UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE FÍSICA E MATEMÁTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA APLICADA À MEDICINA E BIOLOGIA

ANDRÉ SALLES CUNHA PERES

Desenvolvimento de Protocolos de Neuronavegação para Estudos de Estimulação Magnética Transcraniana e suas Aplicações em Voluntários Controle e Pacientes com Acidente Vascular Cerebral

Ribeirão Preto - SP
Outubro de 2012

ANDRÉ SALLES CUNHA PERES

Desenvolvimento de Protocolos de Neuronavegação para Estudos de Estimulação Magnética Transcraniana e suas Aplicações em Voluntários Controle e Pacientes com Acidente Vascular Cerebral

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP.

Área de Concentração: Física Aplicada à Medicina e Biologia.
Orientador: Prof. Dr. Oswaldo Baffa Filho
Co-Orientador: Prof. Dr. Dráulio Barros de Araújo

Ribeirão Preto – SP

Outubro de 2012

FICHA CATALOGRÁFICA

FOLHA DE APROVAÇÃO

André Salles Cunha Peres

Desenvolvimento de Protocolos de Neuronavegação para Estudos de Estimulação Magnética Transcraniana e suas Aplicações em Voluntários Controle e Pacientes com Acidente Vascular Cerebral

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada à Medicina e Biologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura: _____

À Natal, Rio e Ribeirão

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus orientadores, professor Baffa e professor Dráulio, pela dedicação, ensinamentos e oportunidades que vocês me proporcionaram. Foi um prazer trabalhar com vocês por esses mais de onze anos e espero que muitos outros estejam por vir.

Agradeço também aos meus grandes amigos Kelley, Victor Hugo e Marquinho. Tenho muita sorte de ter vocês como amigos e companheiros de trabalho, sem a colaboração de vocês essa tese não existiria.

A todos os meninos da iniciação científica que trabalharam nesse projeto, inclusive alguns deles já estão na pos-graduação, Eduardo (Cueio), Victor (Burro), João (Cueca) e Rakauskas (Didi). Fico feliz em ver a dedicação vocês e o avanço acadêmico que vocês tiveram nesses anos. Gostaria de deixar um abraço especial pro Didi, que me ajudou muito na caracterização física dos equipamentos de TMS.

Às minhas amigas e colegas de trabalho do NeuroImago de Natal, Kátia, Morgana, Fernanda e Heloisa. É muito bom ter com quem discutir, debater novas ideias e manter um ambiente de trabalho tão agradável, beijão "proceis".

Ao Dr. Jorge Vicente pelo apoio ao projeto do Neuronavegador InVesalius e aos meus amigos Tatiana, Paulo e Thiago pela dedicação ao longo desses quatro anos na criação do Neuronavegador.

A professora Claudia (Tita) por ter me ensinado a dar os primeiros passos com a TMS e por sempre manter as portas abertas, além de todo o incentivo durante todos esses anos. Agradeço também aos meus amigos do Rio, Marquinho, João e Edgar pela coleta dos dados.

Ao professor Octávio por toda a disponibilidade e incentivo, e por ter viabilizado os experimentos com os pacientes. Agradeço também a Kelley e a Taiza pela ajuda no planejamento do experimento e pela seleção dos pacientes.

Ao professor Garrido pela dedicação e disponibilidade nas medidas de campo magnético utilizando MRI e ao Danilo pelo auxílio no processamento dessas imagens.

Ao professor Antônio Carlos por sempre ser muito solícito toda vez que precisamos realizar medidas na ressonância, e nas questões do Procad-NF de Ribeirão e Natal.

Ao professor João Leite por sempre nos auxiliar quando precisamos, principalmente nas questões que envolveram o Procad de Ribeirão e Rio de Janeiro.

Ao coordenador da pós-graduação professor Marcelo Mulato, sempre muito atencioso todas as vezes que precisei.

Agradeço a todos o professores e técnicos do departamento de Física, pela amizade e excelente convivência.

Ao Técnico Lorenço, profissional de conhecimento muito vasto, por sempre estar pronto para ajudar, e por todo aprendizado de laboratório que eu tive com você nesses mais de 11 anos de trabalho.

Aos técnicos Aziani e Renato, por todo suporte da ofinina mecânica. As peças que vocês produzem são verdadeiras obras de arte.

Aos meus amigos de Ribeirão, que não listarei todos aqui senão daria outro livro, saudade de vocês. Em especial gostaria de saudar os Cavaleiros Grutescos, com quem vivi boa parte da minha vida: ipi, ipi, uha!!! Valeu Morcegada.

Aos meus amigos de Natal que me acolheram tão bem nessa cidade, foi quase como se tivessem trazido o mar pra Ribeirão (tirando o Pinguim, Colorado e o Marcão). Agradeço também o Instituto do Cérebro por me fornecer todo o respaldo desse último ano de trabalho.

À Patríssia e Fábio pela correção do manuscrito.

Aos meus pais, Roberto e Maria Ângela, por todo incentivo e apoio incondicional, e pelas sugestões no manuscrito. Aos meus irmão, Eduardo e Fernanda, pelo companheirismo. E à Carol, por estar sempre próxima e pelas ajudas com o manuscrito.

Agradeço as agências de fomento, CAPES, CNPq e Fapesp. Em especial gostaria de agradecer ao Procad e Procad-NF, sem o auxílio desses programas esse trabalho não teria sido possível.

Aos membros da banca por aceitarem o convite para participar da defesa.

Enfim, gostaria de agradecer à todos os voluntários desse trabalho, que se sujeitaram a longas horas de exames, voltando ao hospital sempre que lhes foi requerido, e muitas vezes tendo que se deslocar de locais distantes para a realização do experimento. Sou realmente muito grato a vocês.

Sumário

Lista de figuras ..... **xv**

Resumo ..... **xxi**

Considerações Iniciais **1**

Introdução **9**

2.1 Estimulação Magnética Transcraniana 11

2.1.1 pTMS 13

2.2 Mapeamento do campo magnético por imagens de fase 16

2.3 Imagem funcional por ressonância magnética 18

2.4 Neuronavegação 26

2.5 Aplicações em pacientes com Acidente Vascular cerebral 28

Objetivos **33**

3.1 Objetivo Principal 35

3.2 Objetivos Específicos 35

Material e Métodos **37**

4.1 Equipamentos de TMS e de MRI 39

4.1.1 Mapeamento vetorial do campo magnético produzido pela bobina plana em forma de 8 40

4.1.2 Implementação do Neuronavegador 44

4.1.3 Implementação da ferramenta de análise de MEP (*MEPHunter*) 47

4.1.4 Implementação da ferramenta de corregistro dos mapas de MEP e fMRI (TMSProjection) 50

4.2 Aplicação em Pacientes com AVC 51

4.2.1 População de Estudo 51

4.2.2 Equipamentos utilizados 53

4.2.3 Protocolo de aquisição da fMRI 54

4.2.4 Comparação dos mapas de TMS e fMRI 55

4.2.5 Avaliação dos efeitos da SES por TMS 59

4.2.6 Avaliação dos efeitos da SES por fMRI em indivíduos assintomáticos 60

4.2.7 Teste estatísticos utilizados 62

Resultados e Discussão **63**
5.1 Desenvolvimento tecnológico 65
5.1.1 Mapeamento espacial do campo magnético e confecções de novas geometrias de bobinas de TMS 65
5.1.2 Implementação do Neuronavegador 75
5.1.3 Implementação do MEPHunter 80
5.1.4 Implementação do TMSProjection 91
5.2 Aplicação em Pacientes com AVC 94
5.2.1 Estudos dos mapas motores por fMRI e TMS 94
5.2.2 Avaliação dos efeitos da SES por TMS 103
5.2.3 Avaliação dos efeitos da SES por fMRI 108

Conclusões **119**
6.1 Desenvolvimento tecnológico 121
6.2 Aplicações em Pacientes com AVC 122
6.2.1 Correlação entre os mapas de MEP e de fMRI 122
6.2.2 Avaliação dos efeitos da SES por TMS e fMRI 122

Considarações Finais **123**

Perspectivas Futuras **127**

Referências **131**

Anexos **143**
Anexo I 145
Anexo II 146

Lista de figuras

Figura 1. Número de publicações que fizeram uso da TMS de 1985 a 2010. Essas informações foram obtidas fazendo uma busca usando as palavras chave "Transcranial Magnetic Stimulation" no site ISI Web of Knowledge. 4

Figura 2. Imagem de raios-X de uma bobina em forma de 8 mostrando a orientação do enrolamento feito de fio de cobre. 11

Figura 3. Esquema representativo das principais formas de aplicação dos pulsos magnéticos pelo TMS. As linhas em vermelho representam o evento do disparo. pTMS - estimulação de pulso único; ppTMS - a estimulação por pulso pareado; rTMS – estimulação repetitiva. 12

Figura 4. Sinal de MEP característico. No detalhe é possível observar o artefato de TMS seguido pelo MEP. 14

Figura 5. Exemplo de uma aquisição contínua do sinal de EMG em um exame de TMS. É interessante observar a variação de amplitude dos MEP durante a aquisição. (b) MEP característico, da região circulada em vermelho da parte (a) da figura acima. 15

Figura 6. Exemplo de como os cortes das EPI são posicionados em relação à cabeça. As linhas em amarelo representam cortes axiais das EPI. 19

Figura 7. Exemplo de como as séries temporais são criadas. O retângulo em amarelo representa um dos cortes do volume espacial, e os pontos coloridos representa o mesmo voxel em aquisições distintas (diferentes TR), cuja variação de brilho gera a série temporal representada pelo gráfico mais à direita, abaixo. 20

Figura 8. Esquema de correção de artefato de movimento. A figura da esquerda mostra, de maneira didática, imagens do mesmo corte com orientações diferentes e após a correção as imagens são alinhadas, como mostrado na figura à direita. 21

Figura 9. Ilustração da correção temporal entre fatias. O sinal em preto representa o modelo das séries temporais. Os sinais vermelho, verde e azul representam sinais de cortes adquiridos em tempos diferentes. Nota-se que o sinal em verde está adiantado com relação ao vermelho, e o azul com relação a todos. Após a aplicação da correção temporal, todos os sinais ficam em fase. 21

Figura 10. Ilustração da aplicação do filtro gaussiano. À esquerda, a imagem original, à direita a imagem após a aplicação do filtro Gaussiano. 22

Figura 11. Sobreposição dos mapas estatísticos em imagens de boa resolução anatômica. Nesse exemplo é mostrado a sobreposição de um mapa estatístico (figura de cima), nas imagens de alta resolução anatômica (figuras de baixo). A figura do canto superior direito representa o mapa estatístico após a aplicação do limiar de significância estatística. 25

Figura 12. Exemplo de corregistro em um neuronavegador da cabeça de um voluntário com a sua respectiva reconstrução volumétrica da imagem de ressonância. Os pontos em azul e verde representam as marcações na touca e o ponto vermelho representa a posição da ponteira da sonda. 27

Figura 13. (a) Representação virtual da bobina em forma de 8 corregistrada com a distribuição de seu mapa de campo. (b) Exemplo de um neuronavegador, após o corregistro da bobina em forma de 8 e seu mapa de campo magnético com as imagens de tomografia computadorizada do mesmo indivíduo.....28

Figura 14. Montagem experimental para medida do campo magnético por MRI. (a) fantoma de acrílico preenchido com solução de sulfato de cobre; (b) fantoma de cabeça preenchida com a mesma solução; (c) fantoma de cabeça vestindo capacete com uma bobina em forma de 8, 10x20cm^2, semelhante a da Neurosoft; (d) vista lateral do fantoma com o capacete.....40

Figura 15. Bobina em forma de 8 da marca Neurosoft com dimensões de 10x20 cm^2, utilizada nos experimentos de mapeamento de campo magnético. (a) Fotografia da bobina (b) Radiografia da bobina, mostrando seus enrolamentos. 41

Figura 16. Esquema das medidas de campo magnético produzido pelas bobinas de TMS em função da, sendo R o raio da bobina e x o eixo no qual foi posicionada a sonda do *fluxgate*.....43

Figura 17. Esquema da posição da origem dos sistemas de rastreio e da imagem. (a) O ponto em vermelho representa a origem do sistema do rastreador espacial; (b) as setas em vermelho representam os versores do sistema de coordenadas das imagens MPR. 45

Figura 18. Esquema do sistema de coordenadas em relação ao crânio (setas), e dos 3 pontos fiduciais utilizados para o corregistro (pontos em verde), *tragus auriculare*s direito, esquerdo e depressão do osso nasal.....46

Figura 19. Esquema de corregistro das posições obtidas com o rastreador e as imagens de ressonância, sendo E, H e F as bases respectivas do rastreador, do crânio e das imagens; M1 e M2 são respectivamente as matrizes de mudança de base entre E e H e entre H e F; $M1^{-1}$ e $M2^{-1}$ são as matrizes inversas de M1 e M2.....46

Figura 20. Fotografia de um voluntário usando a toca com a grade para posicionamento da bobina e com a sonda do rastreador espacial fixa na cabeça para realizar a neuronavegação. O ponto em vermelho na lateral da cabeça representa a posição do *hot spot*.....55

Figura 21. Posicionamento dos eletrodos de estimulação (retangulares e brancos) sobre o antebraço direito. Os eletrodos circulares pretos referem-se aos de EMG, e estão posicionados no ventre dos músculos abdutor curto do polegar e flexor radial do carpo. 60

Figura 22. Ajuste trapezoidal (em vermelho) de uma evolução temporal média. O modelo inclui a linha de base até o início da resposta, um platô, e um retorno à linha de base. Quatro variáveis são fornecidas: tempo até o início da resposta, tempo ao pico, largura à meia altura e amplitude. 62

Figura 23. Os esquemas da primeira coluna representam os posicionamentos da bobina de TMS em relação ao campo estático da ressonância (B_z), sendo B_b as componentes do campo da bobina de TMS paralelos ao B_z. Ao centro, imagens de fase empacotadas representativas do campo magnético produzido por uma bobina de TMS em forma de oito, e os respectivos mapas de campo (direita). O FOV das imagens é de 110x200mm^2. 66

Figura 24 Mapa do vetor campo magnético relativo à bobina em forma de oito de uma superfície paralela à face da bobina distante aproximadamente 2 cm. A escala é dada em centímetros.....66

Figura 25. Mapa volumétrico de magnitude do campo magnético produzido pela bobina em forma de 8. O esquema à direita representa como foram feita as aquisições das imagens de MRI. 67

Figura 26. (a) Imagens da fase empacotadas dentro do fantoma de cabeça preenchido com solução de $CuSO_4$ (b) e no cérebro do voluntário submetidos a um campo magnético produzido por uma bobina em forma de 8 posicionada no vértice craniano (VC). O FOV das imagens é de 256x256mm^2..... 67

Figura 27. Comparação dos mapas de distribuição espacial da bobina de TMS em forma de 8, de 10x20cm^2, da marca Neurosoft, pelas técnicas de MRI de fase e indutor de varredura. (a) Curvas de nível da distribuição da componente z do pulso de campo magnético produzido pelo aparelho de TMS medido com indutor, a escala de cores é referente à intensidade do campo e é dada em Teslas (T). (b) Representação tridimensional da distribuição da componente z do pulso de campo magnético produzido pelo aparelho de TMS medido com indutor, a escala de cores é referente à intensidade do campo e é dada em Teslas (T). (c) Imagens de fase da distribuição da componente z do campo magnético produzido por uma corrente dc de 1.12A. (d) Representação tridimensional da distribuição do campo magnético produzido por uma corrente dc de 1.12A e medidos com MRI de fase..... 69

Figura 28. Novas conformações de bobinas e suas respectivas distribuições da componente de campo magnético perpendicular ao plano da superfície. 70

Figura 29. (a) Experimento de aplicação de TMS em ratos utilizando a bobina cônica de humanos (b) e a bobina de pequenos animais 8 simples. (c) Imagem mostra o posicionamento dos eletrodos M1 e M2, na pata traseira, e a referencia R, sobre uma vertebra da coluna dorsal. (d) Sinal de EMG adquirido utilizando a bobina cônica do aparelho MagPro, o quadrado verde no sinal destaca o artefato devido ao pulso de TMS e o quadrado em vermelho destaca o MEP..... 72

Figura 30. Estimulação do nervo braquial utilizando uma bobina 8 simples. O sinal representa o MEP devido à estimulação magnética. O artefato presente é devido ao pulso magnético de grande intensidade, e o ruído é devido à constante carga do capacitor, que o aparelho da Neurosoft necessita para que esteja pronto para o disparo. 74

Figura 31. a) Bobinas 8 simples enroladas com fio de cobre e caixa para circulação de óleo. b) Bobinas enroladas com tubo de cobre. À esquerda, apenas a bobina, e à direita, a bobina acoplada ao Estimulador e ao sistema de arrefecimento. 75

Figura 32. Tela do InVesalius com a aba de neuronavegação, o centro das cruzes vermelhas, que corresponde ao ponto vermelho na imagem de reconstrução volumétrica, indicam a posição relativa à sonda do rastreador espacial que se encontra sobre a cabeça do voluntário..... 76

Figura 33. Tela do Neuronavegador InVesalius na aba de criação de marcadores. Nesse exemplo os pontos em azul e verde são as posições que receberam a TMS no mapeamento de córtex motor. 77

Figura 34. Nuvem de pontos coletados com neuronavegador ao redor da cabeça de uma pessoal, e sua posterior sobreposição na reconstrução volumétrica da MRI estrutural. 78

Figura 35. Exemplo de erro de corregistro da nuvem de pontos com a respectiva MRI. 78

Figura 36. Tela do InVesalius na aba de neuronavegação, carregado com o sistema de coordenadas virtual, e fotografias do sistema de coordenadas correspondentes. 79

Figura 37. Tela inicial do programa MEPHunter como o menu flutuante dos tipos de arquivos de EMG que podem ser lidos. 80

Figura 38. Tela da interface de pré-processamento do MEPHunter. No detalhe, a elipse em vermelho mostra a supressão indevida de um MEP durante o pré-processamento. 81

Figura 39. Exemplo de pré-processamento de um sinal de EMG. (a) Sinal bruto do EMG. (b) zoom in no segundo MEP. Nessa figura é possível notar que a amplitude do ruído é da mesma ordem da amplitude do MEP. (c) Colocação de marcadores pare evitar a eliminação desse trecho do sinal. (d) Sinal pré-processado sem a eliminação do segundo MEP como ocorreu no exemplo da Figura 38. 82

Figura 40. (a) Tela da Interface de processamento do MEPHunter, nesse exemplo podemos ver os botões relativos as ferramentas de correlação cruzada, sendo que na tela maior temos todo o sinal do EMG, e na tela pequena, temos a preditora para ser realizar a correlação. (b) Tela de seleção de MEP. (c) Tela de visualização dos sinais de MEP de projetos salvos. (d) Tela de exportação para o formato ASCII. 83

Figura 41. Interface para múltiplas análises do MEPHunter. Nesse exemplo temos um estudo de mapeamento do córtex motor com 25 regiões estimuladas, dando origem a um mapa 5x5cm2 85

Figura 42. Interface de análise múltipla mostrando a seleção automática dos artefatos. Os pontos em vermelho indicam o valor de máximo do artefato e as linhas em verde marcam a posição do trigger. 86

Figura 43. Tela da interface de análises múltiplas mostrando a janela de seleção manual do trigger. 87

Figura 44. Tela da interface de análises múltiplas mostrando a sobreposição das faixas de 60 a 80 ms após a aplicação do pulso de TMS.....88

Figura 45. Promediação dos sinais de cada janela da Figura 44, com marcações de máximo é mínimo do MEP cruz vermelha), bem como o seu início e o fim (triângulos verde e vermelho). 89

Figura 46. Tela da interface de análises múltiplas mostrando a janela de seleção manual dos valores de mínimo e máximo do MEP, bem como o seu início e fim. b) Mapa de cores relativos aos valores de pico a pico dos MEPs mostrados em a).....90

Figura 47. Tela da interface do TMSProjection. A interface conta um eixo de visualização tridimensional, onde são exibidos os volumes de MRI e nuvem de pontos, e com 4 painéis (Abrir, Operações, Projeção, Imagem). O painel Abrir apresenta cinco caixas de edição de texto para os caminhos dos arquivos que serão abertos. No painel Operações ficam os botões com as ferramentas principais do TMSProjection. No painel Projeção, podemos observar o Mapa de TMS e a projeção das posições que receberam a TMS nas fMRI. O painel Imagem apresenta as ferramentas gráficas, como reorientação, espelhamento, transparência, entre outras. Nesse exemplo chamamos a atenção para o desalinhamento dos volumes de ressonância funcional e estrutural, bem como a nuvem de pontos. 91

Figura 48. Tela da interface do TMSProjection com os volumes de MRI e nuvem de pontos alinhadas. 92

Figura 49. Tela da interface do TMSProjection mostrando a projeção dos pontos obtidos pelo neuronavegador de um mapeamento motor de TMS, sobre as imagens funcionais. O resultado da projeção é o mapa que se encontra no canto inferior esquerdo da figura. Na representação tridimensional os pontos em preto representam as posições que receberam a TMS; as linhas em rosa representam a direção da projeção das posições que receberam a TMS ao centro de massa do volume da fMRI; e os círculos em preto são as regiões projetadas no volume da fMRI. 93

Figura 50. Mapas de fMRI em representação planar, nos cortes Sagital, Coronal e Axial. Os mapas de cores representam os valores obtidos do GLM para a tarefa de abrir e fechar a mão. (a) fMRI de um sujeito controle. (b) fMRI de um paciente com AVC. ... 95

Figura 51. Resultados das análises dos mapas de fMRI em resposta a movimentação da mão parética e sadia de pacientes com AVC crônico e indivíduos saudáveis. (a) Entropia da projeção 5x5 pixels; (b) Entropia da projeção 50x50 pixels; (c) Máximo valor de β; (d) Número de voxels acima do limiar. pPS representa o p valor da comparação entre o grupo de pacientes mão parética e pacientes mão sadia; pPC representa o p valor da comparação entre o grupo de pacientes mão parética e sujeitos controle; pSC representa o p valor da comparação entre o grupo de pacientes mão sadia e sujeitos controle. 96

Figura 52. Resultados das análises dos mapas de MEP da mão parética e sadia de pacientes com AVC crônico e indivíduos saudáveis. (a) Entropia do mapa de 5x5 pixels; (b) Número de células que obtiveram MEP acima de 50μV. pPS representa o p valor da comparação entre o grupo de pacientes mão parética e pacientes mão sadia; pPC representa o p valor da comparação entre o grupo de pacientes mão parética e sujeitos controle; pSC representa o p valor da comparação entre o grupo de pacientes mão sadia e sujeitos controle. 98

