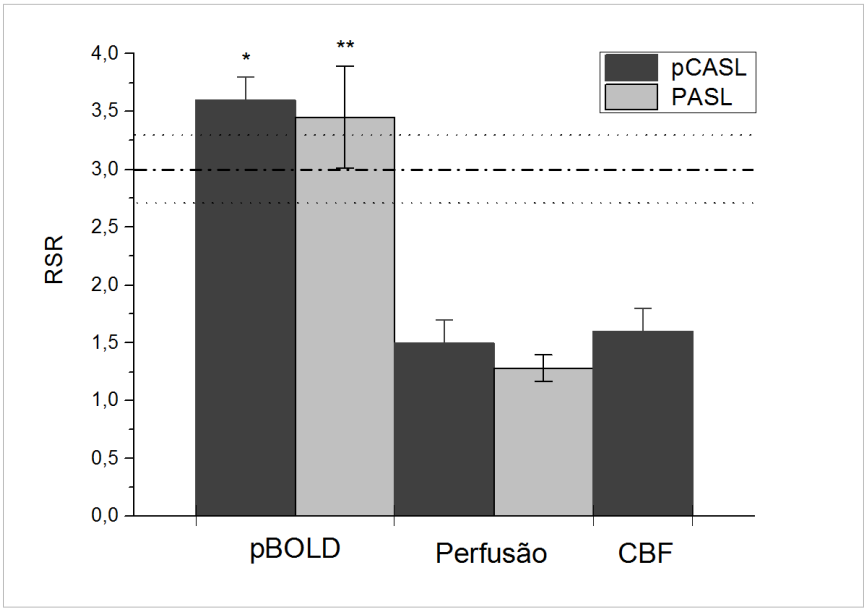


Figura 4.16: Relação sinal-ruído (RSR) média, calculada a partir do valor de cada indivíduo, para imagens de pBOLD, perfusão e CBF obtidas a partir de pCASL (TE = 14 ms) e PASL. As barras de erro representam o desvio padrão. As linhas pontilhadas representam o valor da RSR obtida com BOLD (TR = 2 s), e seu desvio padrão. * $p < 0,01$ e ** $p < 0,0001$ vs. outros parâmetros da mesma técnica.

As relações sinal-ruído das séries BOLD para TR de 8 e 12 s foram, respectivamente, 3,0 ± 0,3 e 3,1 ± 0,4, não apresentando diferença estatística para o caso do TR de 2 s mostrado na Figura 4.16 (3,0 ± 0,3, p = 0,67).

Portanto, por esses resultados, também podemos inferir que a RSR é importante, mas não é o único fator responsável pelo menor número de redes identificadas pelas técnicas de ASL.

Além disso, observamos que as RSR médias para as séries de perfusão e CBF, calculadas para cada indivíduo, estão correlacionadas com o CBF basal de cada um deles. A Figura 4.17 exemplifica esse resultado para os dados de CBF obtidos por pCASL (TE = 14 ms).

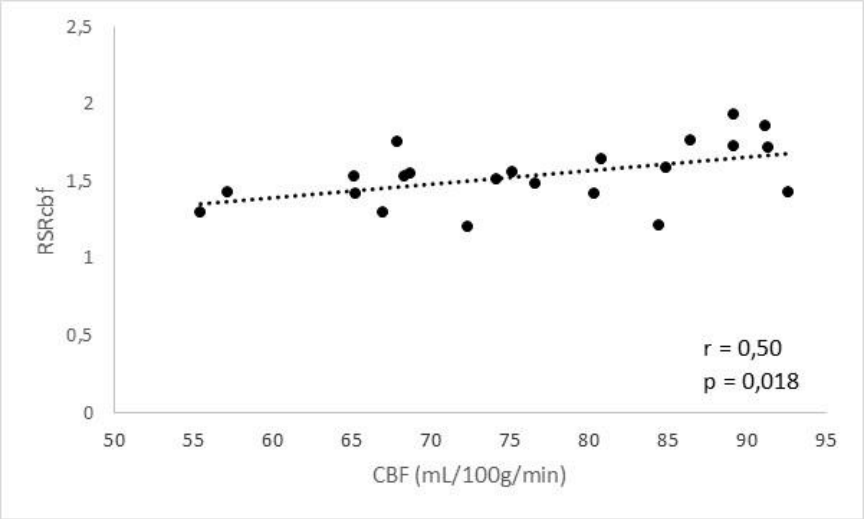


Figura 4.17: Correlação entre a relação sinal-ruído (RSR) média e o CBF basal da substância cinzenta, calculados para cada indivíduo, a partir das imagens de CBF obtidas por pCASL (TE = 14 ms).

4.1.5. Espectro do Sinal

As flutuações da intensidade de sinal ao longo do tempo, e seus espectros de frequências, também foram obtidos para as séries temporais de ASL (pBOLD, perfusão e CBF), bem como para a série temporal de BOLD. Nas Figuras 4.20 e 4.21, apresentamos os resultados para pCASL (TE = 14 ms).

Pela Figura 4.18, já é possível observar que os dados de pCASL possuem componentes de mais alta frequência se comparados com o dado de BOLD. Isso é mais bem visualizado na Figura 4.19. Apesar de também apresentar alta amplitude para frequências que compõem as redes cerebrais de repouso (0,05 a 0,1 Hz), os dados de ASL apresentam maiores amplitudes na banda de sinal não desejável, de mais altas frequências, do que os dados de BOLD.

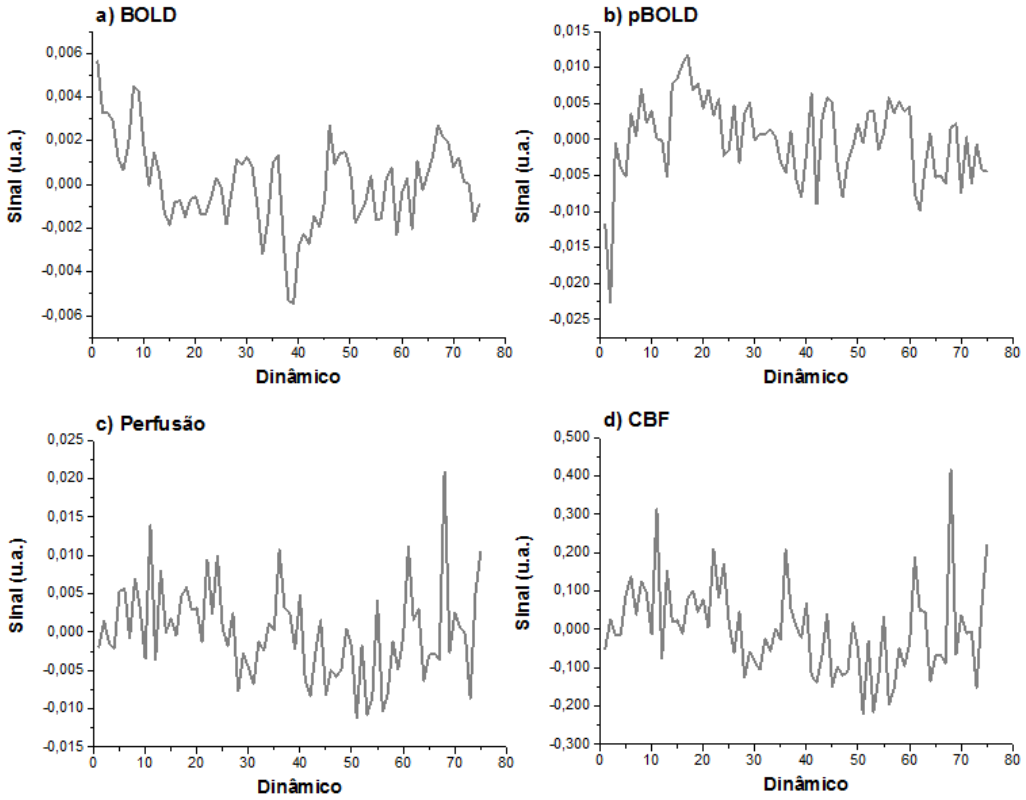


Figura 4.18: Flutuações espontâneas do sinal médio da substância cinzenta. (a) Série temporal BOLD (TR = 2s, 75 volumes). (b, c, d) Séries temporais de pBOLD, perfusão e CBF, obtidas com pCASL (TE = 14 ms).

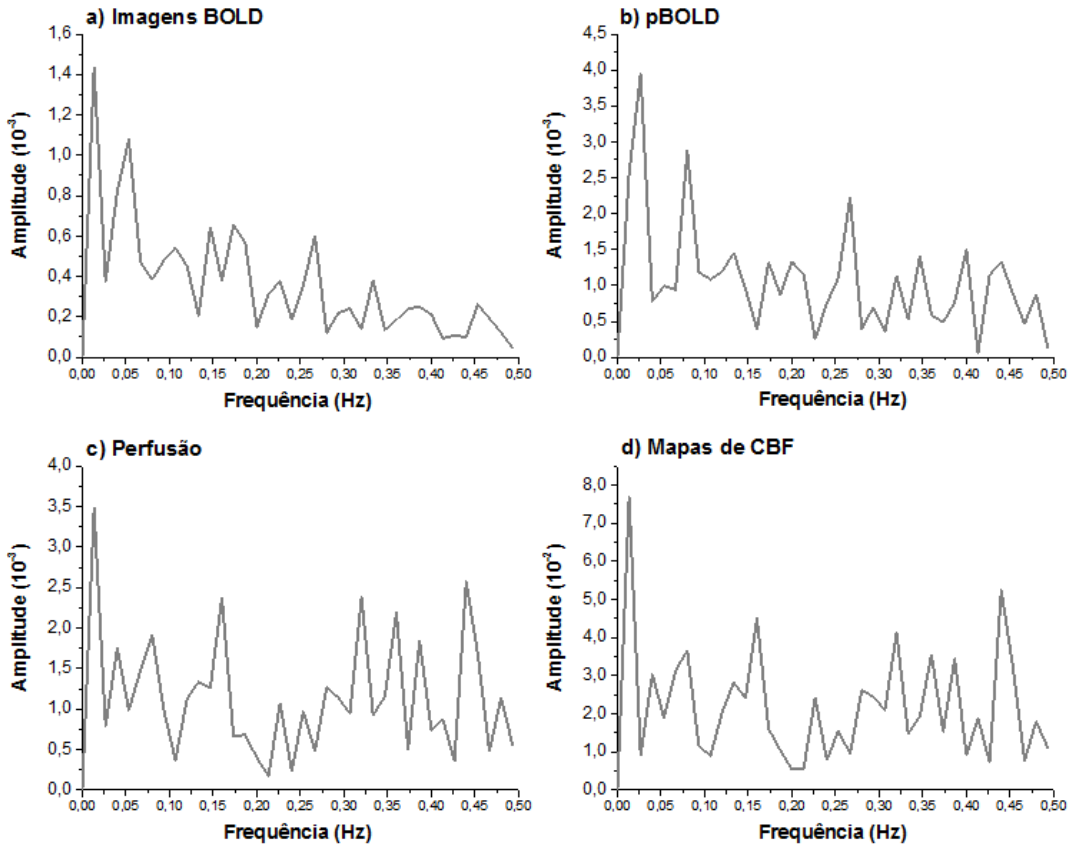


Figura 4.19: Espectros de frequência das flutuações espontâneas do sinal médio da substância cinzenta. (a) Série temporal BOLD (TR = 2s, 75 volumes). (b, c, d) Séries temporais de pBOLD, perfusão e CBF, obtidas com pCASL (TE = 14 ms).

4.2. FLUXO SANGUÍNEO CEREBRAL BASAL

O fluxo sanguíneo cerebral basal foi calculado utilizando a Equação 3.2, conforme descrito na Metodologia, para os 75 pares de imagens controle/marcada adquiridos por pCASL com dois diferentes valores de TE. A partir desses valores, obtivemos dois mapas médios de CBF para cada indivíduo, um para cada TE, que foram utilizados para calcular os valores de CBF para diferentes regiões cerebrais.

Primeiramente, para analisar a influência do TE na quantificação do CBF, foram calculados os valores de CBF da substância cinzenta, utilizando as máscaras obtidas com a segmentação realizada na imagem anatômica. A Figura 4.20 mostra os resultados obtidos.

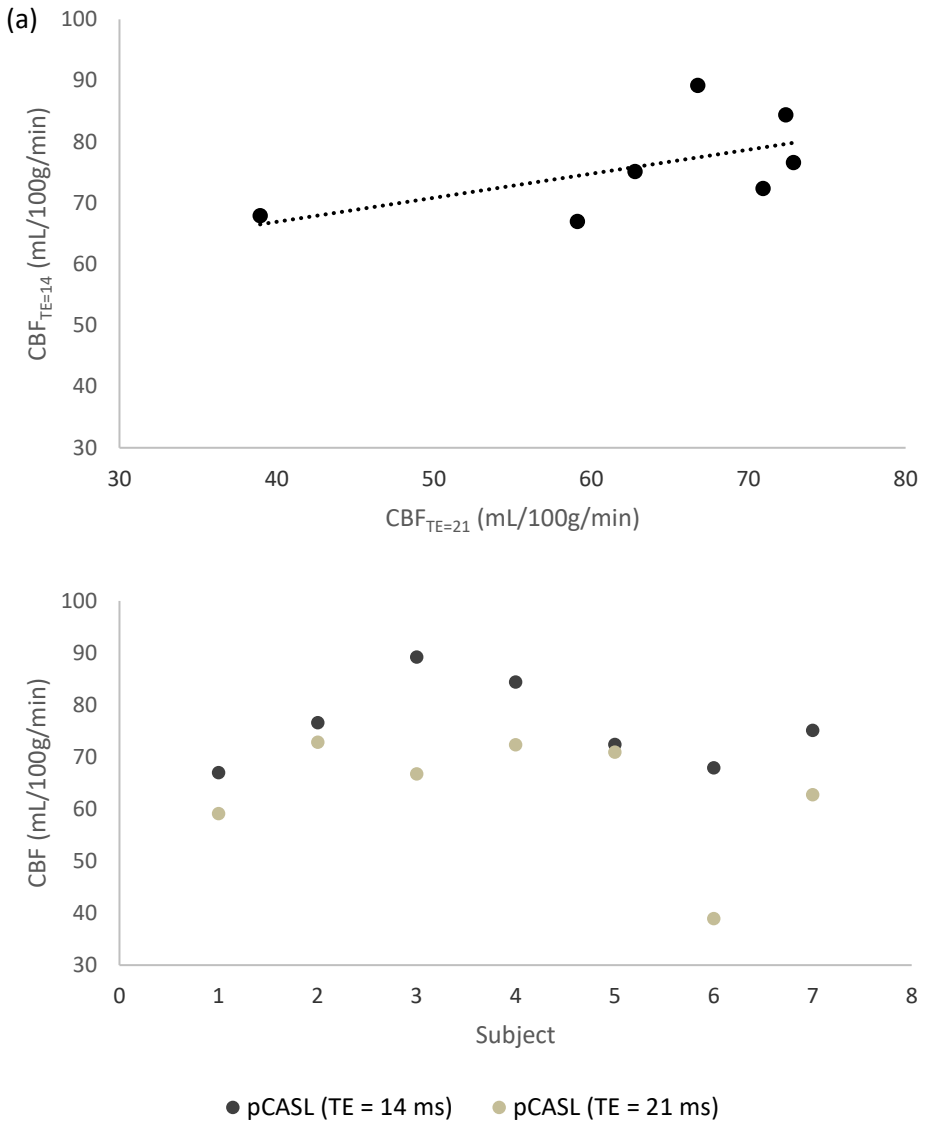


Figura 4.20: (a) Relação entre os valores de fluxo sanguíneo cerebral (CBF) basal, na substância cinzenta, de sete indivíduos, obtidos por imagens de pCASL com valores de TE iguais a 14 ms (eixo vertical) e 21 ms (eixo horizontal). O coeficiente de correlação de Pearson é igual a 0,57 (p = 0,18). (b) Os mesmos valores de CBF do item (a) apresentados de maneira diferente para que as diferenças entre os sujeitos possam ser mais bem observadas. Teste t bicaudal mostrou diferença significativa (p = 0,038).

Apesar do coeficiente de correlação de Pearson ter sido alto (r = 0,57), não houve significância estatística para a relação entre os valores de CBF para diferentes TEs (p = 0,18), o que pode estar relacionado ao tamanho pequeno da amostra (N = 7 indivíduos). Já o teste t bicaudal realizado para as duas amostras mostrou que há uma diferença estatística entre esses valores de CBF (p = 0,038). Esses resultados mostram que os

valores obtidos com diferentes TEs podem estar relacionados, o que era esperado, porém são diferentes, pois quanto maior o valor de TE, maior é a taxa de contaminação do sinal BOLD. Portanto, o ideal para a quantificação do CBF é utilizar um valor de TE mais baixo; no nosso caso, igual a 14 ms.

Como os resultados obtidos para as redes de repouso foram similares para dados adquiridos com pCASL para os dois valores de TE, porém a quantificação foi prejudicada para TE igual a 21 ms, decidimos prosseguir com as análises de CBF com dados adquiridos com TE igual a 14 ms.

A partir dos mapas das redes de repouso obtidos para as análises em grupo, conjunta e separada, construímos máscaras espaciais das redes DMN, visual, auditiva, saliência anterior e motora, para avaliar os valores de CBF nessas regiões.

As relações entre os valores individuais de CBF obtidos a partir das máscaras das redes de pBOLD (pCASL, TE = 14 ms) e das redes de BOLD estão apresentadas nas Figuras 4.23 (para a análise em grupo conjunta) e 4.24 (para a análise em grupo separada).

Como visto na seção anterior, as redes de repouso para as análises em grupo, conjunta e separada, foram similares para pBOLD e BOLD. Portanto, era esperado que os valores de CBF calculados nessas regiões para os dois casos fossem fortemente correlacionados, como foi observado. Entretanto, observa-se que os coeficientes de correlação de Pearson são menores para o caso da análise em grupo separada, em que as

redes foram menos similares, como também pode ser visto pelo tamanho de cada rede (Figura 4.23).

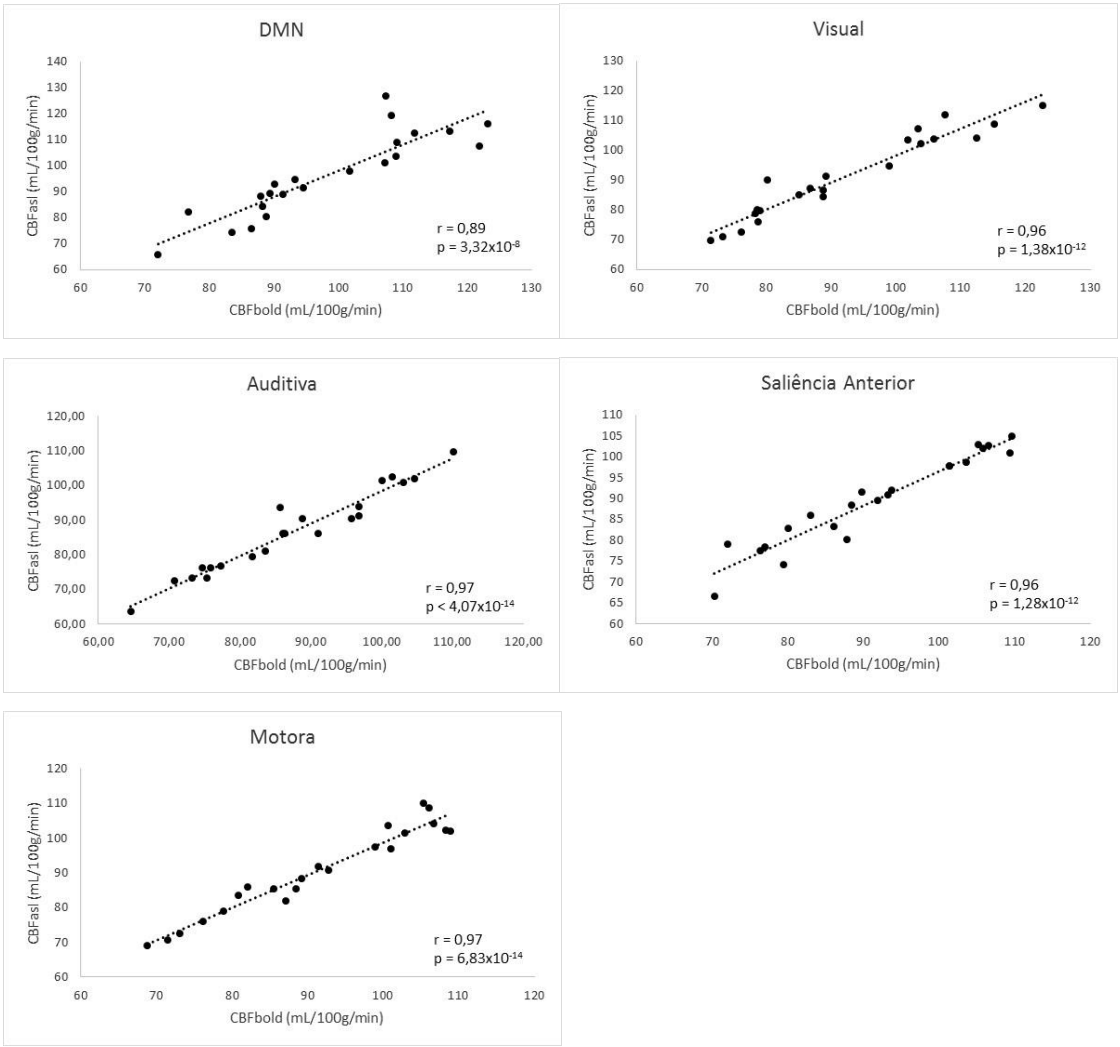


Figura 4.21: Relação entre os valores médios de CBF, para cada indivíduo, obtidos a partir das máscaras espaciais das redes de pBOLD (CBFasl) e BOLD (CBFbold), das análises em grupo conjuntas.

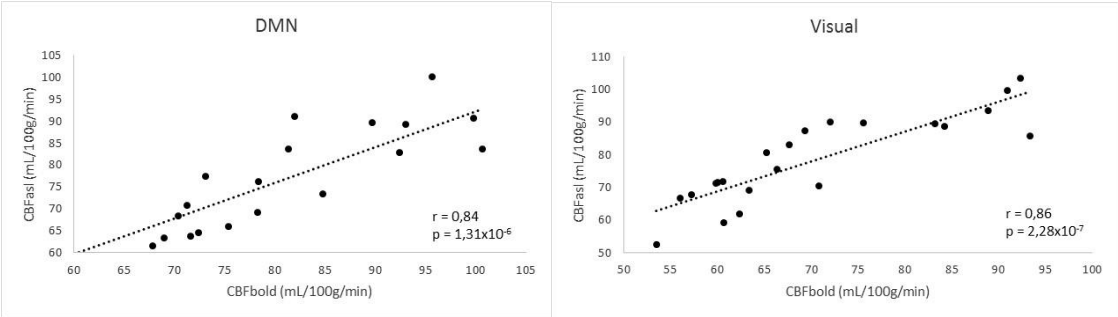


Figura 4.22: Relação entre os valores médios de CBF, para cada indivíduo, obtidos a partir das máscaras espaciais das redes de pBOLD (CBFasl) e BOLD (CBFbold), das análises em grupo separadas.

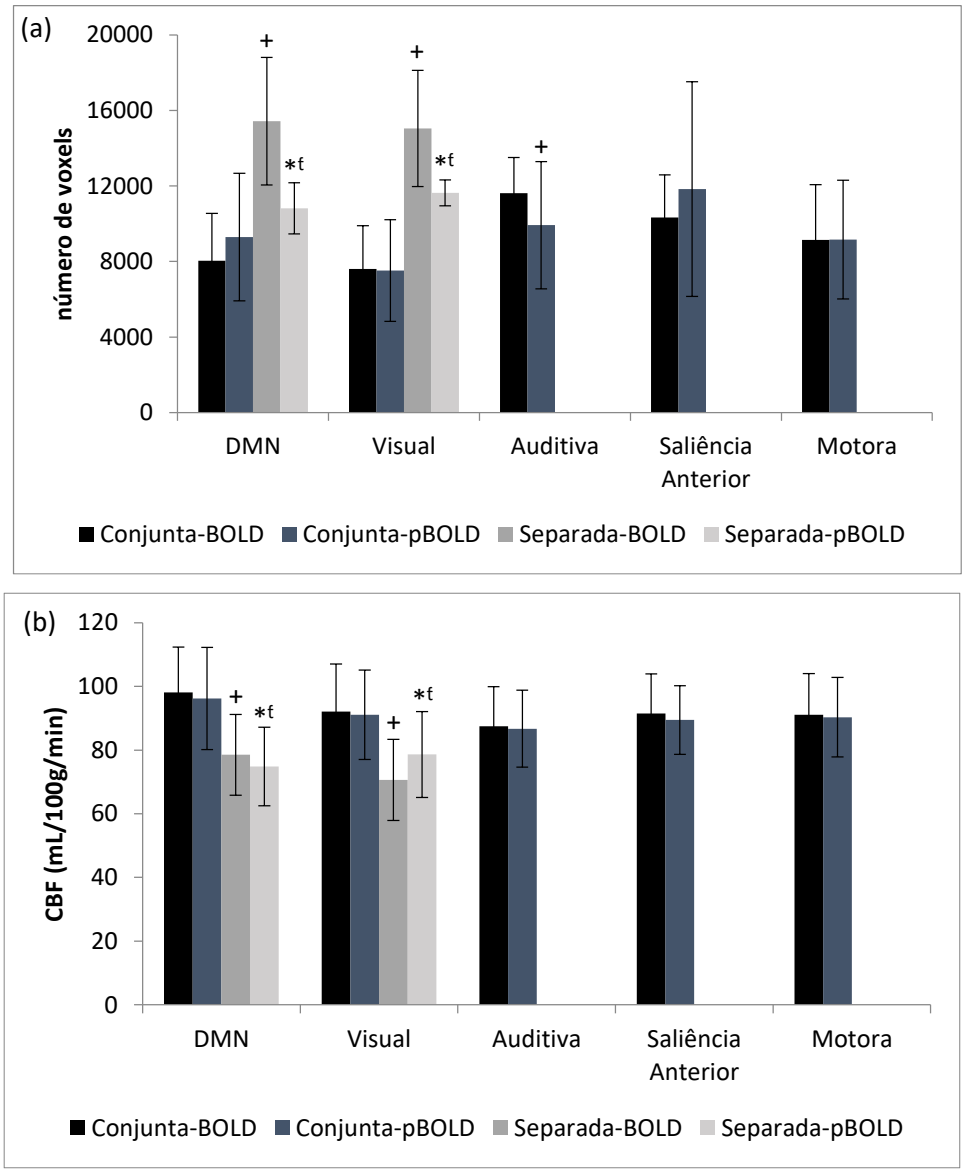


Figura 4.23: (a) Número de *voxels* e (b) CBF para cada rede de repouso obtida pelas análises em grupo, conjunta e separada, das imagens BOLD e pBOLD (pCASL, TE = 14

ms). As barras de erro representam o desvio padrão para o grupo de indivíduos. ($^{+}$, * e ^{f} para $p < 0.05$ vs. Conjunta-BOLD, Separada-BOLD e Conjunta-pBOLD, respectivamente)

O tamanho, ou seja, número de *voxels* em cada rede investigada consta na Figura 4.23a, comparando diferentes técnicas (BOLD x pCASL) e tipos de análise (conjunta x separada). Como esperado, para as análises conjuntas, as redes apresentam um número similar de *voxels*, devido ao uso de uma só componente média para sua reconstrução. Para as análises separadas, os tamanhos das redes encontradas (DMN e visual) com BOLD foram significativamente maiores do que para as redes encontradas com pBOLD, porém a variabilidade do tamanho entre os indivíduos foi menor para pBOLD.

Os valores médios de CBF calculados para o grupo de indivíduos estão na Figura 4.23b. Os valores de CBF extraídos com as máscaras das redes obtidas com as análises separadas (DMN e visual) foram significativamente menores do que para as mesmas redes obtidas com a análise conjunta.

Mais uma vez, foi mostrado que os resultados obtidos com pBOLD são mais semelhantes aos obtidos com BOLD quando a análise é feita de maneira conjunta. Portanto, é necessário ter cautela ao avaliar as redes de repouso apenas com pCASL, esperando que o resultado obtido seja sempre igual àquele obtido com BOLD.

4.3. CONECTIVIDADE FUNCIONAL E GRAFOS

Como não foi possível visualizar as redes cerebrais de repouso com as séries temporais de CBF utilizando ICA, investigamos a conectividade funcional, com dados de BOLD, pBOLD e CBF, pela análise baseada em semente. As sementes utilizadas foram regiões anatômicas selecionadas a partir de um atlas, como foi explicado na Metodologia. É importante ressaltar que as séries temporais de pBOLD e CBF foram obtidas a partir das imagens adquiridas com pCASL (TE = 14 ms).

A partir da análise semente-*voxels*, foi possível observar as principais redes cerebrais de repouso, como ocorrido com ICA, para as séries temporais de BOLD e pBOLD. Entretanto, novamente não foi possível obter redes de repouso para as séries temporais de CBF.

Na Figura 4.24, estão apresentadas quatro redes de repouso (DMN, visual, saliência e motora) obtidas pela análise semente-*voxels* para os dados de BOLD e pBOLD. As sementes utilizadas nesses casos foram regiões anatômicas pertencentes às redes de interesse: córtex cingulado posterior (1,-61,38), córtex visual ventral (0,-93,-4), córtex pré-frontal rostral (-32,45,27) e córtex motor superior (0,-31,67), para as redes DMN, visual, saliência e motora, respectivamente. Entre parêntesis estão as coordenadas x, y e z do centro de massa dessas regiões no atlas utilizado.