Figura 53. Resultados das comparações entre os mapas de fMRI e TMS. (a) Correlação cruzada bidimensional; (b) Distância euclidiana entre as posições do máximo de β e de máximo valor de MEP; (c) Intersecção tipo "AND", que considera as coincidências de valores não nulos. pPS representa o p valor da comparação entre o grupo de pacientes mão parética e pacientes mão sadia; pPC representa o p valor da comparação entre o grupo de pacientes mão parética e sujeitos controle; pSC representa o p valor da comparação entre o grupo de pacientes mão sadia e sujeitos controle. 100

Figura 54. Diferença de amplitude dos MEPs antes e após a SES. (a) Resultados para os pacientes com AVC crônico; (b) Resultados para os indivíduos saudáveis. pF representa o p valor do teste de verificação se os resultados para o músculo flexor radial do carpo são estatisticamente diferentes de zero; pE para o músculo extensor radial do carpo; pA para o abdutor curto do polegar e pA' para o Abdutor curto do polegar contralateral a SES..... 103

Figura 55. Resultados das análises das latências do MEP antes da aplicação da SES. (a) Resultados para os pacientes com AVC crônico; (b) Resultados para os indivíduos controle; (c) Mediana dos valores de latência de todos os músculos, confrontando os valores dos pacientes com os dos controles. pF representa o p valor do teste de verificação se os resultados para o músculo flexor radial do carpo são estatisticamente diferentes de zero; pE para o músculo extensor radial do carpo; pA para o abdutor curto do polegar e pA' para o Abdutor curto do polegar contralateral a SES. 106

Figura 56. Diferença das latências do MEP antes e após a SES. (a) Resultados para os pacientes com AVC crônico; (b) Resultados para os indivíduos controle. pF representa o p valor do teste de verificação se os resultados para o músculo flexor radial do carpo são estatisticamente diferentes de zero; pE para o músculo extensor radial do carpo; pA para o abdutor curto do polegar e pA' para o Abdutor curto do polegar contralateral a SES. 107

Figura 57. Mapas de fMRI em representação volumétrica da superfície cortical (cinza claro) com exposição dos sulcos (cinza escuro). Os mapas de cores representam a diferença entre a os valores obtidos do GLM para a tarefa motora antes e após a SES. 109

Figura 58. Mapas de fMRI em representação volumétrica da superfície cortical (cinza claro) com exposição dos sulcos (cinza escuro). Os mapas de cores representam a diferença entre a os valores obtidos do GLM para a tarefa motora do braço ipsilateral a SES e braço contralateral a SES. 112

Figura 59. Resultados do algoritmo BLM nas análises da área de Brodmann 4, antes e após a aplicação da SES em indivíduos controle. (a) Onset, tempo do início da tarefa até iniciar a resposta hemodonâmica; (b) Tempo ao pico, tempo entre o início do sinal até o máximo por ele atingido; (c) Largura a meia altura da resposta hemodinâmica; (d) Amplitude do sinal da resposta hemodinâmica. Sendo pCI, pCC', pII' e pC'I' o p valor dos teste estatísticos para a comparação entre duas condições. 115

Figura 60. Resultados do algoritmo BLM nas análises da área de Brodmann 6, antes e após a aplicação da SES em indivíduos controle. (a) Onset, tempo do início da tarefa até iniciar a resposta hemodonâmica; (b) Tempo ao pico, tempo entre o início do sinal até o máximo por ele atingido; (c) Largura a meia altura da resposta hemodinâmica; (d) Amplitude do sinal da resposta hemodinâmica. Sendo pCI, pCC', pII' e pC'I' o p valor dos teste estatísticos para a comparação entre duas condições. 116

Resumo

Objetivos – A estimulação magnética transcraniana (TMS, do inglês: Transcranial Magnetic Stimulation) e as imagens funcionais por ressonância magnética (fMRI, do inglês: functinal Magnetic Resonance Imaging) são duas técnicas não invasivas de investigação de atividade do sistema nervoso central. Porém essas duas técnicas utilizam estratégias diferentes para mensurar a atividade cerebral, sendo que a TMS avalia a resposta elétrica enquanto que a fMRI a resposta hemodinâmica. Nosso intuito nesse trabalho foi criar ferramentas para a comparação dessas duas técnicas no mapeamento do córtex motor, bem como utilizando as ferramentas desenvolvidas, fazer uma comparação dos mapas motores de pacientes com AVC e realizar uma avaliação nos efeitos no córtex motor da eletroestimulação sensorial (SES, do inglês: Sensory Electric Stimulation) pelas técnicas de TMS e fMRI.

Métodos – Paro o mapeamento vetorial do campo magnético produzido pela bobina de TMS utilizamos fantomas que simulavam o tecido cerebral e realizamos medidas de imagens de ressonância magnética (MRI, do ingês: Magnetic Resonance Imaging) de fase em três direções para a construção do mapa vetorial. Uma vez dominada a técnica de mapeamento por imagens de fase, a utilizamos para auxiliar na construção de bobinas para estimulação periférica e pequenos animais. Para realização do mapeamento do córtex motor com TMS desenvolvemos um sistema de neuronavegação (Neuronavegador InVesalius) e um programa para análise dos sinais de eletromiografia (MEPHunter), bem como um segundo programa para fazer o corregistro dos mapas de produzidos pela TMS com os mapas de fMRI (TMSProjection). Em posse dessas ferramentas, pudemos realizar o mapeamento do córtex motor de pacientes com AVCi crônicos. Para tanto estimulamos uma área quadrada de $25cm^2$ do escalpo sobre o córtex motor e coletamos o potencial evocado nos músculos abdutor curto do polegar ipsi e contralateral à TMS, e nos músculos flexor e extensor radial do carpo, contralaterais à TMS. Para a realização das fMRIs realizamos um paradigma evento-relacionada com um protocolo de abrir e fechar a mão. Por fim avaliamos os efeitos da SES à 3Hz com um única sessão de 30 minutos, realizando medidas de potencial evocado e fMRI imediatamente antes e imediatamente após à SES.

Resultados – O sistema de neuronavegação juntamente com o conjunto de programas computacionais possibilitou a realização dos estudos clínicos. Nossos dados mostraram uma correlação maior entre os mapas de MEP e os mapas de fMRI nos sujeitos normais do que nos pacientes com AVC, principalmente no hemisfério afetado. Nossos resultados também sugerem que a SES pode provocar modulação na excitabilidade cortical, causando redução da excitabilidade cortical das regiões motoras, quando aplicados na frequência e duração utilizadas nesse estudo.

Conclusão – O mapeamento de campo magnético por MRI é uma boa alternativa para medir campos complexos e pode ser utilizado no desenvolvimento de novas bobinas de estimulação magética. O neuronavegador Invesalius, o MEPHunter e o TMSProjection são ferramentas poderosas para estudos em neuroimagens podendo ser ampliado seu uso para outras áreas como neurologia e fidioterapia. Quanto aos estudos clínicos acreditamos que o fator que mais colabora para a pior correlação dos mapas dos pacientes é a redução de fibras corticoespinhais e a plasticidade, e que a SES aplicada à 3Hz em uma única sessão tem um efeito agudo de redução da excitabilidade do córtex motor.

Palavras Chave: TMS, fMRI, Neuronavegãção, AVC e SES.

Considerações Iniciais

A Estimulação Magnética Transcraniana (em inglês *Transcranial Magnetic Stimulation – TMS*) é uma técnica recente que está fundamentada em observações antigas (~2750 a.C.) pelos egípcios quando é descrita a ação da eletricidade sobre o corpo humano pelo uso de uma espécie de peixe elétrico. Já no século I d.C. há relatos do uso do peixe torpedo (um tipo de peixe elétrico) pela medicina romana. Claudius Galenus, médico renomado do século II d.C., prescrevia o uso do peixe torpedo como terapia para tratamento de enxaqueca, colocando a cabeça do paciente em contato direto com o peixe vivo. Embora na época não fosse claro o mecanismo de ação da terapia, há relatos do seu efeito anestésico.

Em meados do século XVIII o médico e físico Luigi Galvani observou pela primeira vez a relação entre a eletricidade e a contração muscular. A versão popular dessa história é que Galvani conduzia experimentos de eletricidade estática atritando pele de sapo, quando seu assistente acidentalmente tocou o nervo ciático de uma pata traseira dissecada do sapo, com um bisturi que estava eletricamente carregado, e a pata se contraiu. Com a observação de Galvani, concluiu-se que a eletricidade causava efeitos nos tecidos nervoso e muscular, e uma vez que era sabido que a variação do campo magnético leva ao aparecimento de campos elétricos, ficou clara a possibilidade de estimulação de tecidos biológicos por campos magnéticos oscilantes.

Nessa linha de raciocínio, Arsene D'ansorval, médico e físico francês, conduziu vários experimentos no final do século XIX com o propósito de estimular o cérebro de maneira não invasiva utilizando campos magnéticos oscilantes. Entretanto, ele e outros pesquisadores da época, como Silvanus Thompson, não conseguiram realizar o feito por limitações tecnológicas. O equipamento desenvolvido por D'ansorval produzia correntes da ordem de 30 Ampères (A) com frequência de aproximadamente 40 Hz, de modo que o campo elétrico induzido era muito pequeno para causar efeito de estimulação no cérebro.

Só em 1985 um grupo da Universidade de Sheffield, liderado por Anthony Barker, conseguiu estimular o cérebro utilizando pulsos magnéticos de alta intensidade (ordem de 1 Tesla) com grande variação temporal (microsegundos). Como essa técnica não é invasiva e o campo magnético atravessa o crânio para agir no cérebro, foi chamada de Estimulação Magnética Transcraniana (Barker e Jalinous, 1985). Desde então ela vem ganhando espaço no cenário de pesquisa e de aplicações clínicas, tanto com ferramenta de investigação quanto como opção de tratamento. É possível ilustrar esse aumento de interesse pela TMS na figura abaixo, que contém o número de artigos científicos que fizeram uso da TMS a partir do ano de 1985 (ISI Web of Knowledge).

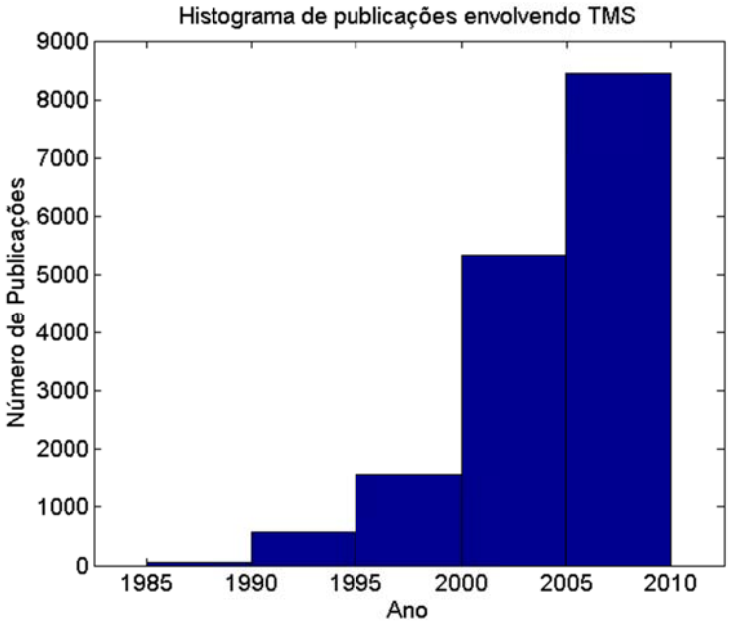


Figura 1. Número de publicações que fizeram uso da TMS de 1985 a 2010. Essas informações foram obtidas fazendo uma busca usando as palavras chave "Transcranial Magnetic Stimulation" no site ISI Web of Knowledge.

Outra técnica para o estudo não-invasivo do funcionamento cerebral é a Ressonância Magnética Funcional (fMRI, do inglês: *functional Magnetic Resonance Imaging*). Essa modalidade de imagem leva em conta a variação da resposta hemodinâmica de regiões cerebrais que se engajaram em determinada tarefa (Huettel, Song *et al.*, 2004).

Conhecidas as vantagens e as limitações de cada uma dessas técnicas, tem-se procurado utilizá-las de forma complementar (Hallett, 2000). Por exemplo, apesar da fMRI ter uma boa resolução espacial, da ordem de milímetros, a resolução temporal, no entanto, é pobre, da ordem de segundos. De forma oposta, os Potenciais Evocados Motores (MEP, do inglês: *Motor Evoked Potential*) gerados a partir da TMS, apresentam baixa resolução espacial, da ordem de centímetros, e boa resolução temporal, da ordem de milissegundos. Pelo uso de técnicas multimodais é possível, por exemplo, estudar diferentes aspectos do sistema motor tendo como base a observação da sua resposta hemodinâmica através da técnica de fMRI, e de sua excitabilidade por medidas dos MEP.

Considerando o trabalho com técnicas multimodais, uma etapa importante é o co-registro espacial da informação proveniente de cada uma delas. Assim, quando determinada região é observada por uma das técnicas é importante determinar a medida correspondente dessa mesma região obtidas pela outra técnica. Nesse sentido, no contexto de estudos multimodais envolvendo TMS, uma ferramenta de grande importância é o neuronavegador. De maneira simplificada, o neuronavegador localiza a posição da cabeça do indivíduo em relação à sua respectiva neuroimagem. Desse modo, ao se posicionar um instrumento sobre o escalpo, por exemplo, uma bobina de TMS, é possível determinar de forma mais precisa quais estruturas cerebrais serão estimuladas (Julkunen, Saisanen *et al.*, 2009).

Para este trabalho cabe destaque o estudo do córtex motor de pacientes que sofreram Acidente Vascular Cerebral (AVC). Nesses pacientes espera-se que a resposta hemodinâmica cerebral esteja alterada em virtude da lesão. Por outro lado, não se espera alteração elétrica significativa do tecido nervoso. Além disso, é possível avaliar os efeitos fisiológicos causados por técnicas de intervenção como, por exemplo, a eletroestimulação a Eletroestimulação Sensorial (em inglês Sensorial Electrical Stimulation - SES) periférica para reabilitação desses pacientes.

Nesse sentido, o intuito desse trabalho foi criar ferramentas para a comparação das técnicas de TMS e fMRI no mapeamento do córtex motor, bem como utilizar as ferramentas desenvolvidas para comparar os mapas motores de pacientes com AVC e realizar uma avaliação dos efeitos no córtex motor da eletroestimulação sensorial (SES, do inglês: Sensory Electric Stimulation) pelas técnicas de TMS e fMRI.

A tese está dividida em cinco capítulos: Introdução; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão; Etapas Futuras. Optamos por escrever mais duas sessões, Considerações Iniciais e Considerações Finais para complementar os capítulos principais.

Outro detalhe que pode ser notado nessa tese é que ela é composta de duas frentes de trabalho bem distintas, que entretanto, convergem no final do trabalho. A primeira frente é composta pelos trabalhos de instrumentação e desenvolvimento de softwares, que foram necessários para a realização da segunda frente, que foi a realização de estudos de TMS e fMRI em pacientes que sofreram AVC. Devido a diversidade dos trabalhos que compõe essa tese, nós optamos por apresentar cada resultado com sua respectiva discussão dentro de um mesmo subcapítulo.

A divisão dos subcapítulos foi a seguinte: A primeira frente foi caracterizações físicas e desenvolvimento de softwares. Essa sessão foi então subdividida em outras cinco: Mapeamento vetorial do campo magnético produzido pela bobina plana em forma de 8; Desenvolvimento de novas arquiteturas de bobinas para TMS; Implementação do Neuronavegador; Implementação da ferramenta de análise de MEP (MEPHunter); Implementação da ferramenta de corregistro dos mapas de MEP e fMRI (TMSProjection).

O mapeamento de campo magnético parece não responder diretamente a pergunta principal do trabalho, porém consequências deles implicam em uma melhor comparação das técnicas de TMS e fMRI, pois conhecendo a distribuição campo magnético das bobinas de TMS, e com o auxilio do neuronavegador, podemos conhecer com qual intensidade as regiões

cerebrais estão sendo estimuladas. Com isso será possível ponderar no cálculo a contribuição de todas as estruturas estimuladas, diferente do mapeamento realizado hoje, que leva em conta apenas a região estimulada com o máximo campo, possuindo dimensões arbitrárias. Como um dos objetivos do nosso grupo que é a criação de ferramentas e protocolos que pudessem trazer melhorias para a técnica de TMS, nós aproveitamos os protocolos desenvolvidos para caracterizar o campo magnético da bobina em forma de 8 para criar novas geometrias de bobinas de TMS, dando ênfase na criação de bobinas pequenas, que ainda hoje é uma limitação dos equipamentos comerciais.

Por outro lado, o desenvolvimento do sistema de neuronavegação é uma continuação do projeto de mestrado "Implementação de um sistema de localização espacial de regiões cerebrais em tempo real para aplicação de TMS por co-registro com fMRI" desenvolvido em nosso laboratório nos anos de 2006 a 2008, e se justifica devido o alto custo de sistemas de neuronavegação comerciais, e a rigidez das plataformas oferecidas. Dessa forma, a continuação desse projeto se tornou imprescindível para a realização das etapas seguintes, nos estudos em pacientes com AVC.

Já a criação do MEPHunter (ferramenta de análise de MEP para mapeamento) se deve a carência de softwares gratuitos para a criação de mapas de MEP por TMS, diferente da análise das fMRIs que contam com diversos pacotes como o SPM e FSL. A criação de mapas de MEP sem uma ferramenta específica é uma tarefa muito dispendiosa, pois o usuário deve encontrar os MEPs um a um para cada posição a qual foi aplicada a TMS. Assim se usarmos como exemplo uma aplicação com 25 pontos de estimulação, sendo aplicado 10 pulsos em cada posição, então para cada mapa o usuário teria que avaliar 250 MEPs. Se o estudo tiver aplicação bilateral com um espaço amostral de 10 voluntários, então o experimentador teria que analisar no total 5000 MEPs. Já o MEPHunter por ser uma ferramenta semiassistida, essa tarefa se torna menos dispendiosa, possibilitando o usuário analisar as diversas posições

simultaneamente. Para corregistrar as informações das fMRIs, do Neuronavegador e do MEPHunter foi criada o TMSProjection, pois nenhum outro programa comercial faria essa sobreposição de dados de forma trivial.

A segunda frente foi “Aplicação em pacientes com AVC”. Essa sessão foi subdividida em outras 3: Estudos dos mapas motores por fMRI e TMS; Avaliação dos efeitos da SES por TMS; Avaliação dos efeitos da SES por fMRI.

Na sessão “Estudos dos mapas motores por fMRI e TMS”, nós procuramos por diferenças entre os pacientes e os controles tanto nos mapas de fMRI quanto nos mapas de MEP. Depois fizemos uma comparação entre os mapas de TMS e fMRI dos pacientes e dos controle. Na sessão “Avaliação dos efeitos da SES por TMS”, nós avaliamos alterações no tempo de latência e na amplitude do MEP antes e após a SES nos pacientes com AVC e nos controles, e na sessão “Avaliação dos efeitos da SES por fMRI” nós avaliamos o tempo de onset, tempo ao pico, largura a meia altura e amplitude do sinal BOLD apenas para os voluntários assintomáticos.

Na tese nós optamos por não traduzir acrônimos consagrados na literatura, como por exemplo, fMRI, TMS e MEP. Entretanto, o significado de cada acrônimo foi traduzido na sua primeira ocorrência no texto.

Introdução

2.1 Estimulação Magnética Transcraniana

A TMS é uma técnica de estimulação cerebral não invasiva que utiliza pulsos magnéticos rápidos (aproximadamente 300 μs de duração) e de alta intensidade de campo magnético (em torno de 2 Teslas) para despolarizar regiões do córtex cerebral (Barker, Jalinous *et al.*, 1985). Para gerar esses pulsos magnéticos o equipamento de TMS é constituído por um circuito relativamente simples, composto por um capacitor, uma chave e a bobina de estimulação. A dificuldade tecnológica está relacionada aos valores nominais das grandezas físicas envolvidas, no caso variações altíssimas de intensidade de corrente em curto período de tempo.

A necessidade dessa variação pode ser compreendida pela lei de Faraday, de acordo com a qual a intensidade do campo elétrico induzido é diretamente proporcional à variação do campo magnético aplicado.

Como a despolarização dos neurônios é causada pelos campos elétricos induzidos, e as dimensões das bobinas são geralmente bem maiores que as regiões a serem estimuladas, procura-se por geometrias capazes de otimizar a focalização do campo elétrico (Thielscher e Kammer, 2004). Para esse propósito, a configuração mais comum tem a forma de oito (em inglês *Butterfly coils*), composta por duas bobinas planas em espiral que carregam a mesma corrente, porém orientadas em sentidos opostos. A Figura 2 mostra uma imagem de raios-X de uma bobina em forma de 8.

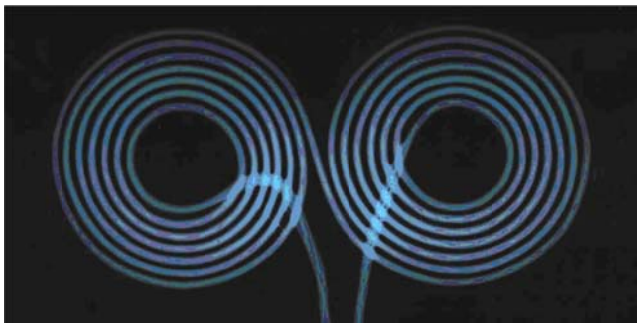


Figura 2. Imagem de raios-X de uma bobina em forma de 8 mostrando a orientação do enrolamento feito de fio de cobre.

Com o avanço da técnica, novas conformações de bobinas estão sendo propostas, não apenas com o intuito de estimular regiões mais profundas do cérebro (Levkovitz, Roth *et al.*, 2007), mas também para promover a estimulação otimizada de outras regiões, como, por exemplo, a espinha dorsal e os nervos periféricos, ou para estudos em pequenos animais (Wendicke, Weyh *et al.*; Bischoff, Riescher *et al.*, 1995; Matsumoto, Octaviana *et al.*, 2009; Tischler, Wolfus *et al.*, 2011).