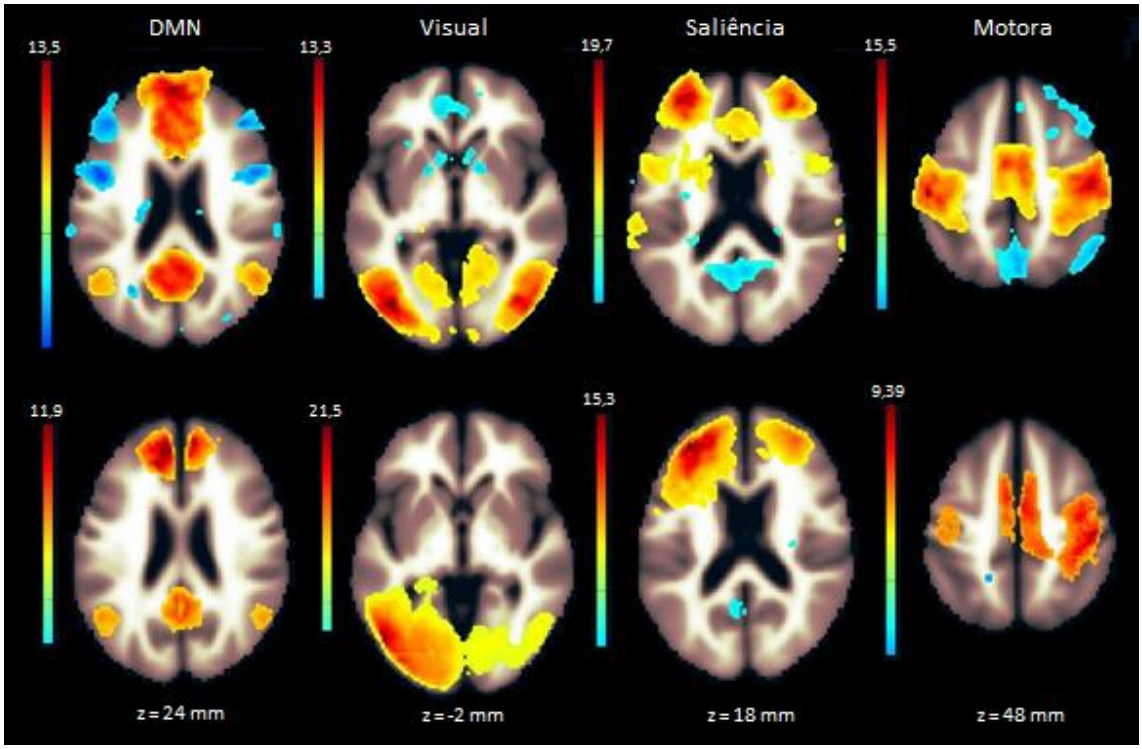


Figura 4.24: Redes cerebrais de repouso obtidas pela análise semente-*voxels* para as imagens BOLD (linha superior) e pBOLD (linha inferior). As escalas de cores representam os valores de t das correlações.

Como não foi possível obter redes de repouso para as séries temporais de CBF na análise semente-*voxels*, realizou-se também uma análise *ROI-to-ROI*, ou seja, foram investigadas as correlações entre todas as regiões anatômicas de interesse.

A Figura 4.25 mostra as conexões entre as diferentes regiões anatômicas investigadas, para as séries temporais de BOLD, pBOLD e CBF. Foram consideradas que duas regiões estavam conectadas se o coeficiente de correlação de Pearson fosse maior

do que 0,30 ($p < 0,05$, corrigido FDR). É possível observar que há mais conexões para os dados de BOLD, e que o padrão de conexões é mais similar entre BOLD e pBOLD.

Além disso, para os três casos da Figura 4.25, há regiões que possuem mais conexões do que outras, ou seja, têm maior grau de conexões. Isso é mostrado pelo maior tamanho dos círculos vermelhos na figura. Essa é uma das características de redes de mundo pequeno. Elas apresentam alto coeficiente de clusterização e regiões com alto grau de conexões curtas, ou seja, de baixo comprimento médio de caminho, denominadas "*hubs*".

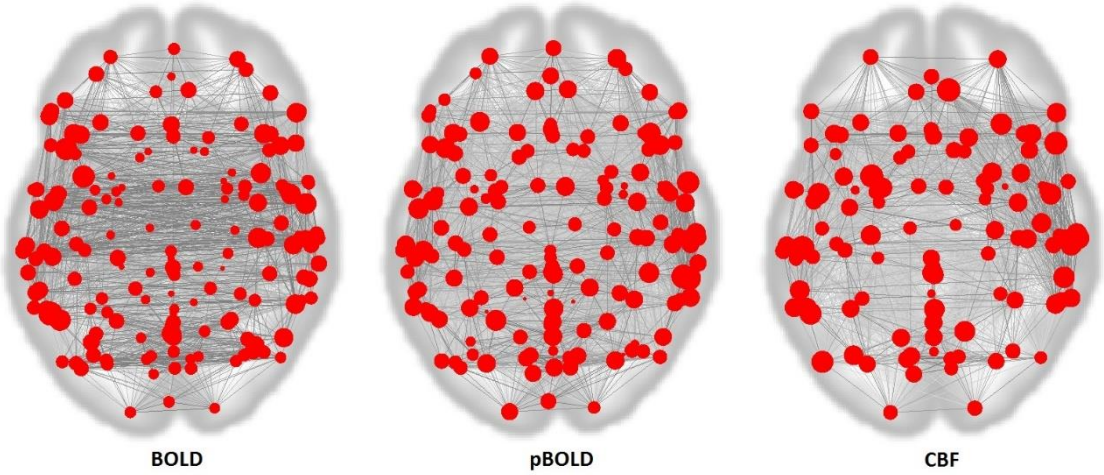


Figura 4.25: Mapas médios das conexões (linhas cinza) entre regiões anatômicas (círculos vermelhos), considerando o coeficiente de correlação de Pearson $r > 0,30$ ($p < 0,05$ corrigido FDR) para os dados de BOLD, pBOLD e CBF. O tamanho dos círculos está diretamente relacionado ao grau de conexões de cada região.

O coeficiente de clusterização médio, calculado considerando todas as regiões investigadas, para todos os indivíduos, foi 0,49 ± 0,03, 0,46 ± 0,04 e 0,50 ± 0,06, para BOLD, pBOLD e CBF, respectivamente. O valor para pBOLD foi significativamente menor do que para os outros dois casos ($p = 0,01$).

Dentre as 114 regiões anatômicas investigadas, selecionamos aquelas consideradas como *hubs* de acordo com o seguinte critério: ter grau maior do que o grau médio para todas as regiões mais meio desvio padrão ($Grau_{hubs}$, Tabela 4.4). Assim, 44 regiões são consideradas como *hubs* para as imagens BOLD, 32 para as imagens pBOLD

e 36 para os mapas de CBF, sendo 20 coincidentes para os três tipos de imagens (Tabela 4.5).

Tabela 4.4: Valores de grau (média e desvio padrão) para todas as regiões anatômicas estudadas.

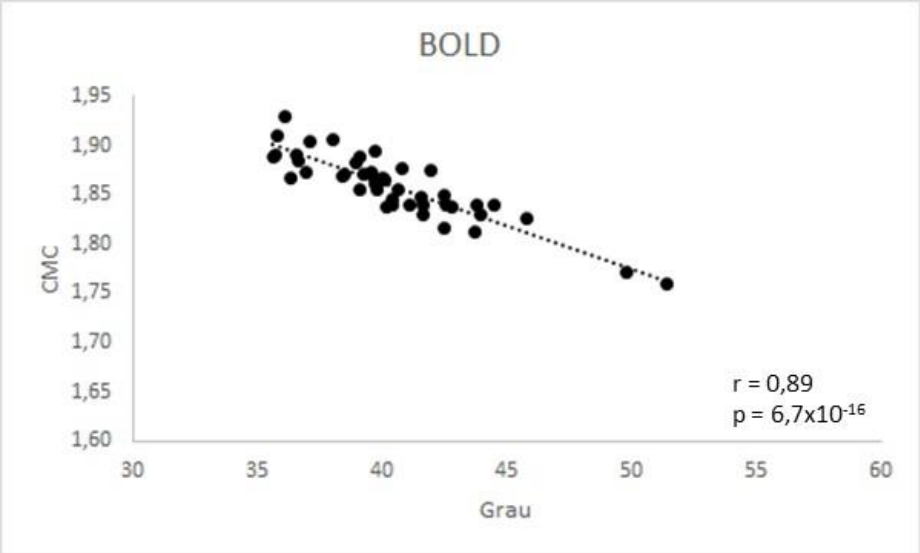
	Grau		
	Média	Desvio Padrão	$Grau_{hub}$
BOLD	31	9	≥ 36
pBOLD	40	6	≥ 44
CBF	36	10	≥ 41

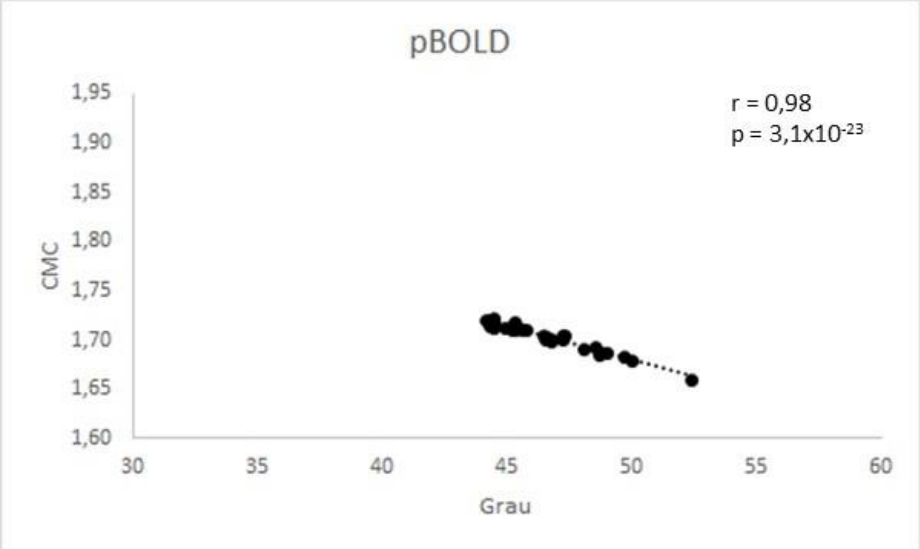
Tabela 4.5: Regiões cerebrais consideradas como *hubs*, por ter alto grau de conexões, coincidentes para os três tipos de imagens estudadas (BOLD, pBOLD e CBF).

Polo Frontal esquerdo
Córtex Insular direito
Giro Frontal Inferior direito
Giros Pré-centrais direito e esquerdo
Giro Temporal Superior direito
Giro Temporal Médio direito, divisão posterior
Giros Temporais Médios direito e esquerdo, região temporo-occipital
Giro Pós-central direito
Giros Supramarginais direito e esquerdo, divisão anterior
Giros Supramarginais direito e esquerdo, divisão posterior
Giro Angular direito
Córtex Motor Suplementar direito
Córtex Opercular Frontal direito
Córtex Opercular Central direito
Córtex Opercular Parietal direito
Planum Temporale direito

Na Figura 4.26 estão apresentadas as correlações negativas entre o comprimento médio de caminho e o grau de conexões de regiões anatômicas consideradas *hubs* para as

imagens BOLD, pBOLD e mapas de CBF. Em resumo, é possível afirmar que as redes de conexões obtidas com os três diferentes tipos de dados apresentam características de redes complexas de mundo pequeno.





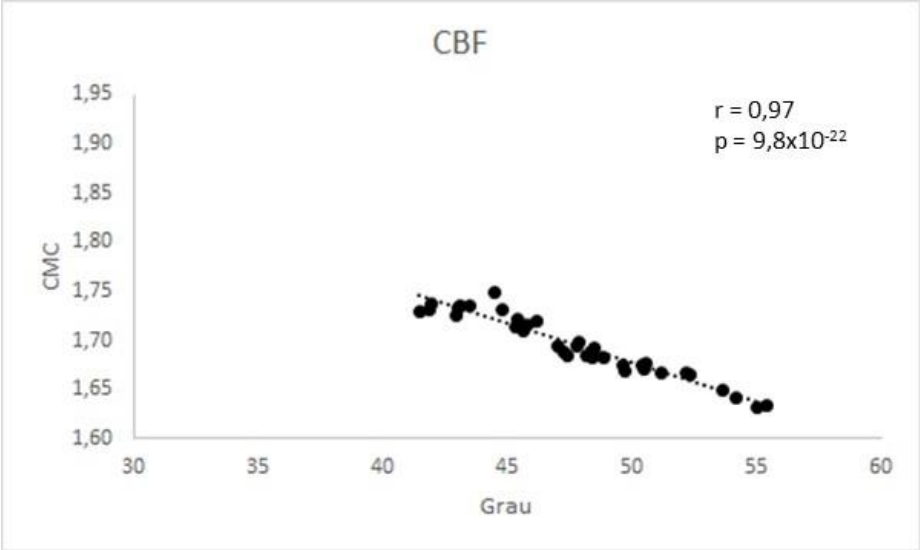


Figura 4.26: Relação entre o comprimento médio do caminho (CMC) e o grau de conexões para regiões anatômicas consideradas como *hubs*, obtidas a partir de imagens (a) BOLD, (b) pBOLD e (c) CBF.

Outra análise realizada foi a comparação da força da conectividade funcional (FC) de cada rede de repouso obtida pelos dados de pCASL (pBOLD e CBF) com aquela obtida por BOLD (Figuras 4.29 e 4.30). Os valores de FC foram correlacionados para a maioria das redes, exceto para a sensório-motora no caso de pBOLD e BOLD (Figura 4.27), e frontoparietal no caso de CBF e BOLD (Figura 4.28). Além disso, os coeficientes de correlação obtidos foram maiores para as regressões entre pBOLD e BOLD.

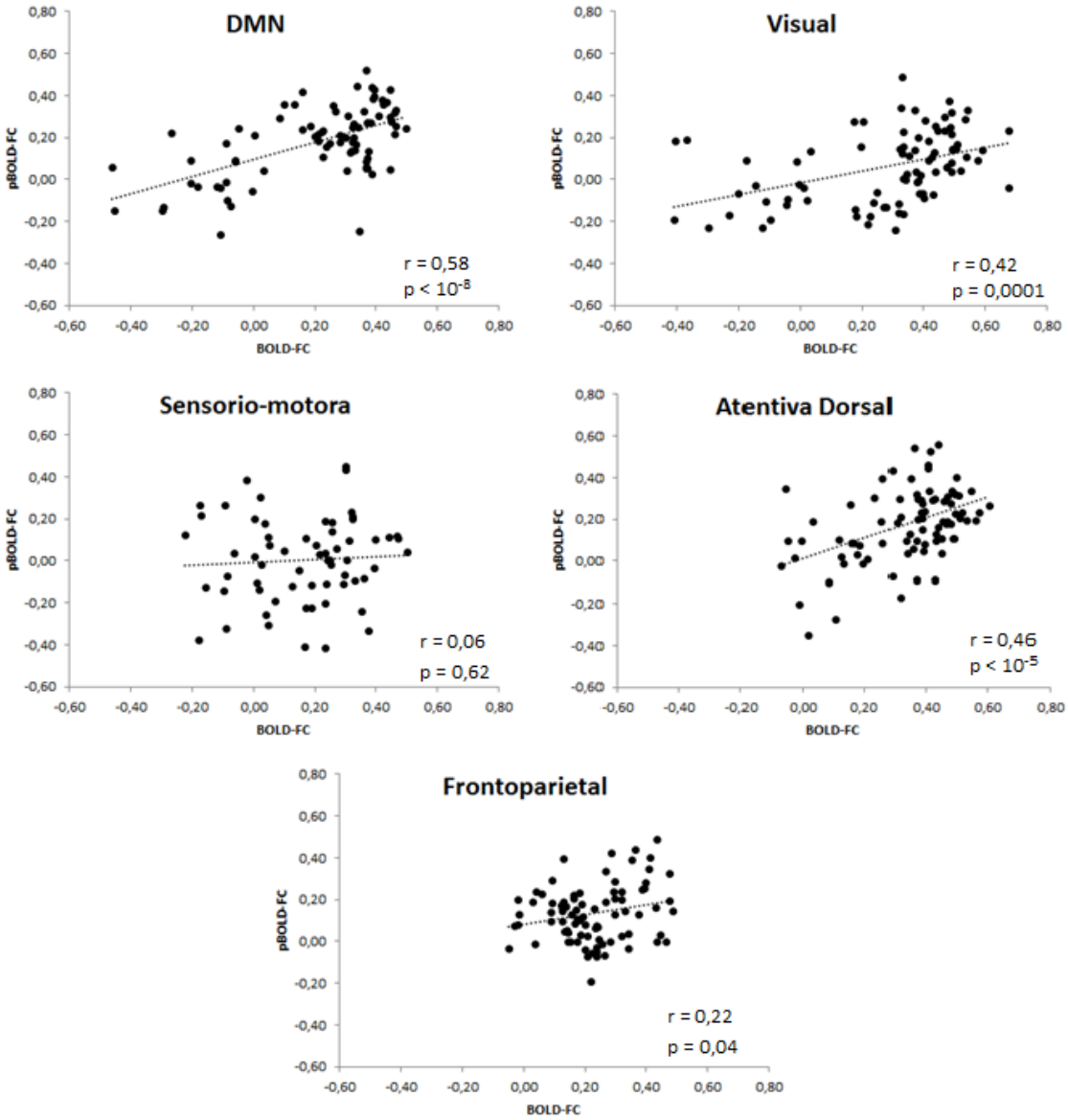


Figura 4.27: Relação entre as forças da conectividade funcional (FC) obtidas a partir dos dados de pBOLD e BOLD para as cinco redes cerebrais de repouso investigadas.

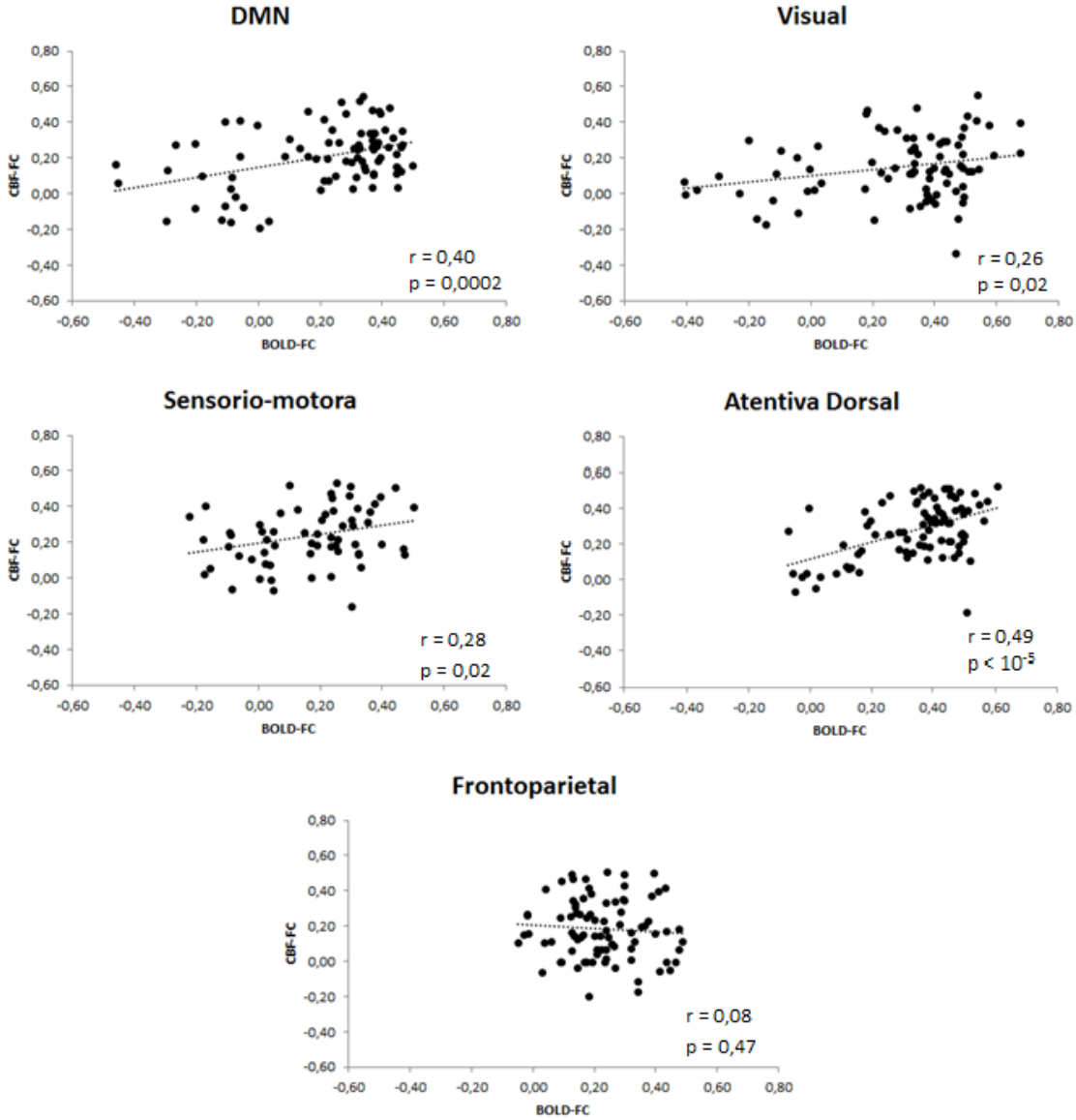


Figura 4.28: Relação entre as forças da conectividade funcional (FC) obtidas a partir dos dados de CBF e BOLD para as cinco redes cerebrais de repouso investigadas.

Para o caso da DMN, observamos também que a força da conectividade funcional (FC) obtida pelas séries temporais de CBF estava fortemente correlacionada com o CBF basal encontrado para as regiões que compõem essa rede (Figura 4.29). O mesmo não foi observado para FC calculados a partir das séries temporais de pBOLD e BOLD.

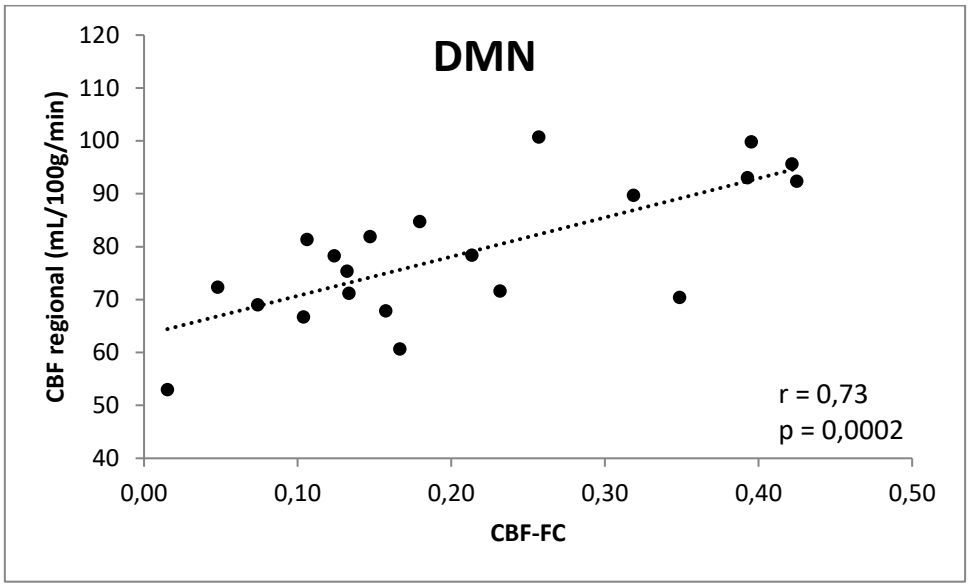


Figura 4.29: Relação entre a força da conectividade funcional (FC) obtida a partir das séries temporais de CBF e os valores de CBF basal para a DMN.

Por fim, analisamos os parâmetros de conectividade considerando todas as regiões anatômicas do atlas. Para o caso das séries temporais de pBOLD e BOLD, houve correlação significativa para eficiência global, custo, comprimento médio do caminho e grau ($p < 0,05$). Já para o caso das séries temporais de CBF e BOLD, houve correlação significativa apenas para custo e grau ($p = 0,02$).

Na Tabela 4.6, estão os valores, média (desvio padrão), para cada parâmetro de rede investigado, e os resultados obtidos do teste estatístico realizado. É possível observar que houve uma variabilidade entre indivíduos maior para os dados de CBF, e que apenas eficiência global e centralidade não apresentaram diferenças significativas entre os tipos de dados analisados.

Como já concluído na seção anterior, é necessário cuidado ao interpretar os dados de conectividade funcional obtidos com ASL. Além das limitações da técnica, a natureza do sinal é diferente do sinal BOLD, o que pode influenciar nas diferenças encontradas entre as duas técnicas. Esses resultados serão mais bem discutidos no próximo capítulo.

Tabela 4.6: Valores dos parâmetros de conectividade, média (desvio padrão), calculados considerando todas das regiões de interesse definidas pelo atlas anatômico.

	BOLD		pBOLD		CBF	
Eficiência global	0,567	(0,026)	0,560	(0,053)	**0,602*+**	**(0,044)**
Eficiência local	0,718	(0,024)	0,720	(0,022)	0,734	(0,036)
Centralidade	0,0060	(0,0005)	0,0041	(0,0004)	0,0052	(0,0005)
Custo	0,192	(0,033)	**0,238****	**(0,038)**	**0,255****	**(0,053)**
CMC[1]	1,97	(0,08)	**1,74****	**(0,04)**	**1,78****	**(0,07)**
CC[2]	0,485	(0,035)	**0,456***	**(0,038)**	**0,501++**	**(0,057)**
Grau	31	(5)	**39****	**(6)**	**37***	**(8)**

[1] CMC: Comprimento Médio do Caminho
[2] CC: Coeficiente de Clusterização
* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs. BOLD
+ $p < 0,05$ e + + $p < 0,01$ vs. pBOLD

5. DISCUSSÃO

No cérebro humano, diferentes grupos de regiões são responsáveis por funções específicas, sendo conectados funcionalmente, mesmo se essas regiões estejam separadas anatomicamente (BISWAL et al., 1995b). Nos últimos anos, aumentou-se o interesse pelo estudo da conectividade funcional por métodos de imagens não-invasivos, como o contraste BOLD nas IRM, devido também a sua aplicabilidade no estudo de doenças neurológicas que são acompanhadas por alterações cognitivas. Entretanto, o sinal BOLD é influenciado por diferentes fatores que podem estar alterados nas diversas neuropatologias. Assim, é interessante utilizar uma técnica como a ASL que fornece informação de um parâmetro fisiológico, o CBF.

Atualmente há dois tipos de métodos de análise de imagens funcionais para caracterizar a atividade cerebral espontânea em indivíduos em repouso. Um deles investiga características regionais específicas dos sinais de uma região cerebral, tais como homogeneidade regional e amplitude das flutuações de baixa frequência (ZANG et al., 2004, 2007). O outro avalia a relação entre diferentes áreas cerebrais, medindo a coerência entre suas flutuações espontâneas, ou seja, a conectividade funcional. Para estimar algum parâmetro que reflita a conectividade entre duas regiões, é necessário escolher a maneira como este será estimado, a partir de um modelo a priori, como no caso do método da semente, ou sem modelos específicos, como no caso da ICA (BISWAL et al., 1995b; CORDES et al., 2002; VAN DE VEN et al., 2004).

A ICA propicia uma análise mais exploratória dos dados do que métodos baseado em algum tipo de hipótese, pois identifica diferentes tipos de flutuações de sinal considerando suas características espaciais e temporais. Não há a necessidade de escolher uma semente, o que é importante para os casos em que não há uma hipótese bem definida. Além disso, foi mostrado que métodos como ICA conseguem separar sinais cardíacos e respiratórios daqueles relacionais à atividade neuronal (BECKMANN et al., 2005b).

Assim, utilizamos primeiramente a ICA e obtivemos resultados robustos para os dados de BOLD e pBOLD, obtendo redes cerebrais de repouso, como DMN e visual, inclusive para análises individuais. Entretanto, com os mapas de perfusão e CBF, as redes obtidas foram bastante ruidosas, dificultando sua identificação, mesmo para as análises em grupo conjuntas com BOLD.

Ao contrário dos nossos resultados, recentes estudos obtiveram redes a partir de séries temporais de CBF, porém utilizaram para aquisição uma sequência pCASL 3D GRASE (um híbrido de eco de gradiente e de spin) com supressão de sinal de fundo (CHEN; JANN; WANG, 2015; FERNÁNDEZ-SEARA et al., 2015; LIANG; CONNELLY; CALAMANTE, 2014b). Essa sequência apresenta RSR temporal aproximadamente três vezes maior do que a sequência 2D EPI pCASL, usada no presente estudo, fornecendo mapas de CBF de boa qualidade para cada par de imagens controle/marcada (CHEN; JANN; WANG, 2015).

Entretanto, se compararmos nossos resultados de pBOLD com aqueles de ASL publicados nos últimos anos, mostramos que é possível identificar redes com dados adquiridos por uma sequência de ASL disponível para rotina clínica. Entre as redes obtidas, a DMN e a visual foram as mais recorrentes, e apresentaram correlação significativa dos resultados de conectividade entre as duas técnicas (ASL e BOLD), como publicado anteriormente na literatura (FERNÁNDEZ-SEARA et al., 2011; VIVIANI; MESSINA; WALTER, 2011; ZOU et al., 2009).

Jann e colaboradores mostraram grandes semelhanças entre ASL e BOLD em outras redes além da DMN e visual, como a auditiva, motora e atentiva (JANN et al., 2015b), com sobreposição espacial variando de 35% a 80%, dependendo se a análise era separada ou conjunta. As similaridades entre as redes de ASL e BOLD obtidas no presente estudo também variaram nesse intervalo para as análises em grupo, sendo que os coeficientes de similaridade DICE foram maiores para as análises conjuntas. Além disso, algumas redes de pBOLD que não foram identificadas nas análises individuais e em grupo separadas, foram obtidas com as análises conjuntas, que oferecem uma validação mútua dos resultados obtidos com cada método, aumentando a confiança das análises estatísticas (CHEN; JANN; WANG, 2015). Entretanto, as redes de pBOLD apresentaram conectividade funcional mais baixa, devido entre outros fatores, às baixas RSR e resolução temporal (JANN et al., 2015b), que serão discutidas a seguir.

Os melhores resultados obtidos com pBOLD, em relação à perfusão e ao CBF, devem-se a dois fatores. Primeiramente, enquanto as imagens pBOLD são obtidas pelo cálculo das médias das imagens controle e marcada, as imagens de perfusão e CBF são obtidas pela subtração. Assim, as imagens pBOLD apresentam maior relação sinal-ruído em relação àquelas de perfusão e CBF.

Além disso, é conhecida e verificada na literatura a existência de contaminação das séries de ASL com sinal BOLD (CHEN; JANN; WANG, 2015; POLLOCK et al.,

2009; WONG; BUXTON; FRANK, 1997). Assim, utilizam-se métodos, como por exemplo, a subtração com interpolação sinc para os cálculos da perfusão, com o objetivo de eliminar essa contaminação e obter valores mais corretos de CBF. Todavia, há a possibilidade de recuperar o sinal BOLD dessas imagens de ASL, abrindo um novo horizonte para a técnica, ao garantir sua especificidade espacial em relação à atividade neuronal, e dar acesso à resposta hemodinâmica baseada no contraste BOLD. Deste modo, as imagens pBOLD fornecem resultados mais semelhantes àqueles obtidos com imagens BOLD.