Além das geometrias das bobinas, outra característica física importante da TMS é a maneira com a qual os pulsos são aplicados. Atualmente podemos dizer que existem três tipos de estimulação (Fig. 3) (Hallett, 2007; Rossi, Hallett *et al.*, 2009): a estimulação de pulso único (pTMS), na qual apenas um pulso magnético é aplicado sobre o escalpo do indivíduo; a estimulação por pulso pareado (ppTMS), que consiste da aplicação de dois pulsos consecutivos com intervalo de poucos milissegundos; e a estimulação repetitiva (rTMS), na qual são aplicados diversos pulsos em uma dada região com frequência que em geral varia de 1Hz a 50Hz.

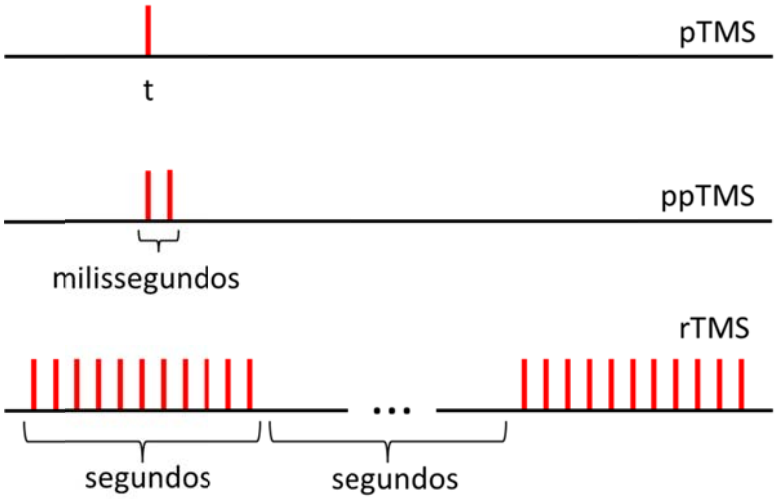


Figura 3. Esquema representativo das principais formas de aplicação dos pulsos magnéticos pelo TMS. As linhas em vermelho representam o evento do disparo. pTMS - estimulação de pulso único; ppTMS - a estimulação por pulso pareado; rTMS – estimulação repetitiva.

Cada uma dessas modalidades tem características bem definidas. A ppTMS é capaz de promover fenômeno conhecido por facilitação ou inibição intracortical, pelo aumento ou diminuição da resposta elétrica de determinada rede quando a latência entre os pulsos é alterada (Rossi, Hallett *et al.*, 2009). Nessa técnica é necessário o registro da atividade miográfica pelo uso da eletromiografia (EMG) para a observação do fenômeno. Já a rTMS visa realizar intervenção em redes corticais específicas com a finalidade de provocar efeito duradouro. Nessa técnica vários pulsos são aplicados em uma mesma posição com frequências bem específicas, podendo ou não serem intercaladas por um período de silêncio. Com isso, efeitos modulatórios podem tornar aquela região mais ou menos excitável (Rossi, Hallett *et al.*, 2009). Tendo em vista que a pTMS será utilizada neste trabalho, ela será descrita em mais detalhes a seguir.

2.1.1 pTMS

A TMS de pulso único (pTMS) é a mais simples e a mais utilizada tanto na rotina clínica como no cenário de pesquisa em neurociências. Ela está fortemente associada à avaliação do córtex motor. Quando uma região cortical motora é estimulada por um pulso de TMS, neurônios são excitados de modo que a atividade elétrica segue pelo trato corticoespinal estimulando motoneurônios espinais e as fibras musculares por eles inervadas. O Potencial Evocado Motor (MEP, do inglês: *Motor Evoked Potential*) associado pode ser medido com eletrodos posicionados sobre o músculo que sofre a ação da estimulação (Guggisberg, Dubach *et al.*, 2001).

Espera-se que quanto mais intenso for o estímulo aplicado, maior será a resposta das fibras musculares, bem como quanto mais correlata for a região cerebral do músculo que está sendo medido, mais intenso será o MEP (Thickbroom, Sammut *et al.*, 1998).

Os exames de TMS tem grande variação interespecífica, pois existem diferenças anatômicas significativas entre os indivíduos. Por exemplo, mulheres geralmente tem a calota craniana mais estreita, porém geralmente tem mais cabelo. Essas variações fazem com que a intensidade do campo magnético que chega ao córtex varie. Além disso, existem variações na anatomia cortical, de modo que não é possível conhecer exatamente quais estruturas se encontrar sob uma determinada região do escalpo utilizando apenas marcas anatômicas.

Devido a essas variações, as medidas de TMS devem ser sempre ponderadas com relação a parâmetros individuais. Nesse cenário, dois conceitos são muito importantes: o *hot spot* (que significa ponto quente) e o limiar motor. O *hot spot* é a região sobre o escalpo que produzirá o maior valor de MEP quando estimulada pela TMS. Já o limiar motor pode ser entendido como a amplitude mínima do pulso de TMS necessária para causar um MEP quando o *hot spot* é estimulado.

Na prática existem alguns protocolos para se definir o limiar motor, sendo que o mais difundido é evidenciar MEPs com no mínimo 50µV, em 50% das tentativas (Rossini, Barker *et al.*, 1994; Conforto, A., Z'graggen, W. *et al.*, 2004; Vargas, Olivier *et al.*, 2004).

Geralmente os sinais de EMG obtidos em um estudo de TMS são contínuos, com duração da ordem de minutos. Esse sinal é composto pelo MEP, artefato de TMS e ruído. O MEP é o sinal biológico de interesse, o artefato de TMS aparece devido ao pulso aplicado. A figura 3 mostra o recorte de um sinal de EMG, contendo o artefato de TMS seguido do MEP.

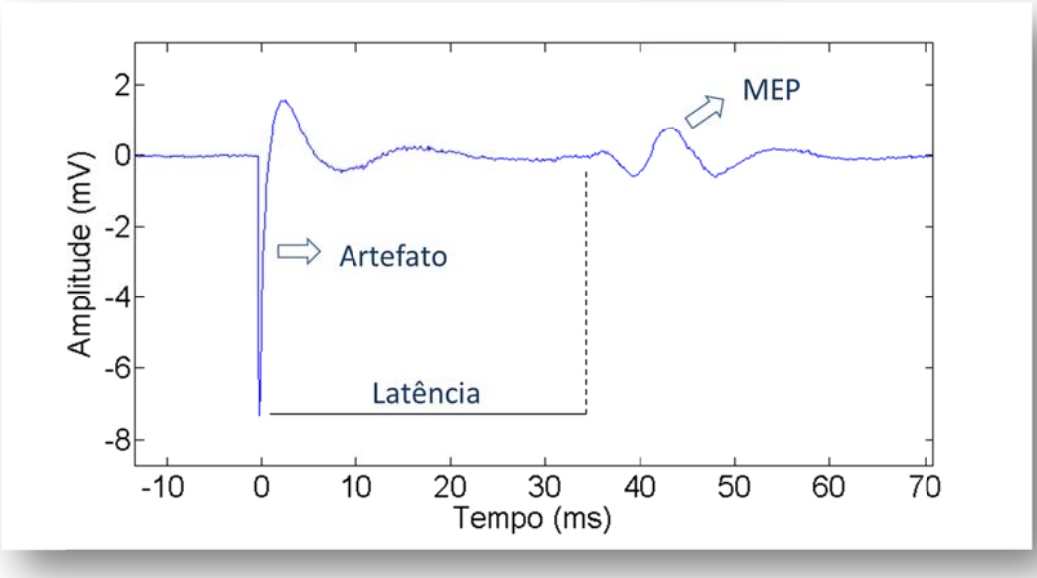


Figura 4. Sinal de MEP característico. No detalhe é possível observar o artefato de TMS seguido pelo MEP.

A pTMS oferece informações fisiológicas importantes sobre o sistema motor, baseado, em especial, na amplitude e latência do MEP (instante de início do MEP após a estimulação), detectados a partir do sinal médio obtido pela aplicação de vários estímulos a um mesmo ponto no escalpo. Cabe aqui ressaltar que a amplitude dos MEP geralmente apresenta uma grande variação entre estímulos de TMS, sobre o mesmo ponto do escalpo (Fig. 4).

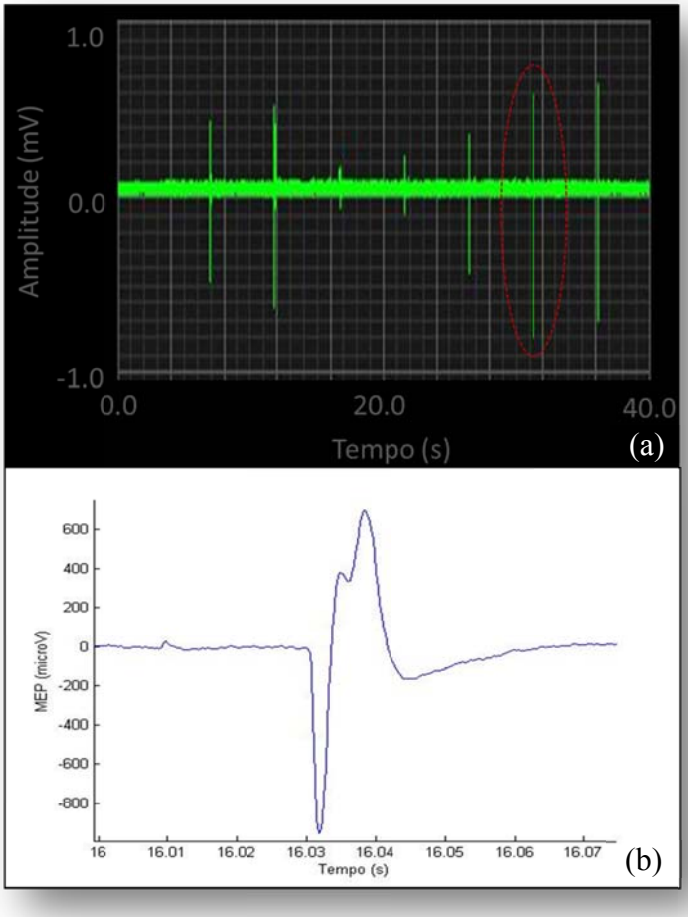


Figura 5. Exemplo de uma aquisição contínua do sinal de EMG em um exame de TMS. É interessante observar a variação de amplitude dos MEP durante a aquisição. (b) MEP característico, da região circulada em vermelho da parte (a) da figura acima.

Baseado nessas duas variáveis (amplitude e latência), alguns protocolos podem ser propostos para responder a perguntas biológicas. Dois protocolos comumente utilizados, sendo o primeiro deles a aplicação de pTMS antes e após determinada intervenção, com a

intenção de avaliar se essa intervenção causou alguma alteração na excitabilidade das redes envolvidas na atividade motora. Como exemplo, podemos citar a realização de uma atividade física ou exercício de imagética (Altschuler, Wisdom *et al.*, 1999; Vargas, Olivier *et al.*, 2004; Fukumura, Sugawara *et al.*, 2007; Funase, Tabira *et al.*, 2007); terapias como a eletroestimulação periférica (Conforto, Cohen *et al.*, 2007; Conforto, Ferreiro *et al.*, 2010; Chipchase, Schabrun *et al.*, 2011); ou ainda a administração de uma droga (Ziemann, 2004). O outro protocolo é o de mapeamento cortical de áreas motoras, que relaciona a amplitude do MEP em um determinado músculo com a sua representação no córtex estimulado (Brasil-Neto, Mcshane *et al.*, 1992; Wilson, Thickbroom *et al.*, 1993; Mortifee, Stewart *et al.*, 1994; Thickbroom, Sammut *et al.*, 1998; Mercier, Reilly *et al.*, 2006; Julkunen, Saisanen *et al.*, 2009; Z'graggen, Conforto *et al.*, 2009).

2.2 Mapeamento do campo magnético por imagens de fase

Independentemente da conformação da bobina, muitas vezes é importante que a topografia do campo magnético por ela produzido seja determinada, de forma a determinar com maior precisão as regiões que serão estimuladas. Usualmente, esse tipo de mapeamento é realizado com sensores magnéticos de varredura. No entanto, dependendo do número de amostras coletadas, esse procedimento pode ser muito demorado, além de possuir resolução espacial limitada. Por outro lado, existem técnicas de imagem por ressonância magnética (MRI, do inglês, *Magnetic Resonance Imaging*) sensíveis à intensidade de campo magnético, como é o caso das imagens de fase (Glover, 1991; Tomasi e Panepucci, 1999).

Nas sequências do tipo Gradiente Eco (GRE) os spins permanecem apenas parcialmente realinhados pela inversão do gradiente de leitura no tempo ao eco (TE). A diferença de fase do vetor magnetização em cada posição ($\vec{r}$) é diretamente proporcional à

componente axial da inomogeneidade do campo magnético (ΔB_z) em cada ponto. Dessa forma, a fase acumulada, $\phi(\vec{r})$, pode ser escrita em função de TE, segundo a equação 1:

$$\phi(\vec{r}) = \gamma \cdot \Delta B_z(\vec{r}) \cdot TE \tag{1}$$

Sendo γ o fator giromagnético do próton.

A fim de mapear o campo magnético produzido por bobinas, Tomasi e Panepucci sugeriram usar duas imagens GRE sem e com corrente nas bobinas utilizando o mesmo TE (Tomasi e Panepucci, 1999). Nesse caso, a fase acumulada em cada caso é descrita pela equação 2:

$$\phi_{with}(\vec{r}) = \gamma \cdot [\Delta B_z(\vec{r}) + Bcoil_z(\vec{r})] \cdot TE \tag{2}$$

A partir da diferença entre as duas imagens de fase, a distribuição axial do campo magnético gerado pela bobina ($Bcoil_z$) pode ser obtida.

No entanto, o caráter discreto e descontínuo das imagens de fase dificulta a reconstrução do mapa magnético, uma vez que a fase está no intervalo [-π, π]. Dessa forma, acúmulos de fase superiores apresentam descontinuidades em cada transição. Para se encontrar o mapa de campo correto, é necessário aplicar um algoritmo de desempacotamento (do inglês, *unwrapping*), capaz de eliminar essas descontinuidades (Cusack e Papadakis, 2002).

Como podemos observar nas equações 1 e 2, apenas a componente paralela ao campo magnético estático (B_0) será medido. Esse inconveniente pode ser resolvido por meio da rotação do fantoma e da bobina com relação a B_0, coletando imagens em pelo menos três planos distintos, de modo que os vetores de superfície de cada uma das imagens sejam

linearmente independentes. Assim, resolvendo o sistema linear mostrado na equação 3 podemos encontrar as componentes x, y e z do campo magnético a partir dos valores de magnetização $M_{1,\,2\,e\,3}$ medidos pelo tomógrafo em cada uma das orientações:

$$\begin{pmatrix} i \\ j \\ k \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} x\cos\alpha_1 & y\cos\theta_1 & z\cos\varphi_1 \\ x\cos\alpha_2 & y\cos\theta_2 & z\cos\varphi_2 \\ x\cos\alpha_3 & y\cos\theta_3 & z\cos\varphi_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \overrightarrow{M_1} \\ \overrightarrow{M_2} \\ \overrightarrow{M_3} \end{pmatrix}. \qquad (3)$$

i, j e k são os versores referentes às coordenadas do campo a ser medido e α, θ e φ são os ângulos formados pelas componentes x, y e z do campo magnético relativos ao campo constante Bz.

2.3 Imagem funcional por ressonância magnética

Em 1992, Kenneth Kwong (Kwong*, et al.,* 1992), e Seiji Ogawa (Ogawa*, et al.*, 1992) propuseram um método capaz de mapear indiretamente a atividade elétrica cerebral pela utilização de um contraste endógeno, atualmente conhecido por BOLD (Dependência do nível de oxigenação sanguíneo, do inglês: *Blood Oxygenation Level Dependent*). Esse efeito parte do princípio que a deoxi-hemoglobina e a oxi-hemoglobina possuem características magnéticas distintas, sendo a primeira paramagnética, enquanto a segunda é diamagnética. Sabe-se que durante períodos de atividade neural o fluxo sanguíneo cerebral local (CBF, do inglês: *Cerebral Blood Flow*) é aumentado. Desse modo, durante períodos de aumento da atividade neuronal, a combinação entre a elevação do CBF sem o aumento nas mesmas proporções no consumo de oxigênio, provoca a diminuição da concentração local de deoxi-hemoglobina. Por outro lado, o acréscimo da razão entre oxi e deoxi-hemoglobina leva à queda da susceptibilidade magnética local, levando ao aumento do tempo de relaxação transversal T2*, e ao leve aumento do brilho local das imagens por ressonância magnética. Para se analisar o comportamento hemodinâmico de regiões cerebrais é desejável que sejam

utilizadas imagens com tempo de repetição curtos sensíveis a variações locais de campo. Desse modo, comumente são utilizadas sequências do tipo eco-planares (EPI, do inglês: *Echo-planar Imaging*), capazes de gerar imagens rápidas ponderadas em T2*, porém com baixa resolução espacial e baixo contraste.

O aumento do contraste produzido pelo efeito BOLD é da ordem de 5%, ficando na mesma faixa da amplitude do ruído presente nessas imagens. Desta forma, para se visualizar as regiões que tiveram neurônios modulados é necessário a aplicação de algoritmos estatísticos específicos (Nichols e Holmes, 2002; Huettel, Song *et al.*, 2004; Goebel, Esposito *et al.*, 2006). Para a utilização desses métodos, que na sua grande maioria realiza avaliações estatística dos dados, torna-se necessária a aquisição de várias imagens de um mesmo corte do cérebro em estados neurofisiológicos distintos.

Na prática, essas fatias são adquiridas com a intenção de cobrir todo o volume cerebral, como mostrado na figura 9. Esse volume é então adquirido várias vezes em intervalos de tempo regulares, da ordem de segundos, definido pelo tempo de repetição (TR), por meio de sequências do tipo EPI, de modo a constituir uma série temporal por voxel da imagem (Fig. 10).

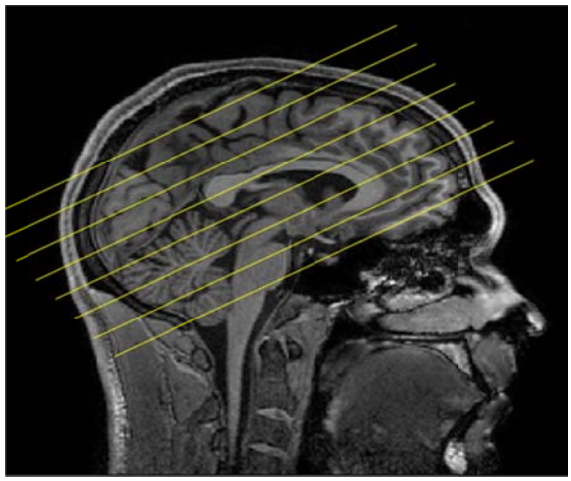


Figura 6. Exemplo de como os cortes das EPI são posicionados em relação à cabeça. As linhas em amarelo representam cortes axiais das EPI.

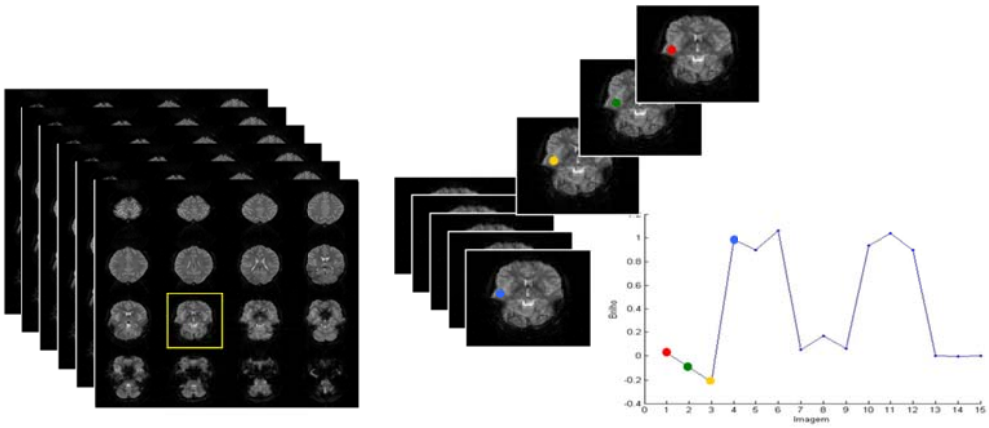


Figura 7. Exemplo de como as séries temporais são criadas. O retângulo em amarelo representa um dos cortes do volume espacial, e os pontos coloridos representa o mesmo voxel em aquisições distintas (diferentes TR), cuja variação de brilho gera a série temporal representada pelo gráfico mais à direita, abaixo.

A maneira mais comum de controlar a modulação das regiões que ficaram ativas, é a utilização de protocolos que combinam tarefa e repouso. Os paradigmas mais utilizados são o paradigma em bloco, que é um protocolo no qual o voluntário fica um período em repouso e o mesmo período realizando alguma atividade e o evento relacionado, no qual o voluntário realiza alguma tarefa em um período relativamente curto espaçados por um grande período de repouso (de Araújo, 2001). O paradigma em bloco é mais robusto, entretanto perde em especificidade para o paradigma do tipo evento relacionado. Além disso, algumas tarefas podem ser cansativas para os voluntários, que muitas vezes podem apresentar déficits devido alguma enfermidade, como é o caso, por exemplo, de pacientes que sofreram AVC e apresentam déficit motor. Para esse grupo realizar um protocolo motor com paradigma em bloco seria muito difícil, além de ser uma fonte de artefatos, como o artefato de movimento pelo esforço em completar a tarefa. Outra vantagem do paradigma de evento relacionado é que ele permite a caracterização da resposta hemodinâmica (Sturzbecher, Tedeschi *et al.*, 2009), e assim utilizando algoritmos computacionais como o BLM (Mapeamento de Latência de BOLD, do inglês: BOLD Latency Mapping) é possível realizar a quantificação computacional de alguns parâmetros da resposta hemodinâmica (Leoni, Mazzeto-Betti *et al.*, 2008).

Uma vez adquiridas, as imagens devem passar por rotinas para condicionamento dos dados a fim de deixa-los prontos para a análise estatística. As principais estratégias de pré-processamento contemplam a correção de artefato de movimento, correção temporal entre fatias, e a aplicação de filtros espaciais e temporais.

Em um primeiro momento, é preciso garantir que as imagens adquiridas estejam alinhadas espacialmente. Porém, tendo em vista que o exame é relativamente longo, é comum a existência de movimento involuntários da cabeça dos indivíduos. Desse modo, é necessária a aplicação de algoritmos de correção de artefato de movimento. Para tanto, uma imagem (geralmente a primeira) é tomada como padrão de modo a realinhar as imagens subsequentes à essa referência (Fig. 11), por métodos de interpolação.

Figura 8. Esquema de correção de artefato de movimento. A figura da esquerda mostra, de maneira didática, imagens do mesmo corte com orientações diferentes e após a correção as imagens são alinhadas, como mostrado na figura à direita.

Outro problema inerente aos protocolos de fMRI vem do fato de que os cortes que compõe o volume não são adquiridos simultaneamente. Essa diferença temporal faz com que as imagens de um mesmo volume espacial capturem sinais em estados neurofisiológicos ligeiramente distintos. Dessa forma, se faz necessário ajustar os sinais de modo a coloca-los em fase, o que é feito por meio de métodos de interpolação. A figura 12 ilustra esse processo.

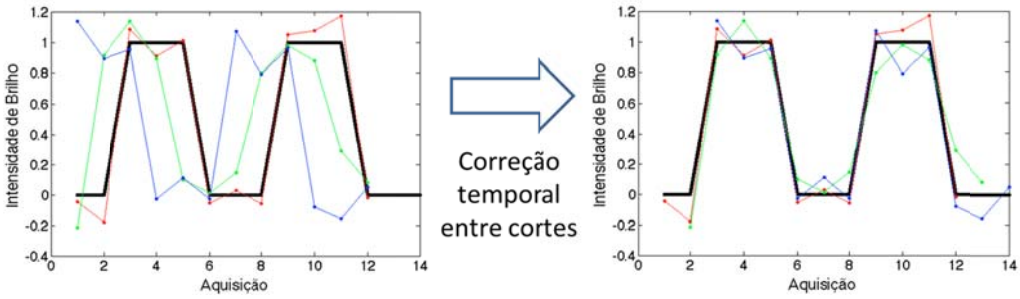


Figura 9. Ilustração da correção temporal entre fatias. O sinal em preto representa o modelo das séries temporais. Os sinais vermelho, verde e azul representam sinais de cortes adquiridos em tempos diferentes. Nota-se que o sinal em verde está adiantado com relação ao vermelho, e o azul com relação a todos. Após a aplicação da correção temporal, todos os sinais ficam em fase.

Por fim, com o objetivo de aumentar a relação sinal-ruído, boa parte dos estudos de fMRI faz uso da aplicação de filtros temporais e espaciais. Os filtros temporais são bastante conhecidos no processamento de sinal, podemos citar aqui o exemplo dos passa-alta, passa-baixa. O filtro passa-alta vai eliminar todas as frequências abaixo de um valor estipulado, da mesma forma o passa-baixa elimina todas as frequências do sinal acima de uma determinada frequência. Em um exame no qual o voluntário, por exemplo, em um paradigma em bloco, realiza uma tarefa de abrir e fechar a mão durante 20 segundos, e em seguida fica 20 segundos parado, espera-se que a frequência associada neuromodulação devido à tarefa seja de 0,025Hz, portanto é aconselhável se aplicar um filtro passa-baixa com corte acima de 0,025Hz, eliminando assim contribuições indesejáveis, como por exemplo, o batimento cardíaco e a frequência respiratória.

Já o filtro espacial mais comumente usado é do tipo Gaussiano, com largura a meia altura (FWHM, do inglês *Full Width at half Maximum*) da ordem de 4 mm a 8 mm. A aplicação do filtro Gaussiano leva à diminuição das componentes de alta frequência espacial, reduzindo, portanto, os componentes de ruído, e levando à consequente perda de resolução espacial, ilustrado na figura 13.

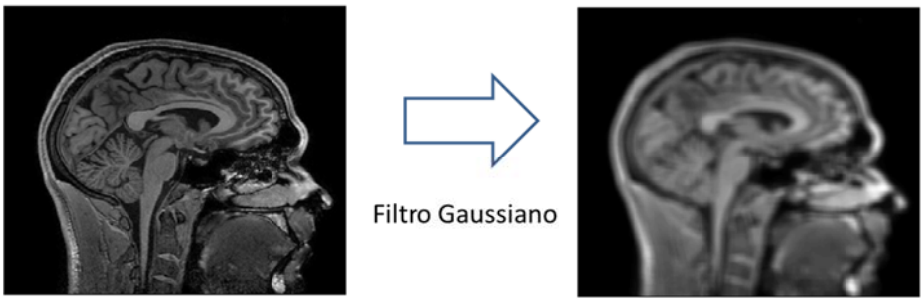


Figura 10. Ilustração da aplicação do filtro gaussiano. À esquerda, a imagem original, à direita a imagem após a aplicação do filtro Gaussiano.

Após as etapas de pré-processamento, os dados estão preparados para a análise estatística. Para tanto, há diferentes métodos, que incluem desde avaliações mais simples por métodos mais simples de correlação cruzada (Bandettini, Jesmanowicz *et al.*, 1993) e

variância (Clare, Humberstone *et al.*, 1999), indo até propostas mais modernas baseadas, por exemplo, na Análise de Componentes Independentes (Mckeown, Makeig *et al.*, 1998; Estombelo-Montesco, Sturzbecher *et al.*, 2010), na Teoria da Informação (De Araujo, Tedeschi *et al.*, 2003; Tedeschi, Muller *et al.*, 2004; 2005; Cabella, Sturzbecher *et al.*, 2008; Cabella, Sturzbecher *et al.*, 2009; Sturzbecher, Tedeschi *et al.*, 2009) e em técnicas de Aprendizado de Máquina (Mourao-Miranda, Bokde *et al.*, 2005). A despeito da existência de inúmeras propostas de processamento, o método de escolha e mais utilizado pela comunidade de fMRI é o Modelo Linear Generalizado (GLM, do Inglês*: Generalized Linear Model*).

A ideia central do GLM é modelar a observável $\boldsymbol{y}$ a partir da combinação linear de vários outros fatores $\boldsymbol{x_n}$ acrescido de um termo de erro $\boldsymbol{\varepsilon}$. Para tanto, é necessária a obtenção dos valores dos parâmetros $\boldsymbol{b_n}$ que representam quanto cada fator $\boldsymbol{x_n}$ contribui para reconstruir a observável $\boldsymbol{y}$, de acordo com a equação 4 abaixo:

$$\boldsymbol{y} = \boldsymbol{b_0} + \boldsymbol{b_1 x_1} + \boldsymbol{b_2 x_2} + \cdots + \boldsymbol{b_n x_n} + \boldsymbol{\varepsilon} \quad (4)$$

Essa equação pode ser representada em forma matricial:

$$\boldsymbol{Y_{n\times V}} = \boldsymbol{X_{n\times f}} \cdot \boldsymbol{\beta_{f\times V}} + \varepsilon_{\boldsymbol{n\times V}} \quad (5)$$

Na equação 5, $\boldsymbol{Y}$ é a matriz de resultados experimentais, em as linhas representam a variação no tempo de dada variável e as colunas, as diferentes variáveis, $\boldsymbol{X}$ é conhecida como matriz de regressores, em que o número de linhas representa sua variação temporal e as colunas os fatores para a reconstrução da observável, $\boldsymbol{\beta}$ é a matriz dos parâmetros a serem

estimados e que ponderam os valores de ***X***. Por fim ε que traz os erros entre os valores medidos e os valores encontrados pela combinação linear e tem a mesma dimensão de ***Y***.

Uma vez que a equação 5 está montada, deve-se fazer ajustes nos parâmetros para a minimização dos erros em outras palavras, a matriz ε corresponde à matriz de resíduos e é chamada de função custo que deve ser minimizada, sendo ela a única variável dependente da equação. Para a minimização dessa função custo geralmente é calculado o erro mínimo quadrático, que consiste em somar o quadrado dos resíduos de dada amostra, para o modelo em questão.

Para testar a significância estatística de um dado modelo ***X***, a amplitude associada a cada amostra β deve ser dividida por seu respectivo resíduo, que sobre a hipótese nula deve seguir uma distribuição F, e sua significância estatística pode ser calculada em função do número de graus de liberdade.

Trazendo para a realidade da fMRI, a variável **Y** é a matriz da série temporal de cada voxel medido nas EPI, sendo o seu número de linhas **n**, o número de pontos da série temporal e o número de colunas **V**, o número de voxels da imagem. A variável **X** corresponde a matriz que contem os regressores, que são as funções que vão descrever o modelo, por exemplo, um função de onda quadrada para paradigmas em bloco e uma função de resposta hemodinâmica (HRF, do inglês: *Hemodynamic Response Function*), sendo o número de linhas igual a quantidade de pontos da série temporal, e o número de colunas **f**, o número de funções que compõe o modelo.

Tomando por base o processamento com o GLM, quando o problema é resolvido, cada voxel terá um valor de $\boldsymbol{\beta}$ associado a ele. Através da função de distribuição acumulada do teste t de student, é possível encontrar o valor de **t** para um determinado $\boldsymbol{\beta}$ conhecendo o grau de liberde, que nesse caso são os números de regressores utilizados. Assim conhecendo o valor de t podemos determinar qual a probabilidade (p-valor) da série temporal de dado voxel

ter um comportamento igual ao do modelo. Quando existe uma alta probabilidade da série temporal se comportar como o modelo, inferimos que as estruturas cerebrais representadas por aquele voxel se engajaram na tarefa durante a aquisição das EPIs.

Para facilitar a visualização, deve ser tomado então um valor mínimo de significância estatística para representar as regiões que se engajaram na tarefa, além disso, esses mapas estatísticos devem ser sobrepostos em imagens anatômicas, de forma que se possa conhecer quais região cerebrais foram ativadas.

Devido à baixa resolução anatômica das EPIs, que são as imagens que geram as séries temporais, é comum sobrepor os mapas estatísticos em imagens de alta resolução anatômica, por exemplo, aquelas 3D T1 do tipo MPR (do inglês: *Multi-planar Reconstruction*), como mostrado na figura 14.

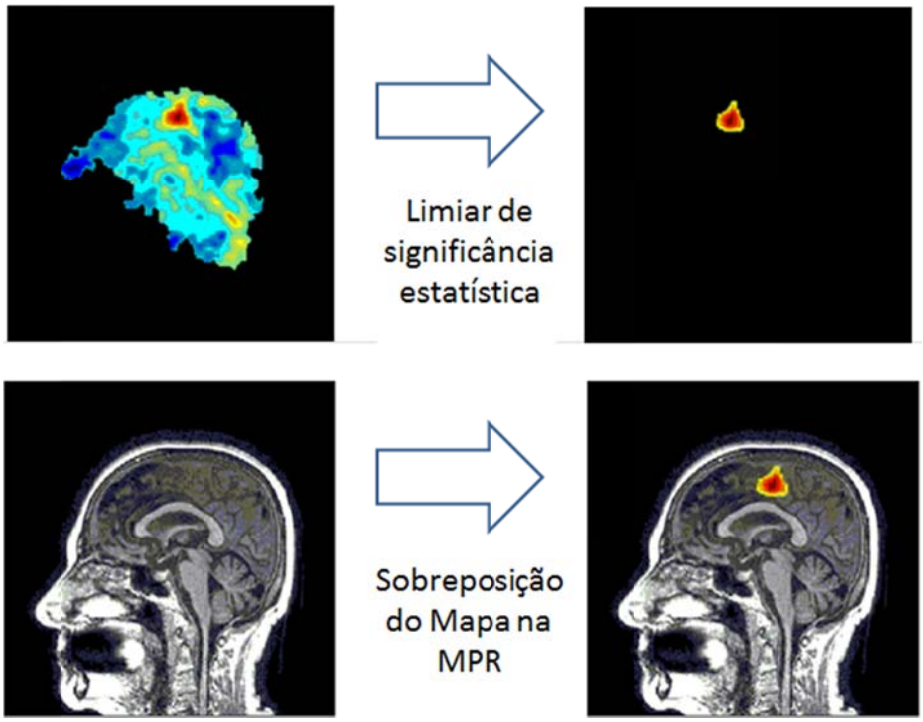


Figura 11. Sobreposição dos mapas estatísticos em imagens de boa resolução anatômica. Nesse exemplo é mostrado a sobreposição de um mapa estatístico (figura de cima), nas imagens de alta resolução anatômica (figuras de baixo). A figura do canto superior direito representa o mapa estatístico após a aplicação do limiar de significância estatística.

2.4 Neuronavegação

Em alguns estudos é necessário, ou ao menos desejável, utilizar várias modalidades de investigação para se obter informações sobre objeto de estudo, o cérebro. Dessa forma, muitas vezes torna-se necessário o cruzamento da informação proveniente dos diferentes exames, como, por exemplo, da imagem por ressonância magnética e a TMS. Nesses casos, uma questão fundamental diz respeito à necessidade de criar um sistema de coordenadas comum.

O ato de colocar diversas observações de um mesmo objeto, em um sistema de coordenadas comum é chamado de corregistro. Nesse cenário, a Neuronavegação é o termo que se usa para o conjunto de ferramentas computacionais que possibilita o corregistro da cabeça de um indivíduo (objeto físico) com sua respectiva neuroimagem (objeto virtual). Nesse processo é necessário utilizar marcas que possam ser encontradas tanto no objeto real como no virtual. Para tanto, geralmente são utilizados pontos estereotáxicos como marcadores (tragus auriculares, osso nasal, ínio e Cz) (Gusmão, 1999).

Todo objeto virtual existe dentro de um sistema fixo de coordenadas, que pode ser representado pela posição de um determinado voxel na imagem. Já o objeto físico não possui um sistema de coordenadas associado a ele. Assim é necessário, primeiramente, criar um sistema de coordenadas no qual ele seja representado, para depois efetuar o corregistro. As coordenadas podem ser dadas por exemplo, pelo uso de sistemas de rastreio sem armação, a partir da utilização de sistemas de aquisição digital de posição (rastreador espacial). Esses aparelhos têm a função de devolver a posição de uma sonda em relação ao seu sistema de coordenadas. O funcionamento desses rastreadores é bastante variado, podendo ser baseado em fontes de radiofrequência, ópticos ou ultrassônicos. Independente do principio utilizado, todos retornam o valor da posição de uma ponteira, preferencialmente com seis graus de liberdade. A saída fornecida pelos rastreadores espaciais pode alimentar diretamente os

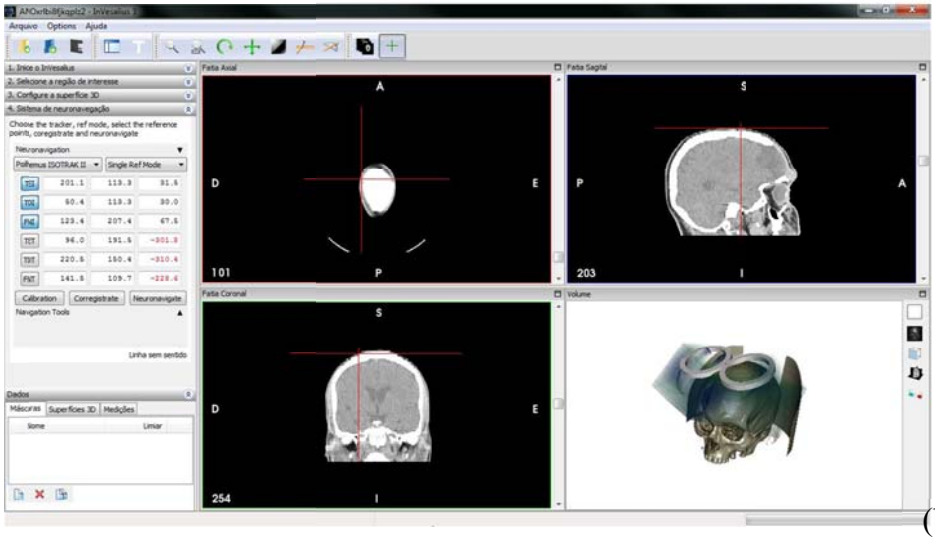
programas computacionais de neuronavegação, e a partir desses valores, determinar as matrizes de transformada de coordenadas que levam do espaço físico para o virtual.

Uma vez que os objetos físico e virtual estejam corregistrados, o neuronavegador pode representar as posições físicas da cabeça nas neuroimagens em tempo real, pela utilização de uma sonda de rastreamento espacial, sendo possível visualizar sua posição em relação à respectiva neuroimagens. Quando a sonda é deslocada, a posição do cursor é atualizada instantaneamente (Fig. 16).

Figura 12. Exemplo de corregistro em um neuronavegador da cabeça de um voluntário com a sua respectiva reconstrução volumétrica da imagem de ressonância. Os pontos em azul e verde representam as marcações na touca e o ponto vermelho representa a posição da ponteira da sonda.

É possível também corregistrar mapas que agreguem informações funcionais complementares, como mapas de intensidade de MEP do córtex motor por um exame de TMS, ou ainda representações que tragam informações da aplicação de um campo externo, como por exemplo, o posicionamento do mapa de distribuição espacial de campo magnético utilizado na TMS (Fig. 17).

(a)



(b)

Figura 13. (a) Representação virtual da bobina em forma de 8 corregistrada com a distribuição de seu mapa de campo. (b) Exemplo de um neuronavegador, após o corregistro da bobina em forma de 8 e seu mapa de campo magnético com as imagens de tomografia computadorizada do mesmo indivíduo.

2.5 Aplicações em pacientes com Acidente Vascular cerebral

O acidente vascular cerebral (AVC) é uma das principais causas de morte em todo o mundo (World Health, 2008). No Brasil foram registradas cerca de 170.000 internações por AVC/ano, com percentual de óbitos em torno de 17%, com base nas informações do DATASUS, de 2005 a 2009 (Ministério-Da-Saúde, 2012).

O AVC pode se manifestar de duas formas: isquêmica (AVCi) ou hemorrágica (AVCh). O AVCi é causado pela interrupção da irrigação sanguínea de uma região encefálica por obstrução de vasos por um trombo ou êmbolo (O'sullivan e Schmitz, 2004). Já no AVCh ocorre o extravasamento de sangue dos vasos para o interstício, podendo se alojar no parênquima cerebral ou espaço subaracnóideo (Grieve, 2007).

Os sintomas do AVC são diversos e dependem fundamentalmente da área acometida, passando por alterações nas funções de linguagem, sensoriais, de propriocepção, e, principalmente, alterações motoras, sendo a hemiparesia a mais comum, incluindo alterações motoras e sensoriais em um lado do corpo, resultante de lesão do hemisfério cerebral contralateral (O'sullivan e Schmitz, 2004).

Logo após o AVC, normalmente são realizados alguns procedimentos para diagnóstico, como exames por tomografia computadorizada e/ou ressonância magnética. Podem também, em alguns casos, ser realizados procedimentos para evitar o agravamento das sequelas como a utilização de trombolíticos para desobstruir vasos em casos específicos de AVCi (Marler, Brott *et al.*, 1995).

A partir do início dos sinais do AVC até um período que pode perdurar até seis meses, diz-se que o paciente se encontra em fase aguda e subaguda. Durante esse período, a reorganização espontânea das redes neurais é muito intensa e por consequência o paciente apresenta melhoras significativas em curto período. Depois de aproximadamente seis meses, o paciente entra na fase crônica, quando a reorganização das redes neurais não é tão intensa, e portanto a melhora do paciente é mais lenta.

Como forma de buscar a reabilitação do paciente, em especial na fase crônica, algumas técnicas tem sido utilizadas para estimular a reorganização neural, e que incluem principalmente as áreas de fisioterapia, fonoaudiologia e terapia ocupacional.

Do ponto de vista da fisioterapia, várias técnicas tem sido utilizadas, em especial aquelas que visam a estimulação do sistema motor convencionalmente por meio da movimentação ativa do membro afetado. Por outro lado, há crescente interesse pela implementação de novas técnicas de tratamento, que passam, por exemplo, por novos protocolos de imagética motora (Altschuler, Wisdom *et al.*, 1999; Vargas, Olivier *et al.*, 2004; Fukumura, Sugawara *et al.*, 2007; Funase, Tabira *et al.*, 2007), terapia de restrição do

membro afetado, terapia de espelho (Ramachandran e Rogersramachandran, 1996; Altschuler, Wisdom *et al.*, 1999; Sathian, Greenspan *et al.*, 2000; Garry, Loftus *et al.*, 2005; Yavuzer, Selles *et al.*, 2008; Michielsen, Smits *et al.*, 2011; Michielsen, Selles *et al.*, 2011) e terapia por contensão induzida (Talelli, Greenwood *et al.*, 2006)e a eletroestimulação sensorial (Conforto, Cohen *et al.*, 2007; Conforto, Ferreiro *et al.*, 2010; Chipchase, Schabrun *et al.*, 2011).(Koski, Mernar *et al.*, 2004)

A Eletroestimulação Sensorial (SES, do inglês *Sensory Electric Stimulation*) é uma modalidade eletroterapêutica que, como o nome sugere, tem objetivo de proporcionar estimulação sensorial por meio do estímulo direto de músculos e vias nervosas periféricas abaixo do limiar motor.

Em 2005 Tinazzi *et al* (Tinazzi, Zarattini et al., 2005) encontraram redução da excitabilidade corticoespinhal das vias relacionadas à musculatura submetida a SES em sujeitos saudáveis. Com esses resultados, os autores ressaltam a aplicação deste tipo de modalidade terapêutica em estados patológicos que envolvam um desequilíbrio de tônus entre grupos musculares que atuem antagonicamente, como é o caso da espasticidade.

Desde então, a SES tem sido amplamente utilizada na reabilitação neurológica e seus benefícios na recuperação de pacientes acometidos por espasticidade são promissores. Além disso, vários estudos indicam que a SES também parece induzir modificações na representação cortical das áreas acometidas por AVC (Ridding, Mckay *et al.*, 2001; Charlton, Ridding *et al.*, 2003; Pitcher, Ridding *et al.*, 2003; Uy e Ridding, 2003; Sullivan e Hedman, 2004). Porém, ainda não são bem compreendidos os mecanismos responsáveis pelas mudanças funcionais induzidas pela SES, que inclui aumento da força muscular, plasticidade cortical e espinhal, e alterações de ordem histoquímica dos tecidos que sofrem o estímulo e subjacentes a ele (Ridding, Brouwer *et al.*, 2000; Ridding e Taylor, 2001).

Nesse cenário, as técnicas de neuroimagem funcional, como por exemplo a fMRI e a TMS, tem desempenhado papel fundamental, em especial sob a perspectiva da complementaridade dessas duas técnicas.