Sabe-se também que o método de ASL e o TE utilizados influenciam o grau de contaminação das séries de ASL com sinal BOLD. Para valores mais altos de TE, há tempo necessário para a subida da curva de resposta hemodinâmica, que atinge seu pico entre 20 e 30 ms em voluntários saudáveis (BUXTON, 2012). Assim, quanto maior o TE utilizado na aquisição do sinal, maior será a contaminação por flutuações BOLD e menor será a relação sinal-ruído (BOROGOVAC; ASLLANI, 2012; HERNANDEZ-GARCIA et al., 2004), levando a erros na quantificação do CBF. Ao comparar os valores de CBF obtidos com pCASL, observamos uma redução significativa dos valores para TE igual a 21 ms, em relação a TE igual a 14 ms.

Além disso, imagens obtidas por pCASL, por se tratarem de uma variação do modo contínuo, apresentam menor contaminação do que imagens obtidas por PASL, pois as imagens de PASL apresentam mais efeitos de T2 e T2* devido à inversão simples de toda a região de marcação (BOROGOVAC; ASLLANI, 2012; WONG; BUXTON; FRANK, 1998). Portanto, a recuperação do sinal BOLD não é tão boa para pCASL, o que ajuda a explicar o fato dos resultados das análises das redes terem sido melhores para dados de PASL.

Em relação à identificação das redes, não observamos a influência do valor de TE para pCASL na análise em grupo; porém os resultados foram significativamente melhores para TE maior em dados de PASL, devido aos motivos citados acima. No caso das análises individuais, a ocorrência das diferentes redes para dados pBOLD foi maior para as imagens adquiridas com TE maior, mostrando uma vantagem em utilizá-lo quando o objetivo principal for a identificação dessas redes, e não a quantificação do CBF.

Outro fator que pode ter levado a melhores resultados com PASL é a maior resolução temporal em relação à pCASL. Para obtermos uma boa cobertura do cérebro e utilizarmos valores recomendados dos parâmetros de aquisição, como duração da marcação e atraso pós-marcação, para melhor quantificar o CBF (ALSOP et al., 2015),

utilizamos um TR igual a 4 s para pCASL, resultando em um ponto a cada 8 s na série temporal. No caso da PASL, foi possível utilizar um TR igual a 3 s, resultando em uma resolução temporal igual a 6 s. Apesar de apresentar melhor resolução temporal, e bons resultados neste estudo, o método pulsado apresenta dificuldades devido à maior dependência do sinal com o PLD, o que prejudicaria aplicações clínicas em casos de patologias que alterem este parâmetro, bem como estudos com grande heterogeneidade de faixa etária pelo mesmo motivo. Deste modo a PASL oferece desvantagem quanto à quantificação do CBF, possuindo um modelo teórico menos robusto, além de menores RSR e maior contaminação de sinal BOLD.

Como não foi possível adquirir imagens de ASL com TRs menores, re-amostramos as séries de BOLD para diminuir sua resolução temporal e investigar sua influência na identificação das redes. Observamos que os resultados obtidos com a série equivalente a TR igual a 8 s não diferiram significativamente daqueles para TR igual a 2 s. Diferenças só foram observadas para TR igual a 12 s. Isso se deve ao fato de que a diminuição dos volumes piora a resolução temporal, comprometendo a qualidade do sinal analisado, segundo os teoremas de amostragem em que para que um sinal seja devidamente amostrado, a taxa de aquisição amostral deve ser no mínimo duas vezes o inverso da frequência do sinal. Portanto a resolução temporal dos dados é de grande relevância, e comprometeu o sinal BOLD por aumentarmos o TR, ao ponto de perder poder de identificação de redes para frequências de 0,04Hz, as quais estão dentro da faixa de interesse das flutuações funcionais (0,01 a 0,1Hz). Devido à baixa resolução temporal em IRMf como um todo, com TRs típicos entre 2 e 3s, as imagens acabam acarretando ruídos de sinais cardiorrespiratórios que aparecem em intervalos de frequência mais baixa devido ao fenômeno de *aliasing* (VAN DEN HEUVEL; HULSHOFF POL, 2010).

Entretanto, é possível concluir que a resolução temporal influencia na identificação das redes, mas não é o único fator determinante (JANN et al., 2015b; VAN DIJK et al., 2010). Outros fatores relevantes são a RSR e a intensidade de sinal das imagens. Em relação ao primeiro, a menor RSR das imagens de perfusão e CBF podem ter interferido negativamente na identificação das redes, pois com a baixa qualidade de sinal, as flutuações de interesse se misturam à linha de base, comprometendo a diferenciação das componentes no caso da ICA espacial e os cálculos de correlação para o método das sementes (CHEN et al., 2003).

Porém, as imagens pBOLD apresentaram RSR superior às imagens BOLD, e a identificação das redes não foi tão efetiva. Este fato pode estar relacionado à menor

intensidade de sinal das imagens pBOLD, que são geradas a partir da reconstrução das flutuações BOLD existentes nas séries temporais de ASL; já as imagens BOLD são geradas a partir de uma aquisição apropriada para este contraste. Além disso, o sinal da ASL é proveniente dos pequenos vasos (AGUIRRE; DETRE, 2002), com maior ramificação e diferença de direção, diferentemente do sinal BOLD proveniente dos spins em grandes veias (LAI et al., 1993), onde estão mais ordenados, resultando em um sinal maior dentro de cada *voxel*. Isso pode ser observado pelos histogramas apresentados na Figura 4.18.

É importante ressaltar que as frequências das flutuações de interesse, pertencentes às redes funcionais de repouso, encontram-se na região de 0,05 a 0,1 Hz (ALLEN et al., 2011b; VAN DEN HEUVEL; HULSHOFF POL, 2010; VAN DIJK et al., 2010). De acordo com os espectros apresentados na Figura 4.19, as imagens BOLD são as que apresentam melhor vantagem de amplitude na faixa de interesse sobre as bandas mais altas. As bandas inferiores a 0,03 Hz referentes à frequência de respiração aparecem em todos os espectros. Apesar das maiores amplitudes nos mapas de CBF em relação às demais séries, a banda das oscilações funcionais não se sobressaiu em relação às altas amplitudes dos sinais indesejados (WANG et al., 2003).

O cérebro apresenta oscilações espontâneas diferentes ao longo de suas regiões, por isso, cada rede cerebral possui sua frequência natural de oscilação, fator que nos permite diferenciá-las pelo método de ICA. (CHEN et al., 2003; FRISTON et al., 2014; LI; ADALI; CALHOUN, 2007) Entretanto, as componentes podem sofrer influências diferentes ao se variar TR e TE, sendo mais ou menos afetadas por eles. Neste sentido, as redes mais recorrentes em nossos experimentos foram a DMN e a Visual, com ocorrências significativas inclusive nas análises individuais. Essas redes são as que mais aparecem na literatura, devido ao estado do indivíduo no repouso, mas de olhos abertos, que apresenta divagação e atividade no córtex visual (ZOU et al., 2015).

Então, para tentar obter informações da conectividade a partir dos mapas de CBF, denominada por alguns pesquisadores de conectividade perfusional (LIANG; YEH, 2015), optamos por também usar o método de semente. Neste caso, a primeira etapa é definir a semente e, partir da sua série temporal, estimar o parâmetro de conectividade, que pode ser, por exemplo, o coeficiente de correlação de Pearson. Sabe-se que a aplicação desse método é limitada, pois se baseia na série temporal da região escolhida como semente, e no método de escolha dessa região.

No presente estudo, definimos as sementes a partir de regiões anatômicas do atlas Harvard-Oxford, que inclui áreas corticais e subcorticais do cérebro. Utilizamos a teoria dos grafos para investigar parâmetros de conectividade a partir das séries temporais de pBOLD e CBF, obtidas por pCASL, e comparamos com os resultados obtidos a partir de séries temporais de sinal BOLD.

Salvador e colaboradores foram os primeiros a utilizar IRM em repouso para investigar a conectividade funcional do cérebro todo, de indivíduos saudáveis, a partir da teoria dos grafos (SALVADOR et al., 2005). Ele e outros pesquisadores mostraram que redes cerebrais estruturais e funcionais são organizadas intrinsecamente como redes de mundo pequeno capazes de transferir informações de forma eficiente com baixo custo, bem como apresentar regiões altamente conectadas (CHEN, 2008; GONG et al., 2009; WANG et al., 2009, 2010). Ou seja, o cérebro apresenta regiões que possuem alto grau de conexões curtas, ou seja, de baixo comprimento médio de caminho, denominadas "*hubs*", e alto coeficiente de clusterização. Essa topologia pode suportar processamento de informação segregado ou especializado, e distribuído ou integrado (BASSETT; BULLMORE, 2006).

No presente estudo, observamos essas características não apenas a partir dos dados de BOLD, mas também a partir dos mapas de CBF. Os valores médios dos coeficientes de clusterização foram semelhantes, e ambos apresentaram vinte regiões coincidentes que podem ser consideradas como *hubs*, por terem alto grau de conexões e baixo comprimento médio de caminho. Esses resultados estão de acordo com estudos publicados previamente na literatura(ACHARD et al., 2006; GONG et al., 2009; LIANG et al., 2013b).

Além disso, a comparação da força da conectividade funcional entre os dados de ASL (CBF e pBOLD) e BOLD, mostrou correlações significativas para a maioria das redes investigadas. Alguns parâmetros de rede, como custo e grau, também se correlacionaram entre diferentes métodos, mas com valores médios para os grupos significativamente diferentes.

É necessário cautela na interpretação desses dados, pois as diferenças podem estar relacionadas às desvantagens da técnica de ASL discutidas anteriormente neste capítulo, e também às diferenças nos mecanismos subjacentes do sinal de ASL e BOLD (LIANG; CONNELLY; CALAMANTE, 2014b).

Outra análise interessante que se aproveita da complementaridade entre as técnicas de ASL e BOLD, é a correlação entre a força da conectividade funcional e o CBF basal das regiões conectadas. Estudos têm mostrado que regiões que apresentam

conectividade funcional mais elevada, como por exemplo, aquelas que compõem a DMN, também apresentam CBF basal elevado (GREICIUS et al., 2003a; JANN et al., 2015b; LI et al., 2012; ZOU et al., 2009). Esse resultado também foi observado no presente estudo.

Liang e colaboradores observaram uma correlação não linear entre alguns parâmetros investigados, como grau e centralidade, e o CBF basal (LIANG; CONNELLY; CALAMANTE, 2014b). Nossos resultados não apresentaram essa correlação; entretanto, os valores de CBF basal do nosso estudo estão no intervalo em que Liang e colaboradores encontraram um platô nos gráficos entre os parâmetros de conectividade e o CBF basal.

Essa metodologia que utilizamos com os grafos é influenciada pelo limiar escolhido para os coeficientes de correlação de Pearson. Variações desse limiar podem levar a alterações das propriedades das redes (LIANG; CONNELLY; CALAMANTE, 2014b). No presente estudo, pelo seu caráter exploratório e falta de métodos de escolha menos arbitrários (WANG et al., 2009), optamos por utilizar um limiar baixo (r = 0,3) para garantir um número suficiente de conexões para o caso dos mapas de CBF. Portanto, são necessários mais estudos para o desenvolvimento de métodos robustos de escolha do limiar ou independentes de limiares.

Outro ponto metodológico que devemos considerar é que estamos usando um atlas com regiões anatômicas para selecionar as sementes (ACHARD et al., 2006). Entretanto, pode haver conectividade funcional entre diferentes partes de uma mesma região do atlas, que não será considerada nas análises. Assim, a análise *voxel* a *voxel* pode ser uma alternativa. No presente estudo, essa análise não foi possível devido aos fatores já apontados anteriormente como desvantagem da técnica de ASL utilizada.

Independentemente do método de análise escolhido, para obter resultados confiáveis, é necessário eliminar, ou pelo menos, minimizar fontes de ruído, como sinais cardíacos e respiratórios, que podem alterar as correlações entre as séries temporais. Dessa maneira, utilizamos os sinais extraídos da substância branca e dos ventrículos, além dos parâmetros de realinhamento das imagens, como regressores na análise dos dados. Estudos recentes mostraram que utilizar os sinais da substância branca e dos ventrículos como covariáveis não desejáveis em um modelo de regressão controla os efeitos de ruído fisiológico (BEHZADI et al., 2007; CHEN; JANN; WANG, 2015). Além disso, aplicamos um filtro temporal passa altas de 0,15 Hz e a remoção de "*spikes*" do GIFT toolbox para eliminar sinais cujas frequências estavam fora do intervalo de interesse, uma

vez demonstrado que flutuações de frequências altas são mais comuns na substância branca e ventrículos, não estando associadas à atividade neural (ZOU et al., 2009, 2008).

Além disso, se o objetivo é obter CBF basal e/ou analisar a conectividade perfusional, é obrigatório minimizar os efeitos de flutuações BOLD na série temporal de ASL. Uma forma eficiente de evitar essa contaminação é a utilização de um tempo ao eco baixo para que os demais fatores da resposta hemodinâmica, que não sejam pertinentes ao CBF, não estejam em seu pico de intensidade, podendo até mesmo ser negligenciados. (CHEN; JANN; WANG, 2015; CHUANG et al., 2008)

Em resumo, como desvantagens da técnica de ASL, incluem a menor resolução temporal, menor intensidade de sinal, menor relação sinal ruído, e oscilações de altas amplitudes em frequências não desejadas, que podem limitar a qualidade dos dados para estudos funcionais no repouso.

Além disso, algumas redes de pBOLD que não foram identificadas nas análises individuais e em grupo separadas, foram obtidas pelas análises em conjunto com as imagens BOLD. Na análise conjunta, informações de ambas as séries temporais de cada indivíduo são levadas em consideração, oferecendo uma validação mútua dos resultados obtidos com cada método, e aumentando a confiança das análises estatísticas.

Além da baixa relação sinal-ruído intrínseca das imagens de ASL, os mapas de perfusão e CBF são obtidos por algum tipo de subtração, o que diminui ainda mais a qualidade das imagens, diminuindo a precisão dos cálculos de CBF e a sensibilidade à atividade neuronal.

Essa limitação da ASL adquirida com leitura 2D EPI pode ser superada em parte pelo uso da sequência 3D GRASE pCASL, com supressão de sinal de fundo, que apresenta estabilidade temporal do sinal superior, melhorando a relação sinal-ruído. Entretanto, não é uma sequência disponível na maioria dos centros de IRM.

Observamos também que a resolução temporal influencia nos resultados, visto que mais redes puderam ser identificadas pelo método de ASL pulsada em comparação à pseudocontínua. Resultados ainda melhores foram obtidos com BOLD. A baixa amostragem do sinal de ASL limita o poder estatístico da conectividade funcional. Entretanto, a diminuição do TR da aquisição é limitada pela natureza da técnica. Há a necessidade de se respeitar os valores mínimos para a duração da marcação (no caso de pCASL) e o tempo de espera pós-marcação para se obter uma melhor quantificação do CBF. Alguns estudos têm utilizados valores muito baixos para esses tempos, melhorando a identificação das redes, mas comprometendo a quantificação do CBF.

Uma alternativa é trabalhar no desempenho das séries de ASL melhorando sua resolução temporal durante o processamento das imagens, por exemplo, utilizando o método de subtração *pairwise*, que considera cada imagem em duas subtrações, com as imagens imediatamente anterior e posterior a ela, dobrando a amostragem.

Entretanto, mesmo em desvantagem comparativa com a técnica BOLD, a presença de redes foi expressiva nos dados de pBOLD, com níveis de similaridade de moderado a alto, e valores de CBF basal significativamente correlacionados em comparação com as redes em BOLD. Esses resultados estão de acordo com um estudo recente de Zhu e colaboradores que avaliaram a conectividade em mapas de BOLD "concurrente", equivalente ao nosso pBOLD (ZHU et al., 2013b).