Em um estudo de Nair *et al.* (Nair, Hutchinson *et al.*, 2007) foi feita uma análise nas alterações das estruturas cerebrais envolvidas na tarefa motora observadas por fMRI e TMS, No estudo por fMRI utilizaram protocolos de abdução e adução dos dedos da mão, e flexão e extensão dos punhos, sendo que encontraram que os pacientes tendiam a apresentar mais ativação cerebral do que os controles. Realizaram então os estudos com TMS e encontraram que embora os pacientes tivessem recobrado a funcionalidade motora, eles apresentavam alterações nas interações intracorticais e transcalosa. Já em uma Meta-análise de Richards *et al.* (Richards, Stewart *et al.*, 2008), encontraram treze estudos na literatura que examinaram alterações nas representações neurais após aplicação de terapia específica para membros superiores, sendo que desses 11 utilizaram TMS ou fMRI. Enquanto os estudos de fMRI a maior procura foi por alterações do número de voxels ativos, nos estudos com TMS, a busca foi dividida em alterações na amplitude de MEP e área responsiva. Os resultados mostraram que as mudanças de plasticidade neural no córtex motor do hemisfério lesionado acompanha os ganhos motores funcionais obtidos com a terapia.

Por um lado, os exames de fMRI auxiliam na identificação das áreas relacionadas à atividade motora (Sarfeld, Diekhoff *et al.*, 2012). Sabe-se, porém, que a fMRI está baseada na resposta hemodinâmica, que no paciente com AVC pode estar alterada (Mazzetto-Betti, Leoni *et al.*, 2010), e eventualmente tornar as análises imprecisas. Por outro lado, a TMS realiza medidas bioelétricas e assim infere de maneira mais direta sobre a funcionalidade do córtex motor (Talelli, Greenwood *et al.*, 2006). Porém, os exames de TMS trazem informação apenas de regiões que possuem projeções corticoespinais específicas, e possui resolução espacial bastante limitada (Macdonell, Jackson *et al.*, 1999). Em outro estudo Hamzei *et al.*

(Hamzei, Liepert *et al.*, 2006) investigaram a reorganização cortical antes e depois da terapia de contenção induzida por TMS e fMRI, e encontraram diferenças tanto no sinal BOLD quanto nos valores de facilitação e inibição intracortical, antes e após a terapia.

Vários estudos recentes tem mostrado que a SES podem modular a excitabilidade do córtex motor em uma única sessão, por exemplo, os estudos de (Golaszewski, 2012) que encontraram alterações na excitabilidade cortical motora para frequência de 2Hz utilizando TMS. Outro estudo parecido é o de (Pitcher, Ridding *et al.*, 2003) que encontraram uma diminuição da excitabilidade corticoespinhal depois da aplicação da SES a 3Hz. Já em um estudo recente de Manganotti (Manganotti, Storti *et al.*, 2012), observaram que pacientes com AVC agudo que não tiveram modulação de BOLD quando o nervo mediano era estimulado tiveram um recuperação pior do que aqueles que apresentaram atividade cerebral quando estimulados no exame de fMRI.

Por outro lado, Conforto *et al.* (Conforto, Ferreiro *et al.*, 2010), chamam a atenção para se ter cautela na extrapolação dos resultados da SES aplicados em uma única sessão para a utilização em terapia em pacientes agudos de AVC.

Objetivos

3.1 Objetivo Principal

Este trabalho tem a intenção de trazer contribuições em duas esferas: uma no âmbito da inovação tecnológica e outra em neurociências. A primeira consiste na implementação de um conjunto de programas computacionais para o corregistro e processamento de sinais provenientes da TMS, e o desenvolvimento de um sistema de neuronavegação de arquitetura livre e aberta. Foi também objetivo deste trabalho desenvolver métodos capazes de realizar o mapeamento dos campos magnéticos das bobinas de estimulação, tanto para sua utilização na neuronavegação, quanto como ferramenta no desenvolvimento de novas geometrias de bobinas e controle de qualidade. Além disso, foi realizado o mapeamento do córtex motor de pacientes com AVC tanto por TMS como por fMRI. Foi ainda foco deste trabalho a investigação do impacto da SES sobre o sistema motor dos membros superiores em pacientes com AVC, tanto por fMRI como por TMS. Por fim, foram avaliadas alterações de vasorreatividade em controles pelo uso da SES utilizando a técnica de fMRI.

3.2 Objetivos Específicos

I – Desenvolvimento Tecnológico

i. Aprimorar o sistema de neuronavegação já desenvolvido em nossos laboratórios, acrescentando novas funcionalidades com objetivo de distribuir esse aplicativo de forma gratuita para outros usuários interessados;

ii. Desenvolver um conjunto de ferramentas computacionais para o tratamento de sinais contínuos provenientes de sistemas de eletromiografias, para a geração de mapas de MEP do córtex motor;

iii. Desenvolver um conjunto de ferramentas para o corregistro dos mapas de MEP com mapas de fMRI;

iv. Desenvolver métodos e ferramentas computacionais para mapeamento vetorial do campo magnético produzido pelas bobinas de TMS, pelo uso da MRI.

II – Aplicações em pacientes com AVC

i. Realizar o mapeamento do córtex motor de pacientes com AVC com as técnicas de TMS e fMRI a fim de comparar os mapas obtidos;

ii. Realizar a SES no antebraço espástico de pacientes com AVC e indivíduos controle, com frequência de 3Hz durante 30 min para verificar se há modulação na excitabilidade corticoespinhal via MEP dos músculos flexor e extensor radial do carpo e abdutor curto do polegar;

iii. Realizar a SES no antebraço de indivíduos assintomáticos com os mesmos parâmetros aplicados nos pacientes para verificar se existe algum efeito de vasorreatividade no sistema nervoso central, usando fMRI.

Material e Métodos

Três experimentos instrumentais, e outros três de aplicações em pacientes foram realizados neste estudo. Os três primeiros foram a caracterização de campo magnético das bobinas de TMS, implementação do sistema de neuronavegação e desenvolvimento dos programas computacionais de análise e corregistro de mapas de TMS e fMRI. Os três últimos foram estudos de mapeamento do córtex motor por fMRI e TMS, e avaliação dos efeitos da SES em voluntários assintomáticos e voluntários acometidos por acidente vascular encefálico (AVE) diagnosticados por imagem, sendo que os pacientes apresentavam espasticidade (grau entre 1 e 2) diagnosticados por meio da escala de Ashworth (ANEXO I). As características de cada experimento e amostras são informadas nas sessões a seguir. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCRP) da USP-RP (Ofício nº 3777/2010 – ANEXO II). Todos os sujeitos assinaram o termo de Consentimento Livre e Esclarecido e receberam orientações a respeito dos procedimentos adotados.

É importante ressaltar que o método da estimulação por pulso magnético único, adotado neste estudo, para mapeamento das representações de músculos de interesse em M1 é bem estabelecido na literatura, com grande número de pesquisadores utilizando este protocolo sem qualquer relato de intercorrências, mostrando-se um método seguro para uso experimental em humanos (Rossi, Hallett *et al.*, 2009). O serviço de Neurologia do HCRP-UE/FMRP/USP, representado pelo professor médico Octávio Pontes Neto, esteve à disposição para total suporte aos voluntários que participaram do experimento.

4.1 Equipamentos de TMS e de MRI

Para a realização desta etapa do trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos:

- um estimulador da marca NeuroSoft, modelo Neuro-MS (Ivanovo, Russia), capaz de produzir campo magnético de até 2T em regime de pulso único;
- um tomógrafo de ressonância magnética de 3 Tesla, modelo Achieva da marca Philips (Best, Holanda).
- Um *Fluxgate* modelo 539 da marca Applied Physics Systems (Mountain View, EUA)

4.1.1 Mapeamento vetorial do campo magnético produzido pela bobina plana em forma de 8

Nesse experimento realizamos medidas *in vivo* e *in vitro* a fim de quantificar a distribuição espacial do campo magnético produzido pela bobina em forma de 8. Para experimentos *in vitro* dois simuladores físicos (fantomas) foram preparados contendo uma solução que simula algumas propriedades da ressonância magnética nuclear do tecido humano (tempo de relaxação e condutância). A solução foi composta por 3.6g de NaCl e 1.9555g de $CuSO_4 \times 5H_2O$ por litro de H_2O. Essa solução foi colocada em uma caixa de acrílico (Figura 14a) com dimensões de 20 x 20 x 10 cm^3, e em uma cabeça de plástico em tamanho real (Figura 14b).

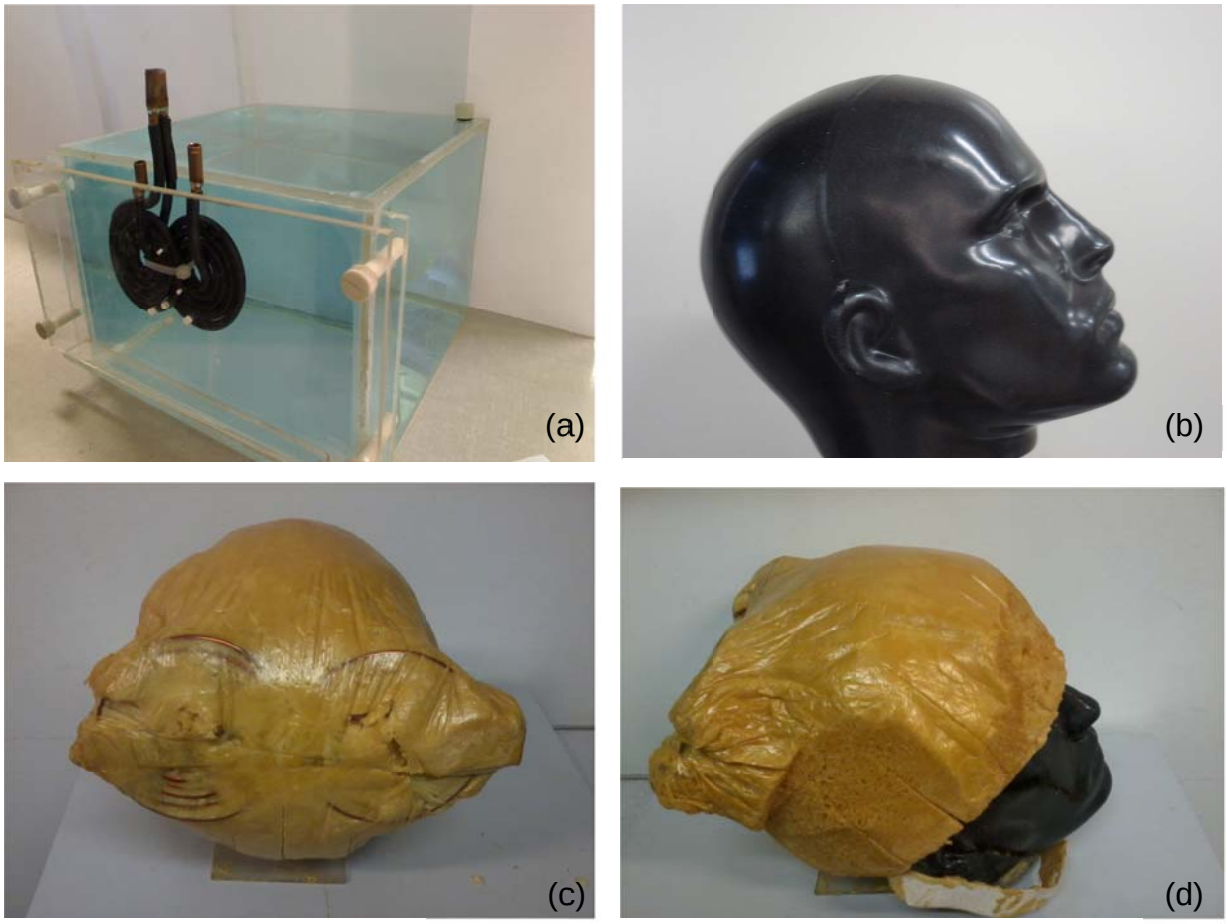


Figura 14. Montagem experimental para medida do campo magnético por MRI. (a) fantoma de acrílico preenchido com solução de sulfato de cobre; (b) fantoma de cabeça preenchida com a mesma solução; (c) fantoma de cabeça vestindo capacete com uma bobina em forma de 8, 10x20cm^2, semelhante a da Neurosoft; (d) vista lateral do fantoma com o capacete.

Utilizamos uma bobina em forma de 8 da marca Neurosoft, modelo Neuro-MS com dimensões de 10x20cm^2, como mostrado na Figura 15. Devido à impossibilidade de utilizar a fonte do próprio estimulador, pois os pulsos são de grande magnitude e curta duração, o que impossibilita a realização das medidas de suscetibilidade, utilizamos uma bateria automotiva de 12V, ligada em série a um circuito composto por um resistor (10Ω e 50W) e a bobina a ser caracterizada.

Como a resistência da bobina de TMS é 0.3Ω, a corrente que circulou pelo circuito foi de 1.12A. Para obter o valor do campo produzido pela bobina, utilizamos um magnetômetro do tipo *fluxgate*, a fim de constatar se a intensidade do campo produzido nessa configuração seria suficiente para ser medida pelo método de GRE.

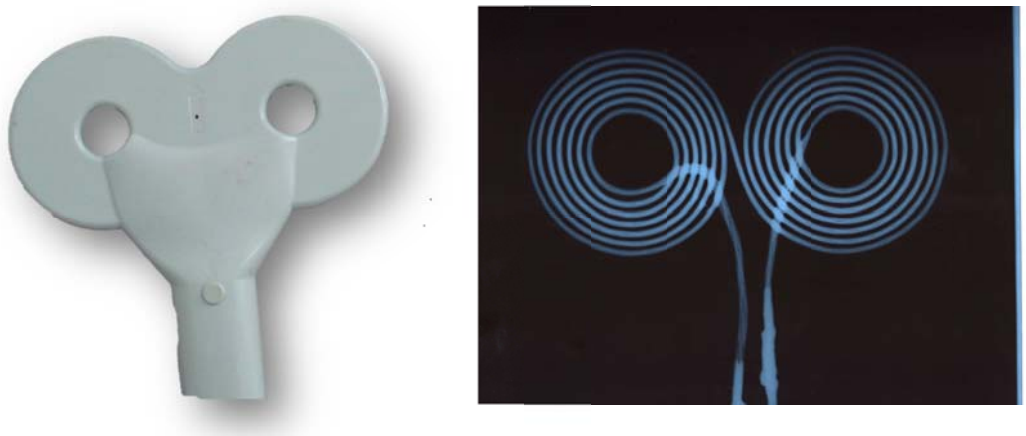


Figura 15. Bobina em forma de 8 da marca Neurosoft com dimensões de 10x20 cm^2, utilizada nos experimentos de mapeamento de campo magnético. (a) Fotografia da bobina (b) Radiografia da bobina, mostrando seus enrolamentos.

Para a fixação da bobina no fantoma de cabeça e no indivíduo saudável, construímos um capacete com espuma expansível de poliuretano com uma bobina em forma de 8 com dimensão 10x20cm^2, seguindo as mesmas especificações da bobina comercial Neurosoft. O capacete pode ser visualizado nas Figura 14c e Figura 14d.

As imagens por ressonância magnética foram baseadas em sequências do tipo gradiente eco utilizando-se a bobina de corpo inteiro. Os parâmetros de imagem utilizados foram tempo de repetição (TR) de 360 ms, tempo ao eco (TE)[1] de 4,6 ms, ângulo de flip de 45°, FOV de 25 x 25 cm, matriz de aquisição de 512 x 512, espessura da fatia de 2 mm com 1 mm de intervalo (gap). O volume total das imagens cobriram uma região de 8 cm para além da superfície da bobina de TMS. As imagens foram adquiridas com a bobina ligada e desligada, em 3 direções diferentes utilizando os dois fantomas, de forma que fosse possível determinar a distribuição vetorial do campo magnético.

Como as imagens estavam discretizadas em fase de $-\pi$ à π, utilizamos rotinas implementadas em Matlab por nós para desempacotar as imagens, deixando-as com valores contínuos. Só depois de desempacotadas, realizamos a subtração das imagens, com a bobina ligada e desligada, de forma a manter apenas a contribuição do campo gerado pela corrente dc.

A fim de garantir que todas as imagens estivessem no mesmo sistema de coordenadas, implementamos rotinas capazes de realizar o corregistro dos volumes nas 3 direções, assim que garantimos o alinhamento das imagens, aplicamos a equação 3 e encontramos as componentes x, y e z do campo magnético.

Um segundo experimento foi realizado a fim de determinar a viabilidade da medida da distribuição de campo magnético dentro da cabeça de um indivíduo saudável. Para tanto, a bobina em forma de 8 foi fixada no topo da cabeça (vértice) de um voluntário (homem, 20 anos de idade), utilizando o mesmo capacete para aquisição das imagens no fantoma (Figura 14c e Figura 14d). Adquirimos as imagens utilizando os mesmos parâmetros dos experimentos *in vitro*, no entanto, em apenas uma direção.

---

[1]O TE = 4,6 ms foi escolhido para obtermos a maior relação sinal/ruído e redução de artefatos por correntes de Foucault. Por outro lado, a sequencia deveria garantir sensibilidade suficiente para a geração das imagem de fase.

Aproveitando da técnica de mapeamento testamos o mapeamento de novas geometrias de bobinas de TMS. Para tanto confeccionamos 4 tipos básicos de bobinas: pequenas em forma de 8, duplas pequenas em forma de oito, bobinas em forma de D e a conformação MA1 proposta em 2008 por Thomas Weyh (Wendicke, Weyh *et al.*).

As bobinas em forma de 8 foram confeccionadas em um molde de latão com fio AWG 12, com diâmetro de aproximadamente 2 mm. As demais bobinas forma confeccionadas em placa de circuito impresso de fenolite, apenas para o mapeamento da distribuição espacial de seu campo magnético.

O mesmo método descrito anteriormente foi empregado para o mapeamento do campo magnético produzido por essas bobinas, utilizando-se apenas o fantoma 20 x 20 x 10cm^3. As bobinas foram fixadas em umas das paredes 10x20cm^2 do fantoma e ligadas à bateria automotiva por um circuito de 10Ω. Além disso, com o auxílio de um *fluxgate* foi medida a intensidade do campo magnético nas direções x, y e z no centro de um dos enrolamentos da bobina em forma de 8, variando a distância de 0 à 2 cm. A Figura 16 traz um esquema de onde foi posicionado a sonda do *fluxgate*.

Figura 16. Esquema das medidas de campo magnético produzido pelas bobinas de TMS em função da, sendo R o raio da bobina e x o eixo no qual foi posicionada a sonda do *fluxgate*.

4.1.2 Implementação do Neuronavegador

As rotinas do neuronavegador foram implementadas em linguagem *Phyton* com o auxílio das bibliotecas VTK, ITK e GDCM para a manipulação das imagens e a biblioteca WXPhyton para o desenvolvimento do ambiente gráfico. Todas as rotinas foram escritas no editor Eclipse.

Para a implementação, tomamos como base os algoritmos de outro neuronavegador desenvolvido anteriormente pelo nosso grupo em linguagem Matlab 7.0.1 (Peres, Souza *et al.*, 2010).

Para a construção do sistema de coordenadas da cabeça (objeto físico), foi utilizado um sistema de rastreamento espacial. Na versão atual o neuronavegador é capaz de operar com cinco tipos rastreadores, três deles da marca Polhemus (Colchester, EUA), baseado em ondas eletromagnéticas nos modelos ISOTRAK II, PATRIOT e FASTRAK; um rastreador óptico da marca Claron Technology, modelo MicronTracker MTC 3.5 (Toronto, Canadá) e um rastreador que utiliza ondas ultrassônicas da marca Zebris Medical GmbH, modelo CMS-20 (Achen, Alemanha). Todos eles retornam as posições da ponteira com seis graus de liberdade.

Tendo em vista que o crânio pode ser tratado como um corpo rígido, o corregistro se resume a um problema de mudança de coordenadas, no qual é preciso encontrar os valores da matriz mudança de base entre dois sistemas. Para tanto, consideramos que um sistema de coordenadas **E** representa os valores do rastreador espacial, com origem a posição central do emissor, e um sistema de coordenas **F** representa as posições dos pixels das imagens MPR, cuja origem se encontra no canto superior esquerdo da imagem (Figura 17).

Figura 17. Esquema da posição da origem dos sistemas de rastreio e da imagem. (a) O ponto em vermelho representa a origem do sistema do rastreador espacial; (b) as setas em vermelho representam os versores do sistema de coordenadas das imagens MPR.

A equação 6 traz a relação da mudança de coordenadas entre o sistema **E** e **F**:

$$X_E - O' = M.U_F \qquad (6)$$

$\mathbf{X_E}$ representa as coordenadas do vetor posição em relação ao rastreador, **O'** é a origem do sistema da imagem também em relação ao rastreador, **M** é a matriz de mudança de base e $\mathbf{U_F}$ são as coordenadas dos pontos na imagem no sistema **F**.

Um terceiro sistema de coordenadas (**H**) foi criado em relação ao crânio do voluntário, a partir de três pontos: os *tragus auriculares* direito e esquerdo e o osso nasal. Definimos então uma reta que passa pelos auriculares, em seguida, encontramos uma segunda reta, perpendicular a essa que passa pelo ponto do osso nasal. Por último, tomamos o produto vetorial do ponto de intersecção dessas duas retas a fim de gerar o terceiro eixo do sistema, perpendicular aos dois primeiros (Figura 18).

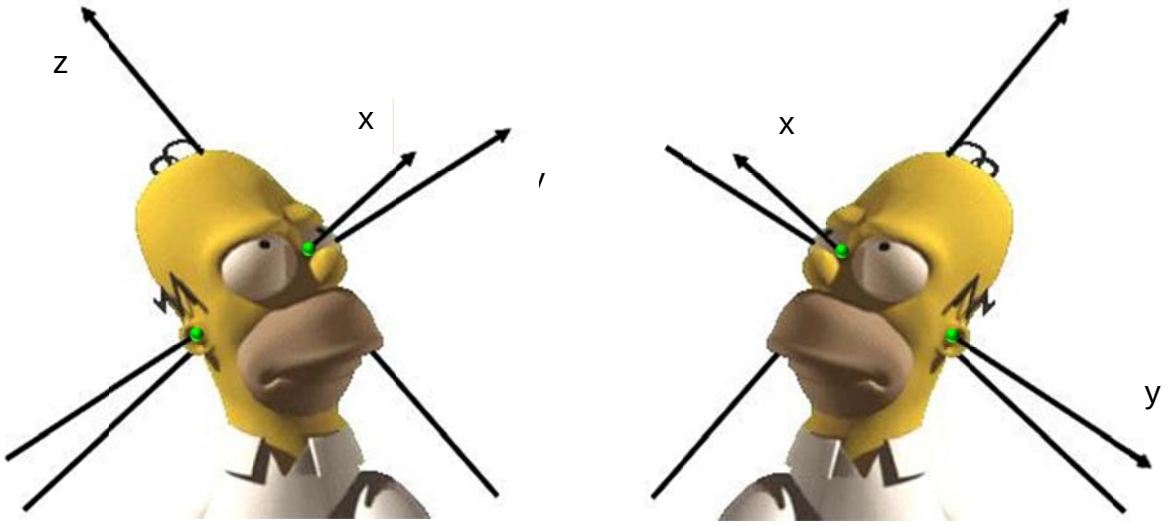


Figura 18. Esquema do sistema de coordenadas em relação ao crânio (setas), e dos 3 pontos fiduciais utilizados para o corregistro (pontos em verde), *tragus auriculare*s direito, esquerdo e depressão do osso nasal.