Não apenas as limitações da técnica de ASL são responsáveis pelas diferenças observadas, principalmente em comparação com dados de BOLD. A natureza dos sinais obtidos com ASL e BOLD é diferente em alguns aspectos, sendo uma questão importante que deve ser considerada. Primeiramente, o sinal BOLD é proveniente de um efeito produzido em grande parte nas veias, o que limita a especificidade espacial em relação à localização da atividade neuronal, enquanto alterações na perfusão são produzidas na rede de capilares. Além disso, o sinal BOLD não fornece uma medida quantitativa e é influenciado por uma combinação de três parâmetros fisiológicos (CBF, CBV e $CMRO_2$), cuja relação com a atividade neuronal ainda não é completamente entendida, principalmente em patologias neurológicas. Por outro lado, a ASL fornece a medida quantitativa de CBF, que está mais diretamente acoplado à atividade neuronal.

Portanto, as flutuações cerebrais dinâmicas medidas por BOLD e CBF refletem diferentes aspectos da atividade cerebral no estado de repouso, e uma combinação de ambos os métodos pode fornecer informação complementar sobre processos fisiológicos cerebrais, como por exemplo, uma análise da $CMRO_2$. Juntas essas informações podem fornecer uma melhor caracterização espacial, temporal e quantitativa da conectividade funcional no estado de repouso.

Por outro lado, apesar do método baseado no contraste BOLD ser o mais utilizado para imagens funcionais, e apresentar os dados mais robustos, como mostrado no presente estudo, o desenvolvimento da técnica de ASL para esse fim é justificado por alguns fatores:

(1) O sinal de ASL é produzido nos capilares, fornecendo maior especificidade espacial em relação à localização da atividade neuronal (AGUIRRE; DETRE, 2002; SILVA et al., 1995).

(2) ASL fornece uma medida quantitativa de CBF, um parâmetro fisiológico vital para a viabilidade do tecido cerebral, possibilitando a comparação entre indivíduos, tanto em estudos com execução de tarefas, quanto para o cérebro no estado de repouso(CHEN; JANN; WANG, 2015).

(3) O CBF está normalmente acoplado ao metabolismo da glicose e à atividade neuronal (AKGOREN; FABRICIUS; LAURITZEN, 1994; HOGE; PIKE, 2001); então, pode ser considerado como um marcador para função cerebral.

(4) A partir dos dados de ASL, é possível extrair imagens BOLD, obtendo duas informações em uma mesma aquisição, e possibilitando a investigação da $CMRO_2$ (HOGE et al., 1999; WONG; BUXTON; FRANK, 1997).

(5) Em ASL, a ponderação em T2 é minimizada, portanto há menos sensibilidade a efeitos de inomogeneidade de campo magnético, melhorando a análise da conectividade em regiões de altos gradientes de susceptibilidade, como no córtex pré-frontal (CHEN; JANN; WANG, 2015; JANN et al., 2015b; TAK et al., 2014).

Portanto, nossos resultados sugerem utilizar pCASL com TE baixo para obter melhor quantificação de CBF, e análise em grupo conjunta de pBOLD com BOLD para melhor identificação das redes cerebrais de repouso, aproveitando-se da complementaridade das técnicas. Apesar de estar relacionados e refletirem as flutuações hemodinâmicas, BOLD e ASL medem diferentes contrastes do acoplamento do acoplamento neurovascular (JANN et al., 2015b). Além disso, a conectividade funcional e o CBF basal fornecem informações complementares da organização cerebral, pois sua associação representa o grau de otimização de uma região no desempenho eficiente de uma função e seu custo metabólico (TOMASI; WANG; VOLKOW, 2013).

Algumas limitações do presente estudo, já discutidas anteriormente, incluem baixa relação sinal-ruído e baixa resolução temporal da técnica de ASL utilizada. Diferentemente de BOLD e ASL com leitura 3D, há também a não cobertura de todo o encéfalo; no nosso caso, excluímos o cerebelo. Além disso, por ser um experimento longo, optamos por não adquirir mapas de M0 (ponderados em densidade de prótons) e mapas de T1, que seriam utilizados na quantificação do CBF. Optamos por uma metodologia recomendada para esses casos (ALSOP et al., 2015), e obtivemos valores de CBF bem próximos daqueles publicados na literatura. Por fim, é importante ressaltar que as séries temporais de BOLD e ASL foram adquiridas separadamente, o que influencia na comparação entre os resultados.

Portanto, os desafios futuros, principalmente para estudos com diferentes patologias, incluem minimizar os efeitos fisiológicos e de movimento da cabeça, melhorar a resolução temporal, e minimizar os efeitos de tempo de trânsito. Para isso, algumas soluções estão sendo propostas, como a pCASL de eco duplo, que permite obter imagens ponderadas em perfusão e BOLD na mesma aquisição; aquisição com leitura tridimensional, que melhora a estabilidade temporal dos mapas de perfusão; e aquisição em altos campos (> 4T), para aumentar o sinal nas imagens de ASL.

6. CONCLUSÕES

No presente estudo, mostramos a viabilidade de usar sequências de ASL, pulsada e pseudocontínua, comerciais, disponíveis para o uso na rotina clínica, para o estudo da conectividade funcional e da perfusão basal do cérebro em repouso. Redes cerebrais de repouso puderam ser identificadas em análises individuais e em grupo, pelos métodos de ICA e baseado em semente.

O sinal BOLD contaminante das imagens de ASL foi recuperado, resultando nas séries temporais que chamamos de pseudo-BOLD. Essas séries de pBOLD apresentaram os melhores resultados para a identificação das redes em relação às demais séries proporcionadas pelas imagens de ASL. Foi mostrado também que as imagens de pBOLD apresentam relação sinal-ruído mais alta do que os mapas de CBF e perfusão, fatores que influenciam no resultado da identificação das redes.

O Tempo ao eco para aquisição das imagens foi um fator que influenciou os resultados. Quanto maior o TE, maior a contaminação por flutuações BOLD, e melhor a identificação das redes. Entretanto, mostramos que usar valores altos de TE compromete significativamente a estimativa do CBF basal. Portanto, considerando a relação custo-benefício, a melhor alternativa é adquirir imagens pCASL com TE baixo para garantir boa estimativa do CBF basal, e usar suas séries pBOLD para avaliação da conectividade funcional.

Quando se pretende recuperar o sinal BOLD a partir de imagens de ASL o TE mais alto (a partir de 21s) juntamente com uma melhor resolução temporal (TR baixo) são recomendados. A resolução temporal influenciou também os resultados das imagens BOLD havendo perda de redes e de poder estatístico dos mapas de atividade para maiores TRs

Entre os modos PASL e pCASL, o modo pulsado alcançou melhor desempenho para a identificação das redes. Porém o modo pseudocontínuo que permite um melhor cálculo e análises de CBF apresentou desempenho satisfatório para o encontro de redes de repouso bem como para o estudo de parâmetros de conectividade pelo método de grafos.

As diferenças entre os resultados obtidos com ASL e BOLD para a conectividade funcional, bem como as diferenças espaciais e estatísticas entre os mapas são esperadas

devido não apenas às limitações da técnica da ASL mas também à diferença da natureza do sinal entre as duas técnicas.

Devido à junção das informações entre as duas técnicas a caracterização espacial, temporal e quantitativa da conectividade funcional foi obtida. A complementariedade das técnicas é de interesse aplicável e mostrou bons resultados nas análises conjuntas, fornecendo boa identificação das redes e valores de CBF regional.

7. REFERÊNCIAS

ACHARD, S. et al. A resilient, low-frequency, small-world human brain functional network with highly connected association cortical hubs. **J Neurosci**, v. 26, n. 1, p. 63–72, 2006.

AGUIRRE, G. K. et al. Experimental design and the relative sensitivity of BOLD and perfusion fMRI. **NeuroImage**, v. 15, n. 3, p. 488–500, 2002.

AGUIRRE, G. K.; DETRE, J. A. Experimental Design and the Relative Sensitivity of BOLD and Perfusion fMRI. v. 500, p. 488–500, 2002.

AKGOREN, N.; FABRICIUS, M.; LAURITZEN, M. Importance of nitric oxide for local increases of blood flow in rat cerebellar cortex during electrical stimulation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 13, p. 5903–5907, 1994.

ALLEN, E. A et al. A baseline for the multivariate comparison of resting-state networks. **Frontiers in systems neuroscience**, v. 5, n. February, p. 2, 2011a.

ALLEN, E. A. et al. A baseline for the multivariate comparison of resting-state networks. v. 5, n. February, p. 1–23, 2011b.

ALSOP, D. C. et al. Recommended implementation of arterial spin-labeled Perfusion mri for clinical applications: A consensus of the ISMRM Perfusion Study group and the European consortium for ASL in dementia. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 73, n. 1, p. 102–116, 2015.

ALSOP, D. C.; DETRE, J. A. Multisection cerebral blood flow MR imaging with continuous arterial spin labeling. **Radiology**, v. 208, n. 2, p. 410–416, 1998.

BARBIER, E. L.; LAMALLE, L.; DÉCORPS, M. Methodology of brain perfusion imaging. **Journal of magnetic resonance imaging : JMRI**, v. 13, n. 4, p. 496–520, 2001.

BASSETT, D. S.; BULLMORE, E. Small-world brain networks. **Neuroscientist**, v. 12, n. 6, p. 512–523, 2006.

BECKMANN, C. F. et al. Investigations into resting-state connectivity using independent component analysis. n. May, p. 1001–1013, 2005a.

BECKMANN, C. F. et al. Investigations into resting-state connectivity using independent component analysis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1457, p. 1001–1013, 29 maio 2005b.

BEHZADI, Y. et al. A component based noise correction method (CompCor) for BOLD and perfusion based fMRI. **NeuroImage**, v. 37, n. 1, p. 90–101, 2007.

BELLIVEAU, J. W. et al. Functional mapping of the human visual cortex by magnetic resonance imaging. **Science**, v. 254, n. 5032, p. 716–719, 1991.

BISWAL, B. et al. - Functional connectivity in the motor cortex of resting human brain using. **Magn Reson Med**, v. 34, n. 9, p. 537–541, 1995a.

BISWAL, B. et al. Functional Connectivity in the Motor Cortex of Resting Human Brain Using Echo-Planar MRI. **Magn Reson Med**, v. 34, n. 9, p. 537–541, 1995b.

BLOCH, F. Nuclear induction. **Physical Review**, v. 70, n. 7–8, p. 460–474, 1946.

BLONDEL, V. D. et al. Fast unfolding of communities in large networks. **Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment**, v. 10008, n. 10, p. 6, 2008.

BOCCALETTI, S. et al. Complex network theory and the brain. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 369, n. 1653, p. 1–7, 2014.

BOROGOVAC, A.; ASLLANI, I. Arterial spin labeling (ASL) fMRI: Advantages, theoretical constrains and experimental challenges in neurosciences. **International Journal of Biomedical Imaging**, v. 2012, 2012.

BROWN, G. D.; YAMADA, S.; SEJNOWSKI, T. J. **Independent component analysis at the neural cocktail partyTrends in Neurosciences**, 2001.

BULLMORE, E. et al. Complex brain networks: graph theoretical analysis of structural and functional systems. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 10, n. maRcH, p. 186–98, 2009.

BUXTON, R. B. **Dynamic models of BOLD contrastNeuroImage**, 2012.

BUXTON, R. B. The physics of functional magnetic resonance imaging (fMRI). **Reports on progress in physics. Physical Society (Great Britain)**, v. 76, n. 9, p. 96601, 2013.

CALAMANTE, F. et al. Measuring cerebral blood flow using magnetic resonance imaging techniques. **Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 19, n. 7, p. 701–735, 1999.

CALHOUN, V. D. et al. A Method for Making Group Inferences from Functional MRI Data Using Independent Component Analysis. v. 151, p. 140–151, 2001.

CALHOUN, V. D. et al. Ica of Functional Mri Data : an Overview. **4th international symposium on ICA and blind signal separation**, n. April, p. 281–288, 2003a.

CALHOUN, V. D. et al. ICA OF FUNCTIONAL MRI DATA : AN OVERVIEW. n. April, p. 281–288, 2003b.

CALHOUN, V. D.; ADAL, T. Multisubject Independent Component Analysis of fMRI : A Decade of Intrinsic Networks , Default Mode , and Neurodiagnostic Discovery. v. 5, p. 60–73, 2012.

CALHOUN, V. D.; ADALI, T. Multisubject independent component analysis of fMRI: A decade of intrinsic networks, default mode, and neurodiagnostic discovery. **IEEE Reviews in Biomedical Engineering**, v. 5, p. 60–73, 2012.

CASTELLI, F. et al. Movement and mind: a functional imaging study of perception and interpretation of complex intentional movement patterns. **NeuroImage**, v. 12, n. 3, p. 314–25, 2000.

CHEN, C. M. S. T. K. D. . J. J. Interpreting scan data acquired from multiple scanners: A study with Alzheimer's disease. v. 39, n. 3, p. 1180–1185, 2008.

CHEN, H. et al. Analysis of fMRI data by blind separation of data in a tiny spatial domain into independent temporal component. **Brain Topography**, v. 15, n. 4, p. 223–232, 2003.

CHEN, J.; JANN, K.; WANG, D. J. Characterizing Resting-State Brain Function using Arterial-Spin Labeling. **Brain connectivity**, v. 5, n. 9, p. 527–542, 2015.

CHEN, Y.; WANG, D. J. J.; DETRE, J. A. Test-retest reliability of arterial spin labeling with common labeling strategies. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 33, n. 4, p. 940–949, 2011.

CHEN, Y; et. al. Voxel Comparison of Arterial Spin-Labeled Perfusion MRI and FDG-PET in Alzheimer Disease. **Neurology,** v. 77, p 1977-1985, 2011.

CHUANG, K. H. et al. Mapping resting-state functional connectivity using perfusion MRI. **NeuroImage**, v. 40, n. 4, p. 1595–1605, 2008.

COHEN, E. R.; UGURBIL, K.; KIM, S.-G. Effect of basal conditions on the magnitude and dynamics of the blood oxygenation level-dependent fMRI response. **Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 22, n. 9, p. 1042–1053, 2002.

CORDES, D. et al. Hierarchical clustering to measure connectivity in fMRI resting-state data. **Magnetic Resonance Imaging**, v. 20, n. 4, p. 305–317, 2002.

DAI, W. et al. Continuous flow-driven inversion for arterial spin labeling using pulsed radio frequency and gradient fields. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 60, n. 6, p. 1488–1497, 2008.

DELAPAZ, R. L. Echo-planar imaging. **Radiographics**, v. 14, p. 1045–1058, 1994.

DETRE, J. A. et al. Perfusion imaging. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 23, n. 1, p. 37–45, 1992.

DETRE, J. A.; WANG, J. Technical aspects and utility of fMRI using BOLD and ASL. **Clinical Neurophysiology**, v. 113, n. 5, p. 621–634, 2002.

DI, X.; BISWAL, B. B. Identifying the default mode network structure using dynamic causal modeling on resting-state functional magnetic resonance imaging. **NeuroImage**, v. 86, p. 53–59, 2014.

DICE, L. R. . Measures of the Amount of Ecologic Association Between Species. **Ecology**, v. 26, n. 3, p. 297–302, 1945.

ERHARDT, E. B. et al. Comparison of multi-subject ICA methods for analysis of fMRI data. **Human Brain Mapping**, v. 32, n. 12, p. 2075–2095, 2011.