A partir dessa base pudemos determinar as posições relativas ao rastreador nas imagens fazendo uma transformada do rastreador para o sistema criado e do sistema criado para a imagem (Figura 19). Para facilitar a utilização do sistema de neuronavegação, criamos uma gráfica que é composta por quatro janelas, três paras as imagens sagital axial e coronal e a quarta para a reconstrução volumétrica do cérebro.

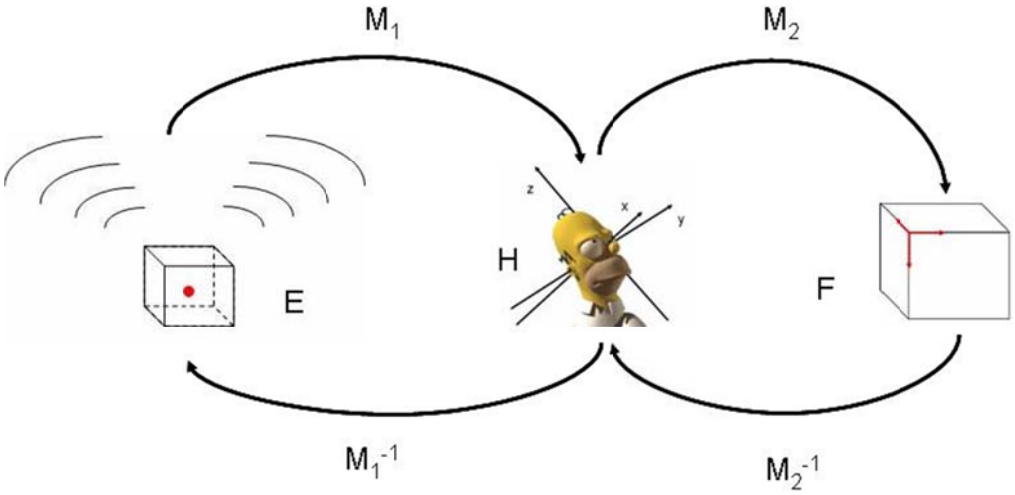


Figura 19. Esquema de corregistro das posições obtidas com o rastreador e as imagens de ressonância, sendo E, H e F as bases respectivas do rastreador, do crânio e das imagens; M1 e M2 são respectivamente as matrizes de mudança de base entre E e H e entre H e F; $M1^{-1}$ e $M2^{-1}$ são as matrizes inversas de M1 e M2.

4.1.3 Implementação da ferramenta de análise de MEP (*MEPHunter*)

A fim de retirarmos informações fisiológicas do MEP, como amplitude e latência, contidas nos sinais contínuos de EMG, desenvolvemos um conjunto de ferramentas computacionais, à qual demos o nome de MEPHunter. O objetivo principal desse programa é analisar simultaneamente os sinais provenientes de diversas regiões estimuladas por TMS para a criação de um mapa de amplitude de MEP.

As rotinas do *MEPHunter* foram escritas em Matlab 2009a, utilizando a ferramenta GUIDE (Graphical User Interface Development Environment) para a criação de interface gráfica, de modo que o programa se tornasse mais amigável para usuários que não tem familiaridade com linguagem de programação. O programa foi escrito em módulos de forma a facilitar a integração de novas ferramentas. Na versão atual ele é composto por uma unidade principal (MEPHunter_Main) e outras quatro unidades auxiliares: MEPHunter_Filter, MEPHunter_Processing, MEPHunter_View e MEPHunter_Export. A seguir descreveremos cada um desses módulos.

MEPHunter_Main

A interface principal do programa integra todas as outras funções. Nessa janela o usuário pode carregar o sinal de EMG. Atualmente, o *MEPHunter* suporta formatos ASCII e binários dos equipamentos *MyoSystem* e *BioPac*. Assim que o sinal é carregado ele pode ser observado em uma pré-visualização.

MEPHunter_Filter

Essa interface possui ferramentas de pré-processamento dos dados, por exemplo, ferramentas de exclusão de uma faixa do sinal selecionada pelo usuário, ou exclusão de sinais com amplitudes inferiores a um limiar determinado pelo usuário. O filtro de amplitude é uma

ferramenta que atribui valor nulo para todo sinal menor que determinado limiar indicado, e preserva todo sinal acima deste valor. Para ativar essa ferramenta o usuário deve clicar no botão “Filtro de Amplitude”. Um cursor irá aparecer e, clicando no botão esquerdo do mouse, o programa atribui o valor da amplitude onde o cursor se encontra ao limiar de amplitude. Da mesma forma, desenvolvemos uma ferramenta que rejeita uma faixa do sinal, atribuindo sinal com amplitude zero para toda aquela faixa. Para tanto, o usuário deve clicar no botão “Rejeita Faixa”, em seguida um cursor irá aparecer e o usuário deverá posicionar o cursor no início e no fim da região do sinal que ele deseja eliminar. É importante notar que quando utilizamos essas ferramentas, tanto o sinal quanto o ruído serão eliminados. Para resolver essa situação, criamos uma ferramenta para marcar a região do sinal que é de interesse e não deve ser eliminada. Por exemplo, o usuário pode utilizar a ferramenta de *zoom in* para diminuir a janela temporal, de forma que seja possível enxergar a forma de onda que define um MEP. Uma vez encontrado o MEP, marcadores devem ser posicionados no início e no final da faixa de interesse. Esses marcadores impedirão que aquele trecho do sinal seja alterado. Assim, as regiões que estão protegidas não irão ser eliminadas quando um filtro de amplitude ou rejeita faixa é aplicado.

MEPHunter_Processing

Essa interface agrupa todos as ferramentas de processamento do MEPHunter. Desenvolvemos 3 métodos para encontrar os MEPs, dois deles sem trigger e um deles com trigger. Utilizamos como trigger o artefato de TMS. Para realçar o artefato foi calculada a derivada do sinal, tendo em vista que o pulso de TMS dura em torno de 0,3 ms e apresenta componentes bem mais rápidas que o MEP. Passamos então um filtro de amplitude descrito na seção anterior e, em seguida o algoritmo procura por máximos locais, que representarão o pico do artefato. É essa posição temporal que é utilizada como referência do disparo do TMS.

Uma vez que os artefatos foram marcados, abrimos uma janela temporal com referência no artefato. Tipicamente, utilizamos uma janela de 10 ms a 50 ms. Sobrepomos, então, todas as janelas definidas pelo número de artefatos, e é calculada a média desses sinais, tanto para evitar a variação intraespecífica quanto para melhorar a SNR.

O programa também está preparado para encontrar a amplitude e a latência do MEP. Para determinar a amplitude, o algoritmo determinar automaticamente o máximo e o mínimo daquela janela temporal. Entretanto, pode ocorrer que o máximo de uma janela não coincida com o valor de pico do MEP. Assim caso a ferramenta automatizada falhe, o programa permite ao usuário determinar manualmente o pico e o vale do sinal, Da mesma forma, o usuário deve determinar manualmente o início e o final do MEP, para determinar o seu tempo de latência e o período.

Entretanto, algumas configurações de eletrodos e sistemas de baixa taxa de aquisição não permitem que o artefato do TMS seja captado no sinal de EMG. Para esses casos, desenvolvemos duas estratégias para encontrar a amplitude do MEP. A primeira estratégia está baseada na utilização de um filtro de amplitude no próprio sinal de MEP. Desse modo, o algoritmo marca o máximo do MEP, ao invés do pico do artefato de TMS. Uma vez encontrados os picos dos sinais de MEP, é criada uma janela temporal centrada no pico ($\pm$20ms). Em seguida, a mesma estratégia descrita anteriormente pode ser utilizada para encontrar a amplitude do MEP. O outro método para encontrar as amplitudes de MEP está baseado em um algoritmo de correlação cruzada. Nesse método o usuário deve utilizar a ferramenta de *zoom in* para encontrar um MEP representativo que será utilizado como referência, marcando o início e o final do sinal de interesse. Essa referência correrá todo o sinal a fim de encontrar outros segmentos correlacionados a ela. Em seguida, a determinação da amplitude do MEP será baseada nos mesmos métodos descritos anteriormente.

MEPHunter_View

Todas as etapas do processamento e pré-processamento são salvas em uma estrutura. Essa estrutura pode ser visualizada a qualquer momento na interface MEPHunter_View. Nela é possível visualizar cada MEP independentemente, o valor médio, a latência e a amplitude.

MEPHunter_Export

Essa interface foi criada para exportar os dados para um formato diferente, de forma que esses dados possam ser carregados em outros softwares de análise. Atualmente o MEPHunter_Export apenas permite exportar para o formato ASCII, mas é possível criar outros formatos que facilitem a interface com outros programas de análise.

4.1.4 Implementação da ferramenta de corregistro dos mapas de MEP e fMRI (TMSProjection)

Para fazer o corregistro dos mapas de MEP com os mapas de fMRI desenvolvemos o programa TMSProjection. O objetivo principal desse programa é encontrar as projeções nas fMRI das posições nas quais foram aplicadas os pulsos de TMS, digitalizadas por um neuronavegador.

Para iniciar o programa o usuário deve carregar as imagens de ressonância, tanto estrutural quanto funcional. Atualmente, o TMSProjection oferece suporte para imagens tipo Analyze e formato proprietário do BrainVoyager QX. O TMSProjection está equipado com uma série de ferramentas de transformadas de coordenadas para realizar o corregistro entre as imagens e os pontos do neuronavegador, bem como corrigir convenções de orientação, como, por exemplo, a Radiológica e a Neurológica. O programa conta com vários recursos gráficos, como transparência das superfícies, ocultar qualquer uma das imagens para melhor visualização de estruturas, *zoom* entre outras.

Devem ser carregadas também as informações das posições que foram realizados os estímulos magnéticos e é opcional carregar um arquivo que contenha as posições da superfície da cabeça do indivíduo, proveniente de uma varredura do escalpo pela sonda do neuronavegador. Esses pontos provenientes da varredura podem ser compreendidos como a digitalização da superfície do escapo e face do indivíduo e são utilizados para aprimorar o corregistro das MRI com a posição real da cabeça dos indivíduos.

Tanto o arquivo que traz a informação das posições de estimulação, quanto os pontos de varredura utilizados para alinhamento fino, devem estar em formato ASCII. Por fim, deve-se carregar o mapa de TMS, previamente construído pelo MEPHunter.

Quando todos os arquivos forem carregados, é possível visualizar a reconstrução volumétrica da imagem de ressonância estrutural, o mapa funcional e os pontos onde foram realizados a TMS, bem como os pontos para alinhamento. Por exemplo, o botão "Projeção" dispara a rotina que irá fazer a projeção dos postos do neuronavegador sobre o mapa funcional. Para tanto, calculamos o centro de massa do volume do mapa funcional, e encontramos o versor diretor de cada ponto que recebeu o estímulo de TMS ao centro de massa. Fazemos então incrementos de 1 mm no sentido do versor diretor partindo dos pontos a ser projetado até que ele encontre a borda do volume do mapa funcional.

4.2 Aplicação em Pacientes com AVC

4.2.1 População de Estudo

A amostra estudada foi composta por um grupo de 12 pacientes, de ambos os sexos, com hemiparesia de predomínio braquial por AVC isquêmico, confirmadas por laudo médico e exames de neuroimageam. Os pacientes foram recrutados a partir do Registro de Acidente Vascular Encefálico de Ribeirão Preto (REAVER), que é um registro prospectivo contínuo de

pacientes com AVC admitidos na Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Pesquisa clínica aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP e da FMRP-USP processo Nº 15347/2005). Neste registro, todos os pacientes são submetidos à avaliação clínica utilizando a versão traduzida e validada da *National Institute of Health Stroke Scale* (NIHSS) (CINCURA *et al*., 2009).

Além dos pacientes descritos no parágrafo anterior, recrutamos 10 voluntários assintomáticos, pareados por idade com o grupo de pacientes, para fazer parte do grupo controle.

Critérios de Inclusão (Pacientes):

- Apresentar idade superior a 18 anos e inferior a 70;
- Tempo de diagnóstico clínico de AVC isquêmico (5 a 24 meses);
- Apresentar lesão cerebral única;
- Estar estável clinicamente (PA controlada);
- Presença de hipertonia elástica em membro superior direito;
- Ausência de comprometimento cognitivo (Afasias, negligência);
- Tônus dos músculos flexores de punho com *Ashworth* grau 1 a 3;
- Ter amplitude de movimento passiva de extensão de punho mínima de 10°.

Critérios de Exclusão (Pacientes):

- Apresentar qualquer cardiopatia pré-existente;
- Apresentar qualquer forma de desconforto durante os testes, que crie impedimento no prosseguimento do experimento;
- Apresentar qualquer implante metálico (marcapasso, pinos e/ou farafusos, implante coclear, etc.) no interior do corpo;

- Ter sido submetido à aplicação de Toxina Botulínica nos músculos espásticos nos últimos oito meses;
- Ter usado medicação oral antiespástica nas últimas 72 horas;
- Outros tipos de acometimento concorrentes (problemas ortopédicos, reumatológicos, epilepsia, sinais neurológicos cerebelares, parkinsonismo distonia, perda auditiva).

4.2.2 Equipamentos utilizados

Foram utilizados os seguintes equipamentos para a realização desta etapa do trabalho:

- Um sistema de estimulação magnética transcraniana modelo MagPro (Farum, Dinamarca) capaz de produzir pulsos de campo magnético de até 2T em regime de pulso único, e produzem rTMS com frequências de até 30Hz. Em todos os experimentos foi utilizada a bobina "em forma de 8" com raio maior de 20 cm e raio menor de 10 cm, como refrigeração interna.
- Um eletroestimulador desenvolvido no Laboratório de Instrumentação Biomédica do Programa de Engenharia Biomédica da COPPE/UFRJ, cujo objetivo é única e exclusivamente dedicado a aplicações de ordem terapêutica e que segue as normas de segurança elétrica determinadas pela NBR IEC 601-1 sendo estas testadas durante o processo de desenvolvimento.
- Um sistema de eletromiografia (EMG) com amplificadores BIOPAC (BIOPAC system, Inc., EUA), com banda de frequência limitada entre 10 e 5000 Hz e ganho total de 2000. Para a aquisição dos sinais de EMG foram utilizados eletrodos de superfície de Prata-Cloreto de Prata (Ag-AgCl) da BIOPAC.
- Um tomógrafo de ressonância magnética Philips 3.0 T Achieva (Philips, Best, Holanda), utilizando uma bobina de crânio SENSE de 8 canais.

4.2.3 Protocolo de aquisição da fMRI

O protocolo de aquisição da fMRI seguiu desenho do tipo ER e foi composto por 5 períodos de movimento de abrir e fechar da mão, com duração de 6 segundos cada, intercalados por 6 períodos de repouso, com duração de 16 segundos cada. O início e o fim de cada período de movimentação foram marcados por uma gravação de voz humana de forma sincronizada ao primeiro pulso de radiofrequência do volume desejado, utilizando uma ligação direta, na qual o computador que controla o tomógrafo emite um pulso do tipo TTL (*Transistor-Transistor Logic*) para o programa (Presentation 12.1) que o reconhece como disparador do estímulo.

O protocolo foi realizado primeiramente com o membro superior não-parético, seguido do membro superior parético. Todo o exame de fMRI foi filmado, em todos os pacientes.

As imagens anatômicas foram adquiridas utilizando uma sequência do tipo gradiente eco, ponderada em T1 de 180 fatias de 1 mm cada com TR de 6.7 ms, TE de 3.1 ms, ângulo de *flip* de 8º, matriz de aquisição de 256 X 256, FOV = 256 mm, dimensão do voxel de 1mm x 1mm x 1mm e SENSE igual a 1.

As imagens funcionais foram adquiridas utilizando uma sequência do tipo ecoplanar (EPI – *Echo Plannar Imaging*), cobrindo ambos os hemisférios cerebrais, com os seguintes parâmetros: TR de 2000 ms, TE de 30 ms, ângulo de *flip* de 90º, matriz de aquisição de 64 x 64, FOV = 230 mm, 21 fatias com espessura de 4 mm cada e SENSE igual a 2. A aquisição das imagens demorou 2 minutos e 06 segundos para cada membro superior, em um total de 12 minutos incluindo a aquisição das imagens estruturais.

4.2.4 Comparação dos mapas de TMS e fMRI

⇨ **Análise das fMRI para mapeamento do córtex motor**

O pré-processamento das imagens funcionais consistiu de correção temporal entre fatias, aplicação de filtro temporal (passa alta de 0.01 Hz) e suavização espacial (utilizando filtro gaussiano com FWHM de 4 mm), além da correção de movimento.

Para encontrar a resposta modulada pelo protocolo, as imagens funcionais foram corregistradas com as imagens estruturais e, então, foi utilizado o Modelo Linear Geral (*General Linear Model* – GLM) para cada paciente, utilizando com limiar estatístico um FDR menor que 0.05.

Todo o processo de pré-processamento e análise das imagens foram realizadas no programa comercial Brain Voyager ™ QX versão 2.3 (Maastrich, Holanda).

⇨ **Mapeamento do córtex motor por TMS**

Para facilitar o posicionamento da bobina sobre o escalpo desenvolvemos um sistema de coordenadas para o crânio dos voluntários. Esse sistema consiste de uma touca com a impressão de uma grade com espaçamento de 1 cm (Figura 20).

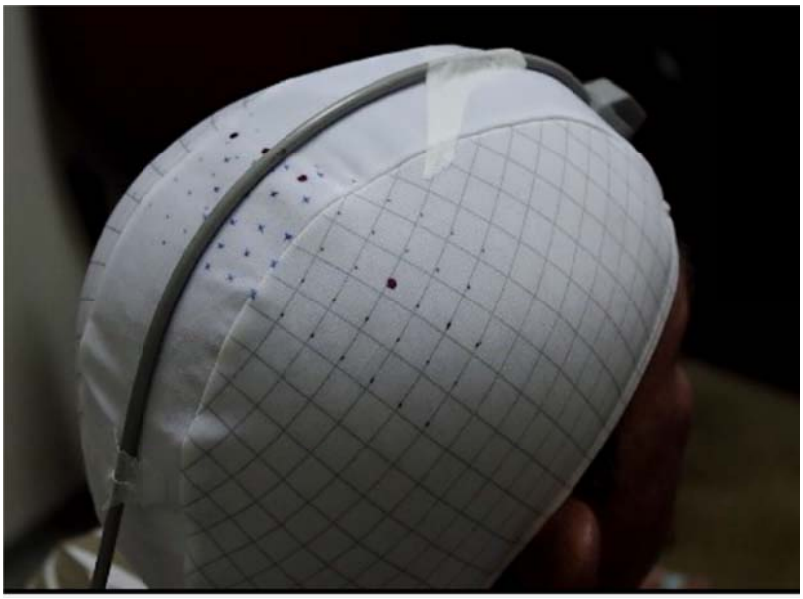


Figura 20. Fotografia de um voluntário usando a toca com a grade para posicionamento da bobina e com a sonda do rastreador espacial fixa na cabeça para realizar a neuronavegação. O ponto em vermelho na lateral da cabeça representa a posição do *hot spot*.

Os pacientes foram orientados a sentarem-se em uma poltrona confortável, vestir a touca e, então foram posicionados eletrodos de EMG circulares de superfície, nos músculos Abdutor Curto do Polegar das mãos sadia e parética; Extensor e Flexor Radial do Carpo do braço parético. Em seguida, realizamos os protocolos de corregistro da cabeça dos pacientes com suas respectivas das neuroimagem utilizando o neuronavegador. Fizemos varreduras sobre o escalpo dos pacientes para facilitar a determinação do *hot spot* em relação ao Abdutor do Polegar (Conforto, A. B., Z'graggen, W. J. *et al.*, 2004). Em cada voluntário marcamos pontos na touca em forma de uma matriz 5 x 5, sendo que cada ponto distava 1 cm dos seus primeiros vizinhos, tendo o *hot spot* como elemento central.

Utilizando o neuronavegador novamente, registramos as posições de cada ponto marcado na touca em relação à respectiva fMRI de modo a relacionar a intensidade do MEP a determinada região cortical.

Antes de iniciar o mapeamento, aplicamos sobre o *hot spot* pulsos magnéticos para encontrarmos o limiar motor de cada voluntário, o qual consideramos a intensidade mínima necessária de campo magnético para causar 5 MEPs para cada 10 estimulações (Conforto, A. B., Z'graggen, W. J. *et al.*, 2004).

Em seguida ajustamos o aparelho para 120% do limiar motor e aplicamos 10 pulsos sobre cada ponto marcado, sobre os quais fizemos uma média dos MEP produzidos a fim de construir um mapa para posterior comparação com o respectivo mapa de fMRI.

Todo o processamento do sinal do EMG foi realizado no software MEPHunter e o corregistro dos mapas de fMRI com os mapas de MEP foi realizado pelo software TMSProjection.

Para a criação do mapa bidimensional 5x5 pixels do córtex motor, utilizando o programa TMSProjection para fazer uma média dos valores do volume da fMRI vizinhas ao ponto de projeção relativa à posição que recebeu a TMS. Como nessa aplicação utilizamos

um espaçamento de 1 cm entre as posições estimuladas, o ponto projetado na fMRI deve se tornar o elemento central de uma matriz 9x9x9, sendo as outras células preenchidas com os valores dos seus vizinhos correspondentes, o que proporciona uma região com seção transversal de aproximadamente 1cm^2. Fizemos então uma média dos valores não nulos, e esse valor foi alocado em uma das posições da matriz projeção 5x5, para ser posteriormente comparada com o mapa de TMS.

⇨ **Análise das características dos mapas motores por fMRI e TMS**

Nesse estudo nós avaliamos três características dos mapas, a entropia, o valor máximo (apenas para as fMRI) e o número de ocorrências de elementos acima do limiar.

A entropia é uma grandeza física que mensura o quanto um sistema se encontra desorganizado. Essa medida pode ser utilizada para se ter uma ideia da quantidade elementos aleatórios compões um arranjo, por exemplo uma imagem. Como a resolução espacial dos mapas de fMRI e MEP são diferentes, optamos por fazer a análise de entropia tanto nos valores de projeção que tem a mesma resolução dos mapas de MEP (5x5 pixels), quanto nos mapas nativos (50x50 pixels), apenas selecionando a região de interesse.

Para a determinar a entropia utilizamos a equação 7:

$$S = -\sum (n \log_2 n) \qquad (7)$$

sendo que n é a frequência de ocorrência normalizada do brilho no histograma do mapa. Para esse estudo foram utilizados 256 intervalos no histograma.

As demais análises foram feitas com o mapa de projeção, para manter a mesma resolução dos mapas de MEP (5x5 pixels de 1 cm^2).

Medimos então, os valores máximos de β, que são os parâmetros que ponderam os regressores para se ajustarem ao modelo experimental (equação 5). Não realizamos a medida de valor máximo de MEP nos mapas de TMS porque a variabilidade entre os indivíduos é muito grande, não permitindo assim comparações dos valores absolutos, mas apenas dos valores normalizados.

Por fim, medimos o número de ocorrência de elementos que apresentavam valores acima de um limiar. Para os mapas de fMRI eliminamos os elementos que apresentavam um p-valor abaixo de 0.001, e para os mapas de TMS, eliminamos todos os elementos que possuíam MEP com intensidade inferior à 50μV.

⇨ **Análise das comparações entre os mapas motores por fMRI e TMS**

Fizemos três análises para a comparação dos mapas, sendo elas o valor de correlação cruzada bidimensional, a distância entre os máximos e por fim o número de coincidências de valores não nulos.

Para determinar o valor do coeficiente de correlação cruzada bidimensional utilizamos a equação 8:

$$r = \frac{\sum_m \sum_n (A_{mn} - \bar{A})(B_{mn} - \bar{B})}{\sqrt{(\sum_m \sum_n (A_{mn} - A)^2)(\sum_m \sum_n (B_{mn} - \bar{B})^2)}} \qquad (8)$$

Sendo r o coeficiente de correlação, e A e B os mapas a serem comparados.

A distância entre os máximos (pico-pico) foi calculada a partir da distância euclidiana entre a posição onde ocorreu o máximo da fMRI e a posição onde ocorreu o máximo no mapa de TMS.

Para determinarmos as posições que apresentaram resposta tanto nos mapas de fMRI quanto nos mapas de TMS, realizamos um cálculo de intersecção do tipo “AND”, no qual são

contadas as coincidências dos valores não nulos. Para tanto, transformamos os elementos dos mapas em valores binários, fazendo com que todos os valores acima do limiar valessem 1, e os abaixo, zero.

Por fim, calculamos a razão do número de valores não nulos nos mapas de fMRI e TMS dos sujeitos controle e do hemisfério sadio dos pacientes pelo valores não nulos dos mapas de fMRI e TMS do hemisfério com a lesão dos pacientes. A equação 9 resume a sentença acima:

$$R = \frac{Nf_j \cdot NM_j}{Nf_i \cdot NM_i}, \qquad (9)$$

sendo Nf o número de ocorrências nas fMRI (fig 1d) e NM o número de ocorrências nos mapas de MEP (fig 2b), e o índice i corresponde aos resultados do hemisfério ipsilesional dos pacientes, enquanto o índice j ao hemisfério contralesional dos pacientes ou sujeitos controle.

4.2.5 Avaliação dos efeitos da SES por TMS

Para a comparação dos efeitos da SES sobre a facilitação ou inibição dos músculos estudados, dados de TMS foram adquiridos antes e após a SES. Esse protocolo consistiu na aplicação de uma sequência de 10 estímulos no *hot spot*, separados por intervalos de tempo aleatórios (entre 5 e 10s), sendo a média da amplitude destes considerada para análise. A intensidade do estímulo foi definida em 120% do limiar motor de cada sujeito. Esta avaliação foi realizada imediatamente antes e imediatamente após a SES.

Para determinar a intensidade da SES, aumentamos a corrente nominal do equipamento até o limiar de produção de movimento. Quando esse limiar foi encontrado, pedíamos aos voluntários para permanecerem com o antebraço em repouso, apoiado sobre o travesseiro. Com base nos resultados no estudo anterior (Garcia, 2011), a frequência aplicada

foi de 3 Hz. O estímulo elétrico foi composto por onda bifásica assimétrica e com largura de pulso de 500 µs. O tempo de estimulação foi de 30 minutos sem interrupção. Os eletrodos foram colocados sobre o ventre muscular do flexor radial do carpo, como mostrados na Figura 21.

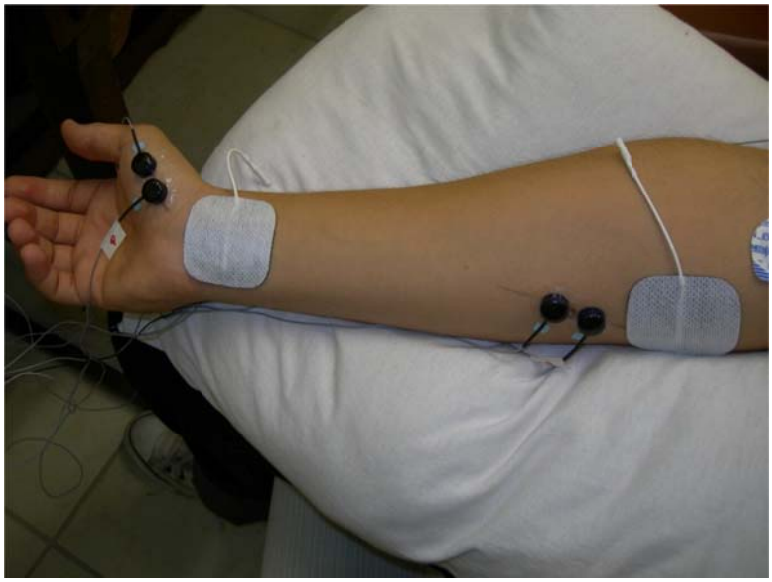


Figura 21. Posicionamento dos eletrodos de estimulação (retangulares e brancos) sobre o antebraço direito. Os eletrodos circulares pretos referem-se aos de EMG, e estão posicionados no ventre dos músculos abdutor curto do polegar e flexor radial do carpo.

4.2.6 Avaliação dos efeitos da SES por fMRI em indivíduos assintomáticos

A fim de realizarmos uma avaliação dos efeitos da SES sobre a modulação da resposta hemodinâmica das regiões corticais motoras, nós adquirimos fMRI antes e imediatamente após a aplicação da SES em oito indivíduos assintomáticos (dois foram excluídos).

Os protocolos utilizados nesse experimento foram os seguintes:

Determinamos a intensidade da SES, aumentando a corrente nominal do equipamento até o limiar de produção de movimento. Quando esse limiar foi encontrado, pedíamos aos voluntários para permanecerem com o antebraço em repouso, apoiado sobre o travesseiro. Com base nos resultados no estudo anterior (Garcia, 2011), a frequência aplicada foi de 3 Hz.

O estímulo elétrico foi composto por onda bifásica assimétrica e com largura de pulso de 500 µs. O tempo de estimulação foi de 30 minutos sem interrupção. Os eletrodos foram colocados sobre o ventre muscular do flexor radial do carpo de um dos membros selecionados aleatoriamente, independentemente da dominância do membro do indivíduo. Um exemplo do posicionamento dos eletrodos é mostrado na Figura 21.

Realizamos então quatro aquisições de fMRI para cada indivíduo, divididas em dois grupos: (i) antes e (ii) após a SES. Em cada bloco foram realizadas aquisições com tarefa do membro estimulado e do não estimulado. Desse modo, 4 baterias de exame de fMRI foram adquiridos: (1) pré-SES com tarefa de movimento da mão estimulada; (2) pré-SES com tarefa de movimento da mão não estimulada; (3) pós-SES com tarefa de movimento da mão estimulada; (4) pós-SES com tarefa de movimento da mão não estimulada.

Para realizar a avaliação de alterações nós utilizamos uma análise de grupo do GLM com limiar de FDR = 0,05 (Taxa de Falsa Descoberta, do inglês: *False Discovery Rate*), e fizemos uma análise por VOI relativa as áreas de Brodmann de 1 à 6. Realizamos também um processamento estatístico diferente do convencional, que visa avaliar características da função da resposta hemodinâmica (HRF, do inglês: *hemodynamic response function*), em especial quando o protocolo experimental é evento-relacionado. Dentre as possibilidades, optamos por utilizar o algoritmo conhecido por Mapeamento de latência de BOLD (BLM, do inglês: *BOLD Latency Mapping*) (Leoni, Mazzeto-Betti *et al.*, 2008) para realizar medidas quantitativas da resposta BOLD. Esse algoritmo utiliza um método autorregressivo que estima quatro parâmetros do sinal: (a) tempo de início da resposta (*onset*), (b) tempo ao pico, (c) largura a meia altura e (d) amplitude do sinal.

A estimativa dos parâmetros é baseada em um ajuste pseudotrapezoidal com uma linha de base inicial e outra final (Figura 22). Esse método fornece uma estimativa para cada repetição da condição selecionada, isto é, fornece os valores estimados de cada parâmetro

para cada resposta, de todas as séries temporais estudadas. Nessa análise também utilizamos como limiar FDR = 0,05.

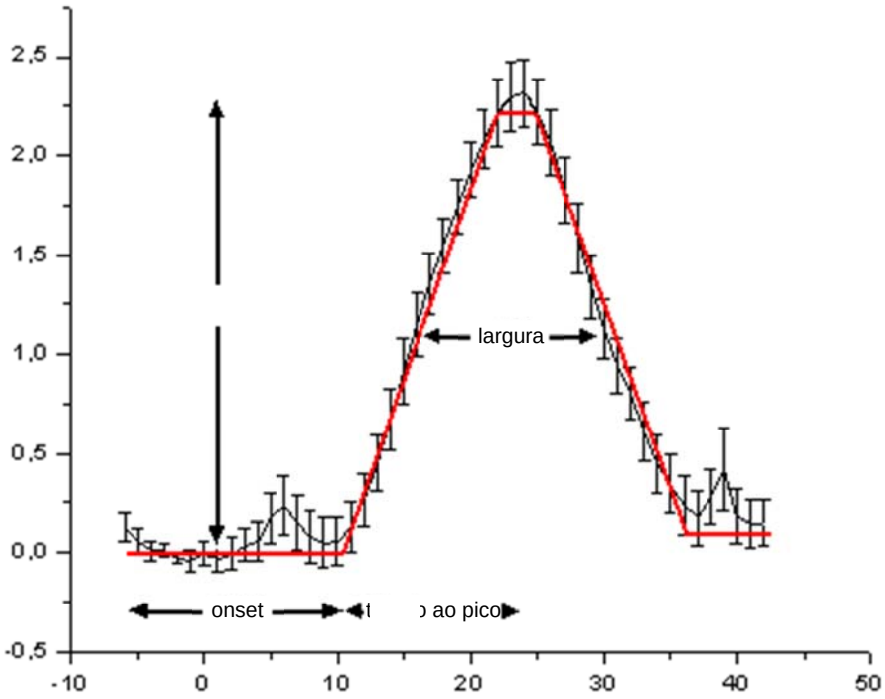


Figura 22. Ajuste trapezoidal (em vermelho) de uma evolução temporal média. O modelo inclui a linha de base até o início da resposta, um platô, e um retorno à linha de base. Quatro variáveis são fornecidas: tempo até o início da resposta, tempo ao pico, largura à meia altura e amplitude.

4.2.7 Teste estatísticos utilizados

Realizamos em todas as amostras o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, nas amostras que passaram no teste, utilizamos o *t de student* para coparação. Nas amostras que não passaram no teste de normalidade aplicamos o teste de hipótese não paramétrico *Mann-Whitney (teste U)*. Nas amostras que conhecíamos a direção da alteração, aplicamos o teste unicaldal. Já nas amostras que não conhecíamos a direção das alterações utilizamos o teste bicaldal.

Resultados e Discussão

5.1 Desenvolvimento tecnológico

5.1.1 Mapeamento espacial do campo magnético e confecções de novas geometrias de bobinas de TMS

Nessa sessão apresentamos os resultados do mapeamento de campo por imagens de fase de GRE. O resultado relevante dessa parte do trabalho é a determinação da distribuição espacial do campo magnético produzido pela bobina de EMT, pois com essa técnica é impossível realizar medicas de caracterização temporal e magnitude do pulso de TMS, medidas inclusive já realizadas por nosso grupo em trabalhos anteriores utilizando outras técnicas (Peres, 2008). Como a distribuição do campo deve se manter a mesma independente da sua magnitude, os mapas de distribuição espacial, aqui demonstrados, podem ser extrapolados para a os pulsos de campos magnéticos do TMS. Como a intensão desse trabalho era não apenas gerar protocolos que pudessem realizar o mapeamento do campo magnético com MRI de fase, mas também conhecer as propriedades físicas da TMS, então demos um passo além e fizemos medidas da distribuição do campo magnético em um fantoma de cabeça e um voluntário saudável. Além disso, uma vez que dominamos essa técnica realizamos medidas em novas geometrias de bobinas de TMS.

A Figura 23 traz as imagens de fase ainda empacotadas no intervalo de $-\pi$ a π, e os seus respectivos mapas de campo depois da aplicação dos algoritmos de desempacotamento.

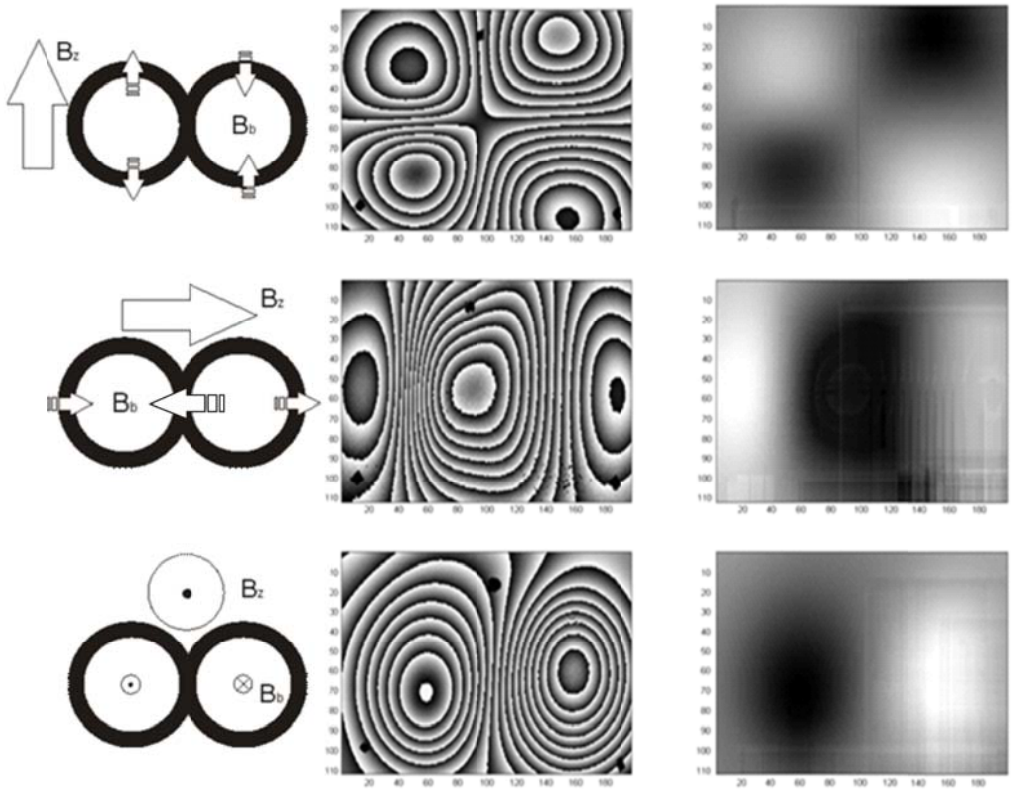


Figura 23. Os esquemas da primeira coluna representam os posicionamentos da bobina de TMS em relação ao campo estático da ressonância (B_z), sendo B_b as componentes do campo da bobina de TMS paralelos ao B_z. Ao centro, imagens de fase empacotadas representativas do campo magnético produzido por uma bobina de TMS em forma de oito, e os respectivos mapas de campo (direita). O FOV das imagens é de 110x200mm^2.

Uma vez encontradas as componentes do campo magnético produzidas pela bobina, foi realizada sua representação vetorial. A Figura 24 mostra o mapa vetorial da bobina em forma de oito de um plano a aproximadamente 2 cm da superfície da bobina.

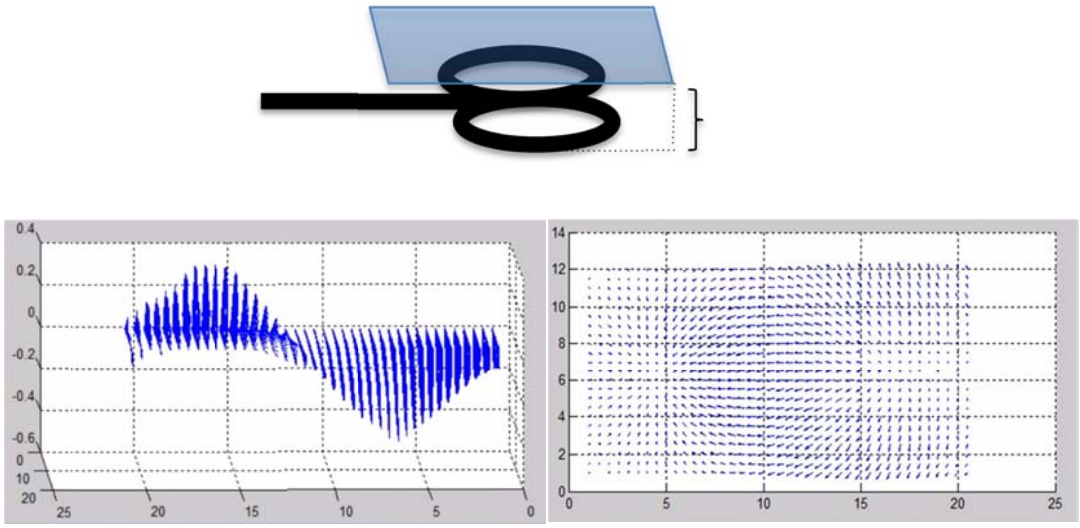


Figura 24 Mapa do vetor campo magnético relativo à bobina em forma de oito de uma superfície paralela à face da bobina distante aproximadamente 2 cm. A escala é dada em centímetros.

Outra forma de visualização do campo magnético produzido pela bobina em forma de 8 está apresentada na Figura 25. Essa figura traz o mapa volumétrico de magnitude, no qual os valores das amplitudes dos diversos cortes são empilhados e mostrados em um volume. Os tons mais claros representam maiores intensidades do campo magnético.

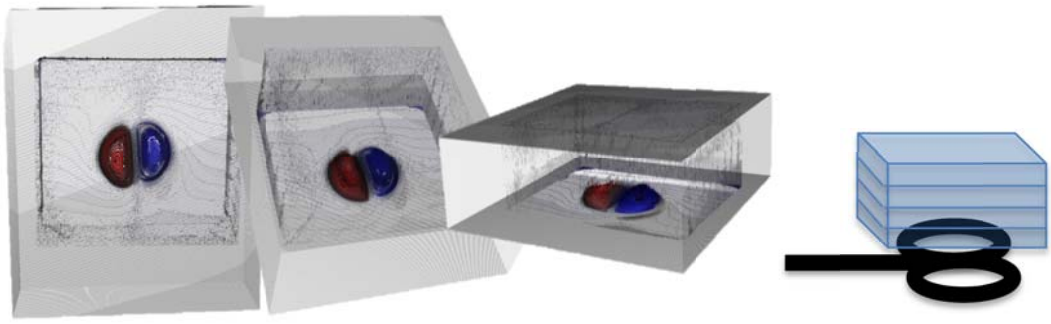


Figura 25. Mapa volumétrico de magnitude do campo magnético produzido pela bobina em forma de 8. O esquema à direita representa como foram feita as aquisições das imagens de MRI.

A Figura 26 mostra as imagens empacotadas, do fantoma de cabeça (Figura 26a) e do indivíduo saudável (Figura 26b). Ambos estavam sujeitos à ação do campo magnético da bobina em forma de oito, e as medidas foram realizadas de acordo com o descrito na seção 3.2.1.

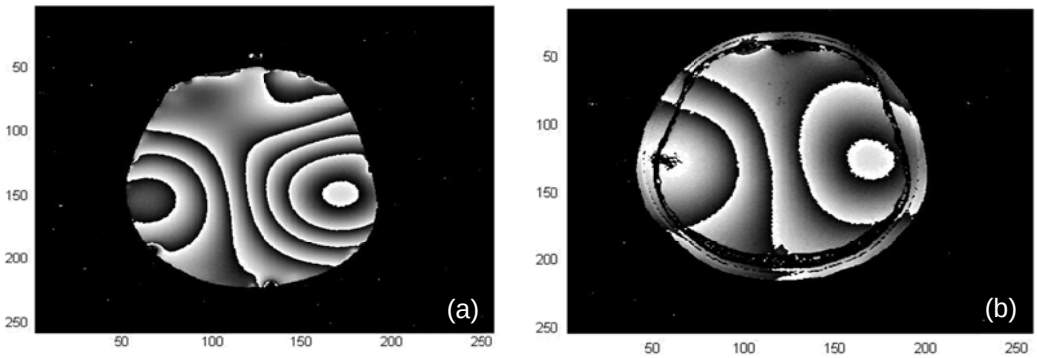


Figura 26. (a) Imagens da fase empacotadas dentro do fantoma de cabeça preenchido com solução de $CuSO_4$ (b) e no cérebro do voluntário submetidos a um campo magnético produzido por uma bobina em forma de 8 posicionada no vértice craniano (VC). O FOV das imagens é de 256x256mm^2.