FEDERSPIEL, A. et al. Comparison of spatial and temporal pattern for fMRI obtained with BOLD and arterial spin labeling. **Journal of Neural Transmission**, v. 113, p. 1403–1415, 2006.

FERNÁNDEZ-SEARA, M. A. et al. Effects on resting cerebral blood flow and functional connectivity induced by metoclopramide: A perfusion MRI study in healthy volunteers. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, n. 8, p. 1639–1652, 2011.

FERNÁNDEZ-SEARA, M. A. et al. Resting state functional connectivity of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease assessed using arterial spin-labeled perfusion fMRI. **Human Brain Mapping**, v. 36, n. 5, p. 1937–1950, 2015.

FOX, M. D. et al. The human brain is intrinsically organized into dynamic, anticorrelated functional networks. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 27, p. 9673–8, 2005.

FOX, M. D.; GREICIUS, M. Clinical applications of resting state functional connectivity. **Frontiers in systems neuroscience**, v. 4, n. June, p. 19, 2010.

FOX, P. T. et al. Mapping human visual cortex with positron emission tomography. **Nature**, v. 323, n. 6091, p. 806–9, 1986.

FRISTON, K. J. Functional and effective connectivity: a review. **Brain connectivity**, v. 1, n. 1, p. 13–36, 2011.

FRISTON, K. J. et al. On nodes and modes in resting state fMRI. **NeuroImage**, v. 99, p. 533–547, 2014.

Functional and effective connectivity in neuroimaging: A synthesis. v. 2, p. 56–78, 1995.

GEVERS, S. et al. Intra- and multicenter reproducibility of pulsed, continuous and pseudo-continuous arterial spin labeling methods for measuring cerebral perfusion. **Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 31, n. 8, p. 1706–15, 2011.

GOLAY, X.; PETERSEN, E. Arterial spin labeling: a one-stop-shop for measurement of brain perfusion in the clinical settings. **Engineering in Medicine …**, v. 2007, p. 4320–4323, 2007.

GOLDMAN, R. I. et al. Simultaneous EEG and fMRI of the alpha rhythm. **Neuroreport**, v. 13, n. 18, p. 2487–92, 2002.

GONG, G. et al. Mapping anatomical connectivity patterns of human cerebral cortex using in vivo diffusion tensor imaging tractography. **Cerebral Cortex**, v. 19, n. 3, p. 524–536, 2009.

GREICIUS, M. D. et al. Functional connectivity in the resting brain : A network analysis of the default mode hypothesis. v. 100, n. 1, 2003a.

GREICIUS, M. D. et al. Functional connectivity in the resting brain: a network analysis of the default mode hypothesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 1, p. 253–258, 2003b.

GREICIUS, M. D. et al. Functional connectivity in the resting brain : A network analysis of the default mode hypothesis. v. 100, n. 1, p. 1997, 2003c.

GUOFAN, X. et al. Reliability and precision of pseudo-continuous arterial spin labeling perfusion MRI on 3.0 T and comparison with ^{<FONT SIZE='-1'>15</FONT>}O-water PET in elderly subjects at risk for Alzheimer's disease. **NMR in Biomedicine**, v. 9999, p. n/a, 2009.

GUSNARD, D. A; RAICHLE, M. E. Searching for a baseline: functional imaging and the resting human brain. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 2, n. 10, p. 685–694, 2001.

HARTKAMP, N. S. et al. Distribution of cerebral blood flow in the caudate nucleus, lentiform nucleus and thalamus in patients with carotid artery stenosis. **European Radiology**, v. 21, n. 4, p. 875–881, 2011.

HARTKAMP, N. S.; BOKKERS, R. P. H. Distribution of cerebral blood flow in the caudate nucleus , lentiform nucleus and thalamus in patients with carotid artery stenosis. p. 875–881, 2011.

HERNANDEZ-GARCIA, L. et al. Fast Pseudo-Continuous Arterial Spin Labeling for Functional Imaging Using a Two-Coil System. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 51, n. 3, p. 577–585, 2004.

HIMBERG, J.; HYVA, A.; ESPOSITO, F. Validating the independent components of neuroimaging time series via clustering and visualization. v. 22, p. 1214–1222, 2004.

HIMBERG, J.; HYVÄRINEN, A. Icasso: Software for Investigating the Reliability of Ica Estimates By Clustering and Visualization. p. 259–268, [s.d.].

HOGE, R. D. et al. Stimulus-dependent BOLD and perfusion dynamics in human V1. **Neuroimage**, v. 9, n. 6 Pt 1, p. 573–585, 1999.

HOGE, R. D.; PIKE, G. B. **Oxidative metabolism and the detection of neuronal activation via imagingJournal of Chemical Neuroanatomy**, 2001.

HYVÄRINEN, A.; OJA, E. Independent Component Analysis : Algorithms and Applications. v. 1, n. 1, 2000.

IADECOLA, C.; DAVISSON, R. L. Hypertension and Cerebrovascular Dysfunction. **Cell Metabolism**, v. 7, n. 6, p. 476–484, 2008a.

IADECOLA, C.; DAVISSON, R. L. Review Hypertension and Cerebrovascular Dysfunction. 2008b.

IADECOLA, C.; NEDERGAARD, M. Glial regulation of the cerebral microvasculature. v. 10, n. 11, p. 1369–1376, 2007.

JAHNG, G. H. et al. **Perfusion magnetic resonance imaging: A comprehensive update on principles and techniquesKorean Journal of Radiology**, 2014.

JANN, K. et al. Quantification of network perfusion in ASL cerebral blood flow data with seed based and ICA approaches. **Brain Topography**, v. 26, n. 4, p. 569–580, 2013.

JANN, K. et al. NeuroImage Functional connectivity in BOLD and CBF data : Similarity and reliability of resting brain networks. **NeuroImage**, v. 106, p. 111–122, 2015a.

JANN, K. et al. Functional connectivity in BOLD and CBF data: SIMILARITY and reliability of resting brain networks. **NeuroImage**, v. 106, p. 111–122, 2015b.

LAI, S. et al. Identification of vascular structures as a major source of signal contrast in high resolution 2D and 3D functional activation imaging of the motor cortex at l.5T preliminary results. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 30, n. 3, p. 387–392, 1993.

LEE, M. H.; SMYSER, C. D.; SHIMONY, J. S. Resting-State fMRI: A Review of Methods and Clinical Applications. **American Journal of Neuroradiology**, 2012.

LEE, M. H.; SMYSER, C. D.; SHIMONY, J. S. Resting state fMRI: A review of methods and clinical applications. **AJNR. American journal of neuroradiology**, v. 34, n. 10, p. 1866–1872, 2013.

LEONI, R. F. Avaliação da perfusão sangüínea cerebral em modelos animais de hipertensão utilizando Arterial Spin Labeling. 2011.

LI, W. et al. Changes in regional cerebral blood flow and functional connectivity in the cholinergic pathway associated with cognitive performance in subjects with mild Alzheimer's disease after 12-week donepezil treatment. **NeuroImage**, v. 60, n. 2, p. 1083–1091, 2012.

LI, Y.-O.; ADALI, T.; CALHOUN, V. D. Estimating the number of independent components for functional magnetic resonance imaging data. **Human brain mapping**, v. 28, n. 11, p. 1251–1266, 2007.

LIANG, X. et al. Coupling of functional connectivity and regional cerebral blood flow reveals a physiological basis for network hubs of the human brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 5, p. 1929–34, 2013a.

LIANG, X. et al. Coupling of functional connectivity and regional cerebral blood fl ow reveals a physiological basis for network hubs of the human brain. v. 110, n. 5, 2013b.

LIANG, X.; CONNELLY, A.; CALAMANTE, F. Graph analysis of resting-state ASL perfusion MRI data: Nonlinear correlations among CBF and network metrics. **NeuroImage**, v. 87, p. 265–275, 2014a.

LIANG, X.; CONNELLY, A.; CALAMANTE, F. NeuroImage Graph analysis of resting-state ASL perfusion MRI data : Nonlinear correlations among CBF and network metrics. **NeuroImage**, v. 87, p. 265–275, 2014b.

LIANG, X.; YEH, C.-H. Editorial : Arterial Spin Labeling fMRI : Is It Ready For Functional Connectivity ? **Jacobs Journal of Medical Diagonsis and Medical Imaging**, n. MAY, p. 2–4, 2015.

LOGOTHETIS, N. K. et al. Neurophysiological investigation of the basis of the fMRI signal. **Nature**, v. 412, n. 6843, p. 150–157, 2001.

MACINTOSH, B. J. et al. Multiple inflow pulsed arterial spin-labeling reveals delays in the arterial arrival time in minor stroke and transient ischemic attack. **American Journal of Neuroradiology**, v. 31, n. 10, p. 1892–1894, 2010.

MAGISTRETTI, P. J.; PELLERIN, L. Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 354, n. 1387, p. 1155–63, 1999.

MCKEOWN, M. J. et al. Analysis of fMRI data by blind separation into independent spatial components. **Human Brain Mapping**, v. 6, n. 3, p. 160–188, 1998a.

MCKEOWN, M. J. et al. Analysis of fMRI data by blind separation into independant spatial components. **Human Brain Mapping**, v. 6, n. June 1997, p. 160–188, 1998b.

MISHALI, M.; ELDAR, Y. C. From theory to practice: Sub-Nyquist sampling of sparse wideband analog signals. **IEEE Journal on Selected Topics in Signal Processing**, v. 4, n. 2, p. 375–391, 2010.

MITSCHELEN, M. et al. Basal and hypercapnia-altered cerebrovascular perfusion predict mild cognitive impairment in aging rodents. **Neuroscience**, v. 164, n. 3, p. 918–928, 2009a.

MITSCHELEN, M. et al. BASAL AND HYPERCAPNIA-ALTERED CEREBROVASCULAR PERFUSION PREDICT MILD COGNITIVE IMPAIRMENT IN AGING RODENTS. v. 164, p. 918–928, 2009b.

NEWTON, A. T. et al. Modulation of steady state functional connectivity in the default mode and working memory networks by cognitive load. **Human Brain Mapping**, v. 32, n. 10, p. 1649–1659, 2011.

NEZAMZADEH, M. et al. Improved pseudo-continuous arterial spin labeling for mapping brain perfusion. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 31, n. 6, p. 1419–1427, 2010.

OGAWA, S. et al. Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 24, p. 9868–72, 1990.

OGAWA, S.; LEE, T. M. Magnetic resonance imaging of blood vessels at high fields: in vivo and in vitro measurements and image simulation. **Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine**, v. 16, n. 1, p. 9–18, 1990.

ONIAS, H. et al. Brain complex network analysis by means of resting state fMRI and graph analysis: Will it be helpful in clinical epilepsy? **Epilepsy and Behavior**, v. 38, p. 71–80, 2014.

PAIVA, F. F.; TANNU, A. Review Article Measurement of cerebral perfusion territories using arterial spin labelling. n. May, p. 633–642, 2007.

PETERSEN, E. T. et al. Non-invasive measurement of perfusion: A critical review of arterial spin labelling techniques. **British Journal of Radiology**, v. 79, n. 944, p. 688–

701, 2006.

PETERSEN, E. T.; LIM, T.; GOLAY, X. Model-free arterial spin labeling quantification approach for perfusion MRI. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 55, n. 2, p. 219–232, 2006.

POLLOCK, J. M. et al. **Arterial Spin-Labeled MR Perfusion Imaging: Clinical ApplicationsMagnetic Resonance Imaging Clinics of North America**, 2009.

RAICHLE, M. E. Behind the scenes of functional brain imaging: A historical and physiological perspective. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 3, p. 765–772, 1998.

RAICHLE, M. E. et al. A default mode of brain function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 2, p. 676–82, 2001.

SALVADOR, R. et al. Neurophysiological architecture of functional magnetic resonance images of human brain. **Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)**, v. 15, n. 9, p. 1332–42, 2005.

SILVA, A. C. et al. Multi-slice MRI of rat brain perfusion during amphetamine stimulation using arterial spin labeling. **Magn Reson Med**, v. 33, n. 2, p. 209–214, 1995.

SMITH, S. M. et al. Correspondence of the brain's functional architecture during activation and rest. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 31, p. 13040–5, 2009.

TAK, S. et al. Dynamic and static contributions of the cerebrovasculature to the resting-state BOLD signal. **NeuroImage**, v. 84, p. 672–680, 2014.

THOMAS, D. L. et al. In Vivo Measurement of the Longitudinal Relaxation Time of Arterial Blood (T 1a) in the Mouse Using a Pulsed Arterial Spin Labeling Approach. v. 947, p. 943–947, 2006.

THULBORN, K. R. et al. Oxygenation dependence of the transverse relaxation time of water protons in whole blood at high field. **BBA - General Subjects**, v. 714, n. 2, p. 265–270, 1982.

TOMASI, D.; WANG, G.-J.; VOLKOW, N. D. Energetic cost of brain functional connectivity. **PNAS**, v. 110, n. 33, p. 13642–13647, 2013.

VAN DE VEN, V. G. et al. Functional connectivity as revealed by spatial independent component analysis of fMRI measurements during rest. **Human Brain Mapping**, v. 22, n. 3, p. 165–178, 2004.

VAN DEN HEUVEL, M. P.; HULSHOFF POL, H. E. **Exploring the brain network: A review on resting-state fMRI functional connectivityEuropean Neuropsychopharmacology**, 2010.

VAN DIJK, K. R. A et al. Intrinsic functional connectivity as a tool for human connectomics: theory, properties, and optimization. **Journal of neurophysiology**, v. 103, n. 1, p. 297–321, 2010.

VIVIANI, R.; MESSINA, I.; WALTER, M. Resting state functional connectivity in perfusion imaging: Correlation maps with Bold connectivity and resting state perfusion. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, 2011.

WANG, J. et al. Empirical analyses of null-hypothesis perfusion FMRI data at 1.5 and 4 T. **NeuroImage**, v. 19, n. 4, p. 1449–1462, 2003.

WANG, J. et al. Parcellation-dependent small-world brain functional networks: a resting-state fMRI study. **Hum Brain Mapp**, v. 30, n. 5, p. 1511–1523, 2009.

WANG, J. et al. Graph-based network analysis of resting-state functional MRI. **Neuroscience**, v. 4, n. June, p. 1–14, 2010.

WANG, Y.; LI, T.-Q. Dimensionality of ICA in resting-state fMRI investigated by feature optimized classification of independent components with SVM. **Frontiers in human neuroscience**, v. 9, n. May, p. 259, 2015.

WANG, Z. et al. Empirical optimization of ASL data analysis using an ASL data processing toolbox: ASLtbx. **Magnetic Resonance Imaging**, v. 26, n. 2, p. 261–269, 2008.

WILLIAMS, D. S. et al. Magnetic resonance imaging of perfusion using spin inversion of arterial water. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 1, p. 212–6, 1992.

WINTERMARK, M. et al. Comparative overview of brain perfusion imaging techniques. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 36, n. 9, p. e83–e99, 2005.

WONG, E. C. New developments in arterial spin labeling pulse sequences. **NMR in Biomedicine**, v. 26, n. 8, p. 887–891, 2013.

WONG, E. C.; BUXTON, R. B.; FRANK, L. R. Implementation of quantitative perfusion imaging techniques for functional brain mapping using pulsed arterial spin labeling. **NMR in Biomedicine**, v. 10, n. 4–5, p. 237–249, jun. 1997.

WONG, E. C.; BUXTON, R. B.; FRANK, L. R. A theoretical and experimental comparison of continuous and pulsed arterial spin labeling techniques for quantitative perfusion imaging. **Magnetic resonance in medicine**, v. 40, n. 3, p. 348–55, set. 1998.

WU, B. et al. Intra- and interscanner reliability and reproducibility of 3D whole-brain pseudo-continuous arterial spin-labeling MR perfusion at 3T. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 39, n. 2, p. 402–409, 2014.

WU, W. C. et al. A theoretical and experimental investigation of the tagging efficiency of pseudocontinuous arterial spin labeling. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 58, n. 5, p. 1020–1027, 2007.

WU, W. C. et al. Pseudocontinuous arterial spin labeling perfusion magnetic resonance imaging-A normative study of reproducibility in the human brain. **NeuroImage**, v. 56, n. 3, p. 1244–1250, 2011.

ZANG, Y. et al. Regional homogeneity approach to fMRI data analysis. **NeuroImage**, v.

22, n. 1, p. 394–400, 2004.

ZANG, Y. et al. Altered baseline brain activity in children with ADHD revealed by resting-state functional MRI. **Brain Dev**, v. 29, n. 2, p. 83–91, 2007.

ZELLER, M. et al. Boosting BOLD fMRI by K-Space Density Weighted Echo Planar Imaging. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. 1–11, 2013.

ZHU, S. et al. Resting State Brain Function Analysis Using Concurrent BOLD in ASL Perfusion fMRI. v. 8, n. 6, p. 4–13, 2013a.

ZHU, S. et al. Resting State Brain Function Analysis Using Concurrent BOLD in ASL Perfusion fMRI. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 4–12, 2013b.

ZOU, Q. et al. Static and dynamic characteristics of cerebral blood flow during the resting state. **NeuroImage**, v. 48, n. 3, p. 515–524, 2009.

ZOU, Q. et al. Detecting static and dynamic differences between eyes-closed and eyes-open Resting states using ASL and BOLD fMRI. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–12, 2015.

ZOU, Q. H. et al. An improved approach to detection of amplitude of low-frequency fluctuation (ALFF) for resting-state fMRI: Fractional ALFF. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 172, n. 1, p. 137–141, 2008.

8. ANEXOS

ANEXO A – PARECER FFCLRP

FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO- USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Cognição e Conectividade Funcional Cerebral em Repouso por meio de Imagens por Ressonância Magnética

Pesquisador: Renata Ferranti Leoni

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 49718215.1.0000.5407

Instituição Proponente: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto- USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.426.868

Apresentação do Projeto:

vide relato anterior

Objetivo da Pesquisa:

vide relato anterior

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

vide relato anterior

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

vide relato anterior

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos adequados

Recomendações:

As alterações no TCLE visaram atender às solicitações do relato anterior. Entretanto, o nível de detalhamento apresentado culminou em um documento extenso. Como recomendação, pode-se retirar as informações do recrutamento do TCLE (mantendo-se apenas no projeto) e as informações sobre os testes a que os participantes serão submetidos durante o exame de ressonância magnética podem ser abreviadas (mas não retiradas por completo). Além disso, as

Endereço: Av. Bandeirantes 3.900
Bairro: Monte Alegre **CEP:** 14.040-901
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-4811 **Fax:** (16)3315-9101 **E-mail:** coetp@ffclrp.usp.br

assinaturas não devem ficar "soltas" na terceira página.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_556573.pdf	21/12/2015 19:10:38		Aceito
Outros	TCLE_RevisadoComentado.pdf	21/12/2015 19:09:13	Renata Ferranti Leoni	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Revisado.pdf	21/12/2015 19:07:59	Renata Ferranti Leoni	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoPesquisa_Revisado.pdf	21/12/2015 19:07:14	Renata Ferranti Leoni	Aceito
Outros	CartaResposta.pdf	21/12/2015 19:06:13	Renata Ferranti Leoni	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLErevisado.pdf	18/09/2015 10:41:36	Renata Ferranti Leoni	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDePesquisa.pdf	08/09/2015 13:54:21	Renata Ferranti Leoni	Aceito
Outros	SymbolDigit.pdf	08/09/2015 13:53:27	Renata Ferranti Leoni	Aceito
Outros	BeckAnsiedade.pdf	08/09/2015 13:52:53	Renata Ferranti Leoni	Aceito
Outros	BeckDepressao.pdf	08/09/2015 13:52:28	Renata Ferranti Leoni	Aceito
Outros	ProtocoloDeAnamnese.pdf	08/09/2015 13:51:37	Renata Ferranti Leoni	Aceito
Orçamento	OrcamentoFinanceiro.pdf	08/09/2015 13:49:45	Renata Ferranti Leoni	Aceito
Outros	ManifestacaoInstituicaoCoparticipante.pdf	08/09/2015 13:48:34	Renata Ferranti Leoni	Aceito
Outros	ProjetoDePesquisa.pdf	08/09/2015 13:45:50	Renata Ferranti Leoni	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto.pdf	08/09/2015	Renata Ferranti	Aceito

Endereço: Av. Bandeirantes 3.900
Bairro: Monte Alegre **CEP:** 14.040-901
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-4811 **Fax:** (16)3315-9101 **E-mail:** coetp@ffclrp.usp.br

FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO- USP

Continuação do Parecer: 1.426.868

Folha de Rosto	FolhaDeRosto.pdf	13:45:19	Leoni	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

RIBEIRAO PRETO, 26 de Fevereiro de 2016

Assinado por:
Marina Rezende Bazon
(Coordenador)

Endereço: Av. Bandeirantes 3.900
Bairro: Monte Alegre **CEP:** 14.040-901
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-4811 **Fax:** (16)3315-9101 **E-mail:** coetp@ffclrp.usp.br

ANEXO B – PARECER FFCLRP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP -

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Cognição e Conectividade Funcional Cerebral em Repouso por meio de Imagens por Ressonância Magnética

Pesquisador: Renata Ferranti Leoni

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 49718215.1.3001.5440

Instituição Proponente: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto- USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.428.742

Apresentação do Projeto:

De acordo com o parecer da Instituição Proponente.

Objetivo da Pesquisa:

De acordo com o parecer da Instituição Proponente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com o parecer da Instituição Proponente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

De acordo com o parecer da Instituição Proponente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentou carta de anuência do responsável pelo local de coleta no HCFMRP-USP.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O CEP tomou ciência e concorda com o parecer da Instituição Proponente.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

Considerações Finais a critério do CEP:

"O CEP do HC e da FMRP-USP concorda com o parecer ético emitido pelo CEP da Instituição Proponente, que cumpre as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 466/12. Diante disso, o HCFMRP-USP, como instituição co-participante do referido projeto de pesquisa, está ciente de suas co-responsabilidades e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos desta pesquisa, dispondo de infra-estrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar".

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_556573.pdf	21/12/2015 19:10:38		Aceito
Outros	TCLE_RevisadoComentado.pdf	21/12/2015 19:09:13	Renata Ferranti Leoni	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Revisado.pdf	21/12/2015 19:07:59	Renata Ferranti Leoni	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoPesquisa_Revisado.pdf	21/12/2015 19:07:14	Renata Ferranti Leoni	Aceito
Outros	CartaResposta.pdf	21/12/2015 19:06:13	Renata Ferranti Leoni	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_556573.pdf	18/09/2015 10:42:07		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLErevisado.pdf	18/09/2015 10:41:36	Renata Ferranti Leoni	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_556573.pdf	08/09/2015 13:55:47		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDePesquisa.pdf	08/09/2015 13:54:21	Renata Ferranti Leoni	Aceito
Outros	SymbolDigit.pdf	08/09/2015 13:53:27	Renata Ferranti Leoni	Aceito
Outros	BeckAnsiedade.pdf	08/09/2015 13:52:53	Renata Ferranti Leoni	Aceito
Outros	BeckDepressao.pdf	08/09/2015 13:52:28	Renata Ferranti Leoni	Aceito

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP -

Continuação do Parecer: 1.428.742

Outros	ProtocoloDeAnamnese.pdf	08/09/2015 13:51:37	Renata Ferranti Leoni	Aceito
Orçamento	OrcamentoFinanceiro.pdf	08/09/2015 13:49:45	Renata Ferranti Leoni	Aceito
Outros	ManifestacaoInstituicaoCoparticipante.pdf	08/09/2015 13:48:34	Renata Ferranti Leoni	Aceito
Outros	ProjetoDePesquisa.pdf	08/09/2015 13:45:50	Renata Ferranti Leoni	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto.pdf	08/09/2015 13:45:19	Renata Ferranti Leoni	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

RIBEIRAO PRETO, 29 de Fevereiro de 2016

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

ANEXO C – TCLE

FFCLRP-USP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: COGNIÇÃO E CONECTIVIDADE FUNCIONAL CEREBRAL EM REPOUSO POR MEIO DE IMAGENS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

O senhor(a) está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa que tem como objetivo avaliar a circulação e o funcionamento do cérebro de pessoas saudáveis durante a execução de tarefas simples e durante o repouso (ausência de tarefas). O motivo da realização deste estudo é a importância de entender como o cérebro de pessoas saudáveis funciona para depois entender os problemas cerebrais existentes em pacientes com diferentes doenças. Os participantes, homens e mulheres, com idade mínima de 18 anos, são recrutados entre alunos e funcionários do Departamento de Física da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP – USP) e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP – USP), por meio de cartazes colocados nas duas instituições.

Será realizado um exame na máquina de Ressonância Magnética no HCFMRP – USP, no Campus de Ribeirão Preto. Esse aparelho tem a forma de um grande tubo de metal, largo, com uma abertura por onde o senhor(a) entrará deitado(a) de barriga para cima. Essa máquina produz um campo magnético, como se fosse um imã, que passa através do seu corpo sem prejudicar qualquer parte dele. A função dela será de produzir imagens do seu cérebro, além de demonstrar o funcionamento dele. Nada disso será sentido e não fará mal a sua saúde. Durante o exame, é necessário executar algumas tarefas e permanecer o mais parado possível. As tarefas que serão realizadas dentro da máquina são simples. Uma delas será de geração de palavras, ou seja, categorias (por exemplo, utensílios de cozinha) serão mostradas para o senhor(a), que deverá pensar em palavras pertencentes a esssa categoria (por exemplo, garfo, faca, colher, etc). A outra tarefa será de associação de símbolos com números, ou seja, serão apresentados símbolos para o senhor(a), que deverá falar o número correspondente a cada símbolo de acordo com uma chave de resposta. Antes do início do exame, essas tarefas serão explicadas ao senhor(a) detalhadamente. Para comparação do desempenho, essas tarefas também serão realizadas fora da máquina de Ressonância Magnética, juntamente com a realização de uma avaliação neuropsicológica em que o senhor(a) deverá responder a alguns questionários para coleta de dados pessoais e demográficos, antecedentes clínicos, uso de medicação, histórico familiar de doenças, aspectos comportamentais e cognitivos, e avaliação de sintomas depressivos e de ansiedade. Essa avaliação levará de 30 a 45 minutos. Além disso, o senhor(a) passará por uma entrevista de aproximadamente 5 minutos com um enfermeiro do HC; essa entrevista é obrigatória para todas as pessoas que irão fazer exames de imagem por ressonância magnética. Com os dados dessas avaliações, os pesquisadores decidirão se irão incluir o senhor(a) no estudo.

A permanência dentro da máquina será por um período médio de 45 minutos. Dependendo da roupa que estiver usando, poderá ser pedido a utilizar um roupão do Hospital, a fim de garantir seu conforto e não gerar problema nas imagens. Assim, se concordar em participar do estudo, o senhor(a) deverá comparecer ao HC do Campus, por um dia, a ser agendado pelos pesquisadores e autorizar esses pesquisadores a analisar seu exame. Durante o exame, o senhor(a) poderá sentir-se desconfortável pois a máquina fará um barulho alto, bem como pela permanência, por um período de 45 minutos, sem realizar muitos movimentos. Para minimizar esse desconforto, serão utilizados protetores de ouvido e almofadas. Além disso, o senhor(a) poderá ser retirado da máquina a qualquer momento. A realização do exame não prejudicará sua saúde e o senhor(a) não sentirá dor. Após ser realizado, o exame será avaliado por um médico radiologista experiente do HC; e, no caso de observação de alguma alteração no exame, o senhor(a) será prontamente encaminhado para o serviço de saúde mais apropriado.

As informações coletadas neste estudo serão anexadas ao seu prontuário no HC, os médicos e outros profissionais autorizados a terem acesso ao prontuário terão acesso às informações. Além disto, estas informações serão vistas e analisadas apenas pelos pesquisadores responsáveis por este estudo. As informações poderão ser comunicadas para outros pesquisadores e médicos, mas sua identidade será mantida em sigilo. Nenhuma informação que possa revelar sua identidade estará disponível para quaisquer pessoas ou em quaisquer textos ou publicações. Essas informações serão mantidas em um banco de dados do Centro de Ciências das Imagens da Física Médica no HC.

É importante que saiba que sua participação é completamente voluntária e que poderá decidir não participar do estudo quando quiser, sem perder o direito de receber cuidados médicos de rotina, ou quaisquer outros benefícios aos quais tenha direito, oferecidos pelas instituições envolvidas neste estudo, qualquer que seja sua decisão. Além disso, o senhor(a) não receberá compensação financeira relacionada a sua participação neste estudo. Da mesma forma,

FFCLRP-USP

o senhor(a) não terá despesa pessoal em qualquer fase do estudo, incluindo o exame. Durante o período de sua participação, a despesa relacionada ao transporte até o HC será reembolsada. Este documento é um termo de consentimento que o senhor(a) deverá assinar se concordar em participar do estudo, após entender todas as informações presente nele e esclarecer todas as dúvidas que tiver. Após assinar este termo, o senhor(a) receberá uma cópia dele. Em caso de eventuais dúvidas sobre questões éticas deste estudo, o senhor(a) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP.

Comitê de Ética em Pesquisa
Avenida Bandeirantes, 3900 - Bloco 23 - Casa 37 - 14040-901 - Ribeirão Preto - SP - Brasil
Fone: (16) 3315-4811 / Fax: (16) 3633-2660
E-mail coetp@ffclrp.usp.br

Caso o senhor(a) tenha perguntas, dúvidas ou qualquer outra informação que deseje saber a respeito deste estudo, poderá entrar em contato com os pesquisadores do Departamento de Física (FFCLRP - USP), citados abaixo.

Profa. Dra. Renata Ferranti Leoni. Telefone: (16) 3315-0083 / (16) 99401-6368
Luciana da Mata Mônaco. Telefone: (16) 3315-3721 / (16) 99141-9299
Pedro Henrique Rodrigues da Silva. Telefone: (16) 3315-3721 / (19) 991960857

Os detalhes deste estudo foram explicados a você, que teve a oportunidade de fazer todas as perguntas aos pesquisadores. Se tiver lido o termo de consentimento livre e esclarecido (ou se ele tiver sido explicado para você), tiver entendido a informação e concordar voluntariamente em participar deste estudo, por favor, assine abaixo:

_____ _____
Nome do Voluntário (impresso ou em letra de forma) Assinatura do Voluntário

Data: ____/____/____ Hora: _____

_____ _____
Nome da Testemunha (impresso ou em letra de forma) Assinatura da Testemunha

Data: ____/____/____ Hora: _____

Declaração do Pesquisador

Declaro que revisei este estudo e o termo de consentimento com o participante. Segundo meu entendimento, ele compreendeu os objetivos, os procedimentos, riscos e benefícios do estudo.

_____ _____
Nome do Pesquisador (impresso ou em letra de forma) Assinatura do Pesquisador

Data: ____/____/____ Hora: _____