Embora as imagens da Figura 26 sigam um mesmo padrão, podemos notar que existe um maior número de fases no mapa do fantoma (Figura 26a) do que no mapa do cérebro humano (Figura 26b), que nos faz concluir que existe uma maior intensidade de campo magnético no fantoma do que no cérebro no corte mostrado. Levando em conta que os meios são diferentes, com propriedades ligeiramente distintas, podemos dizer que o fantoma utilizado é um bom modelo, e que as distorções no campo magnético causadas pelas estruturas da cabeça são mínimas.

Fazendo uma comparação com resultados encontrados na literatura, os protocolos que nós desenvolvemos neste trabalho produziram resultados similares aos encontrados por Hernadez-Garcia (Hernandez-Garcia, Lee *et al.*, 2007), no que se diz respeito à distribuição de campo magnético em um meio homogêneo e dentro do tecido cerebral de um indivíduo saudável. Em ambos os trabalhos é possível notar que existe fluxo magnético em sentidos opostos em cada enrolamento circular da bobina em forma de 8. Além disso, é possível observar que a magnitude do campo magnético diminui do centro para as bordas do enrolamento.

A comparação é ainda mais interessante quando confrontamos os resultados da distribuição de campo magnético por MRI de fase, com os mapas de distribuição de campo realizados com um pequeno indutor de varredura, obtidos por nosso grupo em trabalhos anteriores (Peres, 2008). A técnica do indutor de varredura permite mapear a distribuição do campo magnético do pulso de TMS, bem como a sua magnitude real e sua distribuição de campo, entretanto com o custo de uma resolução espacial menor, grande tempo de aquisição e inviabilidade de criação de mapas vetoriais. A Figura 27 traz a distribuição do campo magnético tanto para as medidas de MRI de fase, no qual foi utilizada uma fonte dc de 1.12 A, bem como a distribuição para as medidas realizadas com o indutor de varredura.

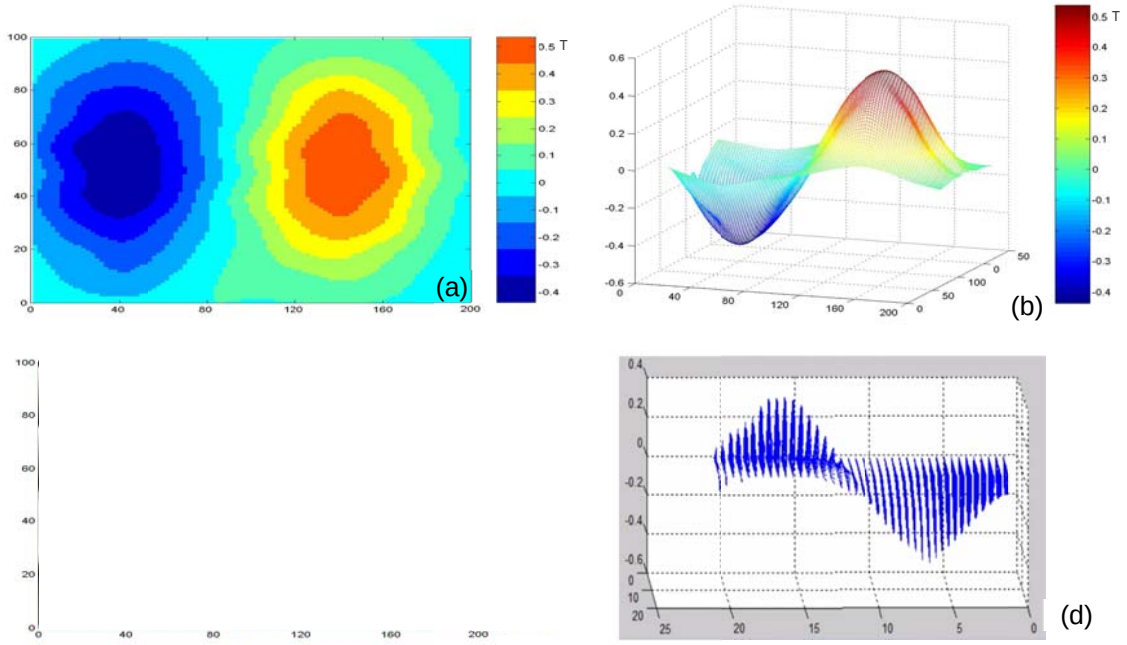


Figura 27. Comparação dos mapas de distribuição espacial da bobina de TMS em forma de 8, de 10x20cm^2, da marca Neurosoft, pelas técnicas de MRI de fase e indutor de varredura. (a) Curvas de nível da distribuição da componente z do pulso de campo magnético produzido pelo aparelho de TMS medido com indutor, a escala de cores é referente à intensidade do campo e é dada em Teslas (T). (b) Representação tridimensional da distribuição da componente z do pulso de campo magnético produzido pelo aparelho de TMS medido com indutor, a escala de cores é referente à intensidade do campo e é dada em Teslas (T). (c) Imagens de fase da distribuição da componente z do campo magnético produzido por uma corrente dc de 1.12A. (d) Representação tridimensional da distribuição do campo magnético produzido por uma corrente dc de 1.12A e medidos com MRI de fase.

Embora não tenhamos realizado nenhum teste de correlação entre os mapas obtidos pelas MRI e pelo indutor, é nítida a semelhança entre eles. Essa constatação confirma, então, que a extrapolação dos resultados obtidos pelo mapeamento de campo magnético utilizando as MRI de fase para os pulsos de TMS é válida.

Vale ainda ressaltar que a maior dificuldade encontrada nesse estudo foi determinar a intensidade do campo magnético dc necessário para a realização das medidas de GRE. O campo magnético dessas bobinas decai muito rapidamente com a distância, assim a faixa na qual é possível se fazer medidas de inomogeneidade de campo se resume a poucos centímetros. Essa faixa é ainda reduzida com a diminuição das dimensões da bobina, pois o campo magnético diverge ainda mais rapidamente.

O problema poderia ser solucionado aumentando-se a corrente nas bobinas, tornando assim o campo magnético mais intenso. Entretanto, quando o campo se torna muito intenso, ele destrói por completo o sinal, dessa forma impossibilitando qualquer medida. Assim, a escolha da magnitude do campo magnético, determinado pela corrente que passa pelas bobinas, é crucial para selecionar qual região deve ser mapeada.

Desenvolvimento de novas arquiteturas de bobinas para TMS

A figura 28 traz a fotografia e a respectiva distribuição espacial das componentes *z* das bobinas de estimulação desenvolvidas em nossos laboratórios. Optamos por demonstrar apenas a distribuição espacial desta componente para facilitar a visualização, uma vez que a componente *z* (normal à face da bobina) é muito maior que as demais, na região de interesse.

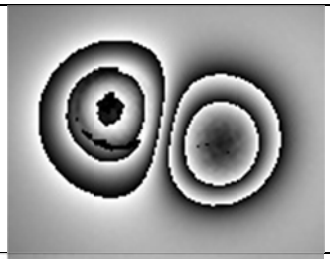
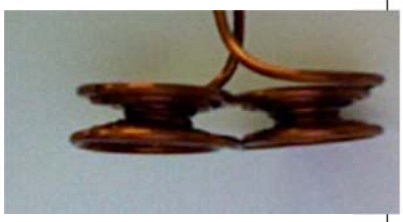
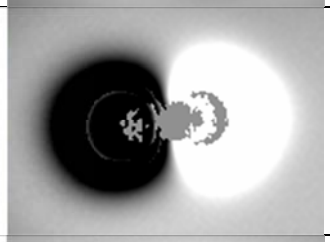
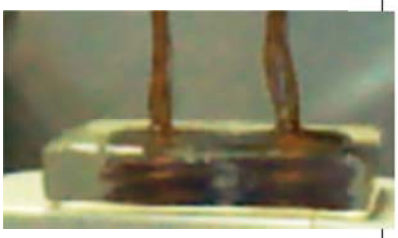
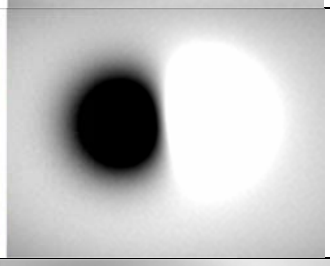
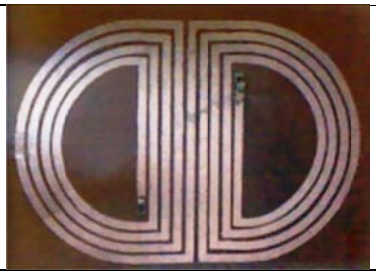
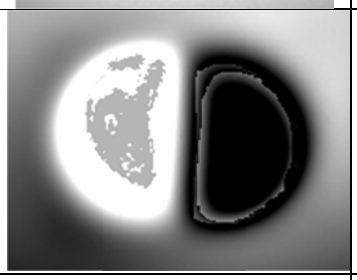
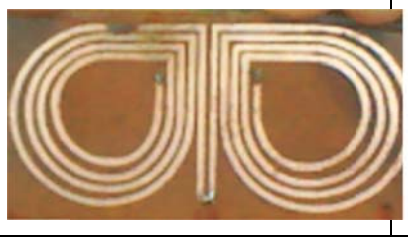
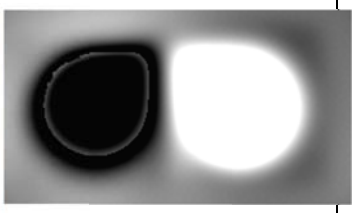
Tipo de Bobina	Fotografia	Mapa de Campo	Fluxgate 1A	Indutor 100%
8 simples			0,11G	2,13V
8 dupla			-	-
8 múltipla			0,25G	1,58V
D grande			0,47G	-
MA1			0,40G	-

Figura 28. Novas conformações de bobinas e suas respectivas distribuições da componente de campo magnético perpendicular ao plano da superfície.

Lembrando que a bobina em forma de 8 da marca neurosoft, com dimensões 10x20cm2, produziu 0,3G quando percorrido por uma corrente de 1A medidos com o fluxgate e induziu um força eletromotriz de 0,414V em um indutor circular de uma espira com raio de 4mm, quando o pulso foi disparado pelo equipamento de TMS a 100%.

Como podemos notar, todas as geometrias são variações da bobina em forma de 8, com isso a diferença fundamental na distribuição do campo se dá na região de alto gradiente, na junção entre as duas asas. Se observarmos a bobina em forma de "D grande", por exemplo, ela apresenta simetria linear na junção das bobinas, o que justifica sua aplicação em nervos periféricos, enquanto que a bobina em forma de 8 simples apresenta simetria mais pontual na junção das asas, com isso uma aplicação interessante seria em pequenos animais.

Em um primeiro momento, analisamos o perfil do campo magnético gerado por todas essas conformações pelo método de MRI e pelo *fluxgate*, utilizando uma fonte de corrente contínua. Em seguida, tendo em vista que vislumbra-se a utilização dessas bobinas acopladas a um aparelho de TMS, realizamos alguns testes com as bobinas 8 simples, 8 dupla e 8 múltipla ligadas à fonte do aparelho de TMS. Nesse experimento as bobinas foram sujeitas a um pulso com tensão de pico da ordem de quilovolt (kV) e duração de aproximadamente 300µs. Todas as bobinas suportaram bem a carga, sendo possível realizar 5 estimulações, em média, com cada um delas, antes de atingirem o regime de superaquecimento.

A bobina 8 simples apresentou as maiores intensidades de campo elétrico induzido. Por outro lado, as bobinas com múltiplos enrolamentos apresentaram indução fraca, provavelmente porque o acoplamento das múltiplas camadas de enrolamento fizeram com que ocorresse diminuição da intensidade do campo magnético total, bem como a variação do fluxo magnético. Descartamos então todas as conformações que usavam mais de uma camada de enrolamento e demos mais atenção para a bobina 8 simples.

Fizemos então um teste em ratos com a intensão de avaliar se essa bobina era capaz de estimular o córtex do animal. Foram evocados potenciais motores, avaliados por observação visual da contração involuntária tanto das patas anteriores quanto das posteriores. Entretanto,

infelizmente a presença de artefatos nos registros de MEP foi significativa, em decorrência da fonte utilizada (Neurosoft), que produz muito ruído na recarga de seus capacitores.

Desse modo, para o registro do MEP foi testada uma bobina cônica de humanos modelo Magpro, da marca Magventure, bem menos ruidosa que o aparelho da NeuroSoft. A montagem experimental e o sinal de EMG podem ser visualizados na Figura 29.

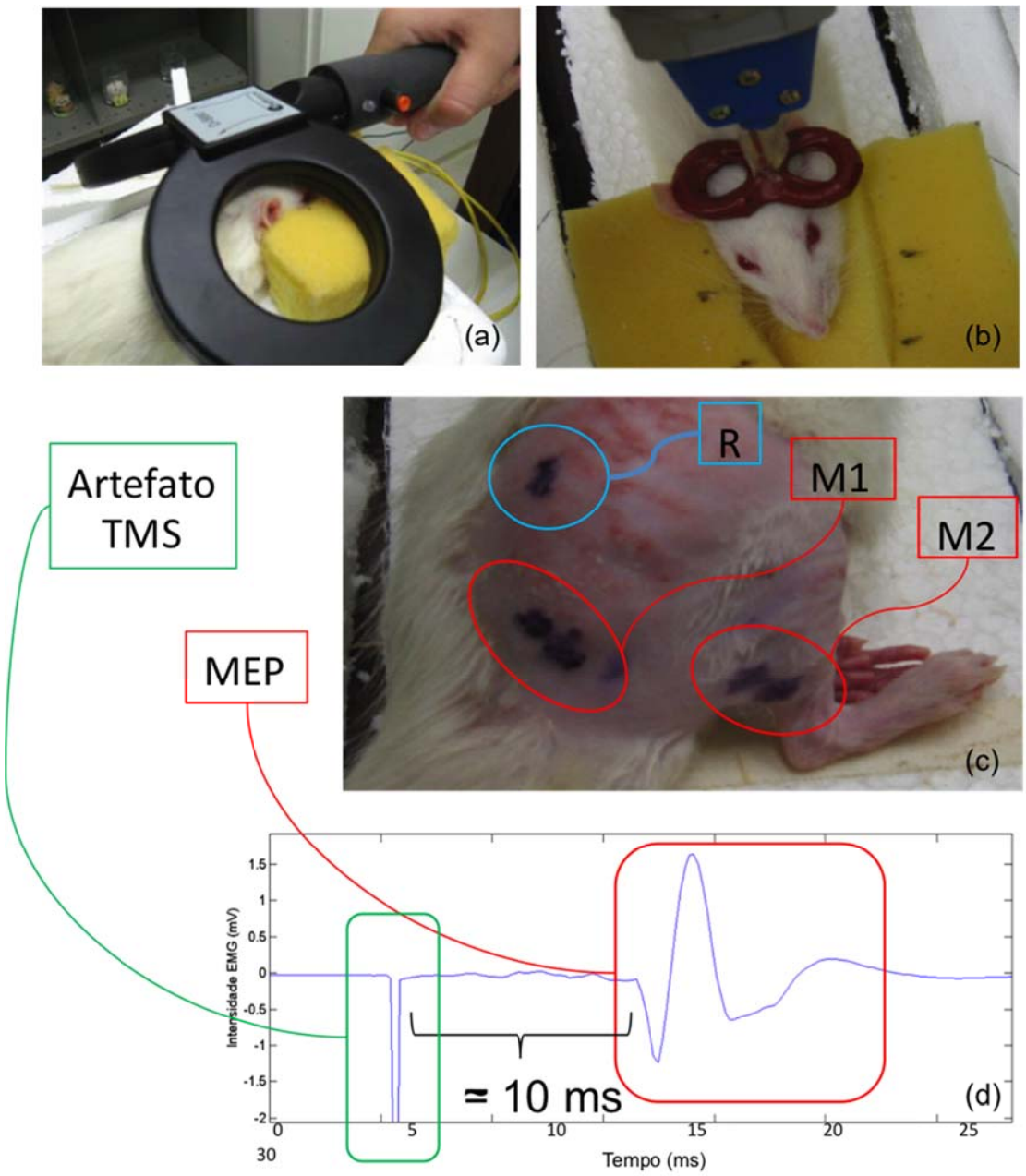


Figura 29. (a) Experimento de aplicação de TMS em ratos utilizando a bobina cônica de humanos (b) e a bobina de pequenos animais 8 simples. (c) Imagem mostra o posicionamento dos eletrodos M1 e M2, na pata traseira, e a referencia R, sobre uma vertebra da coluna dorsal. (d) Sinal de EMG adquirido utilizando a bobina cônica do aparelho MagPro, o quadrado verde no sinal destaca o artefato devido ao pulso de TMS e o quadrado em vermelho destaca o MEP.

Nessa imagem podemos visualizar que o MEP ocorre cerca de 10 ms após a aplicação do pulso de TMS, resultado coerente com estudos de Luft e colaboradores (Luft, Kaelin-Lang *et al.*, 2001), que encontram valores de transito entre 5 e 12 ms para ratos.

A utilização de bobinas de humanos torna a técnica inespecífica, já que, praticamente todo cérebro do animal é estimulado. Desse modo, para se realizar estudos mais específicos, torna-se necessária a utilização da bobinas pequenas. Para esse fim estamos desenvolvendo novos conectores para que possamos alimentar as bobinas com fontes mais estáveis, de equipamentos de TMS disponíveis no mercado.

Outro teste foi realizado com a bobina 8 simples, que consistiu na estimulação do nervo braquial e medida do MEP no músculo Flexor Radial do Carpo de um indivíduo saudável. A Figura 30 mostra o posicionamento da bobina e o respectivo sinal de EMG. O artefato presente no sinal de EMG é devido ao pulso magnético de grande intensidade próximo ao eletrodo, e o ruído é devido a constante carga do capacitor, que o aparelho da Neurosoft necessita para que esteja pronto para o disparo.

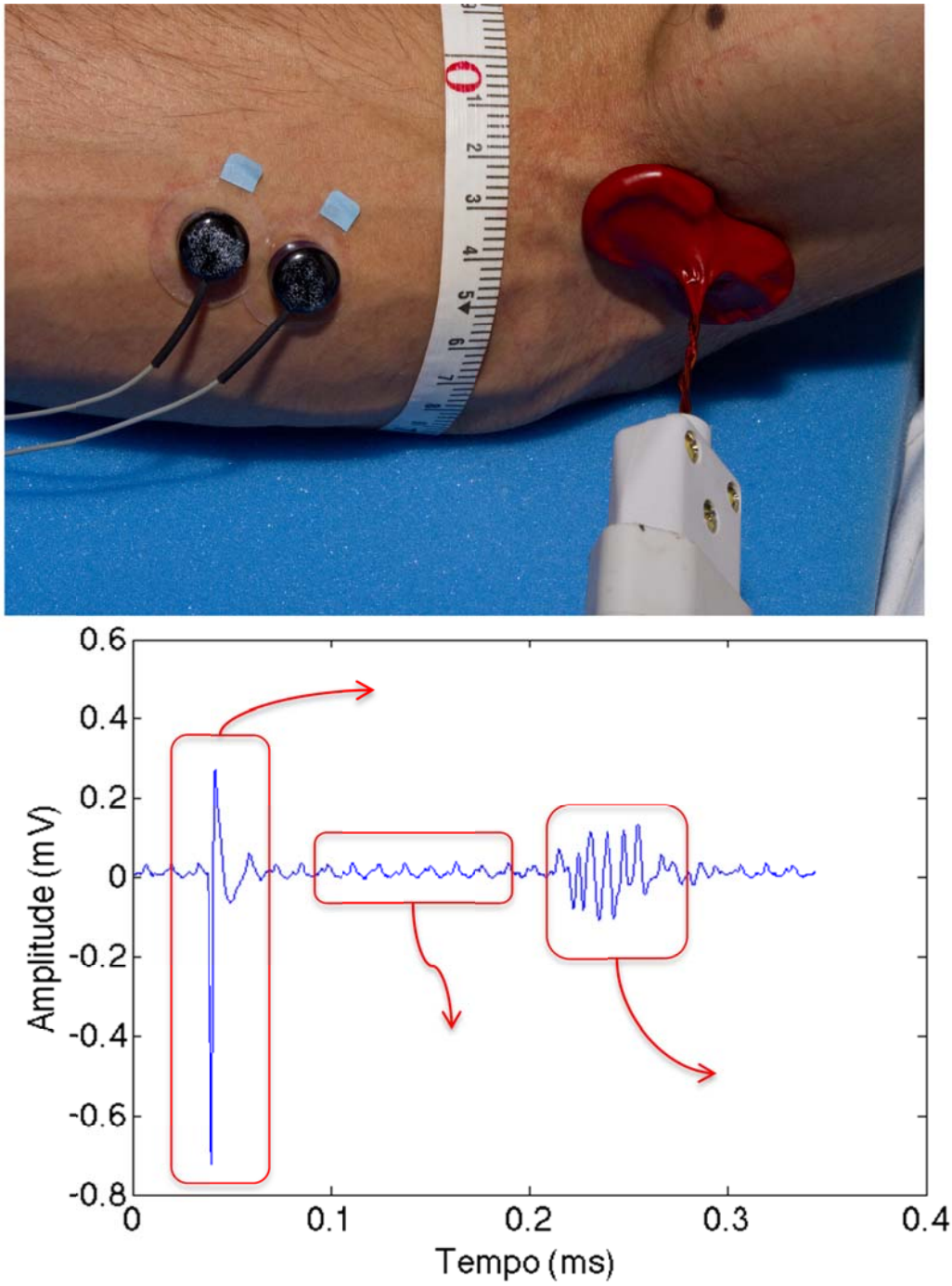


Figura 30. Estimulação do nervo braquial utilizando uma bobina 8 simples. O sinal representa o MEP devido à estimulação magnética. O artefato presente é devido ao pulso magnético de grande intensidade, e o ruído é devido à constante carga do capacitor, que o aparelho da Neurosoft necessita para que esteja pronto para o disparo.

Tendo em vista que a principal intenção na produção de novas geometrias de bobina é a estimulação de regiões mais superficiais, como por exemplo, em pequenos animais e nervos periféricos, as bobinas devem apresentar dimensões menores que aquelas utilizadas em experimentos em humanos. Para tanto, a espessura dos fios é pequena e o adensamento,

maior. Por outro lado, com essa configuração as bobinas apresentam aquecimento superior às comerciais de humanos, tornando necessária a implementação de estratégias de arrefecimento. A Figura 31 traz dois modelos de bobinas com arrefecimentos, em processo de desenvolvimento.

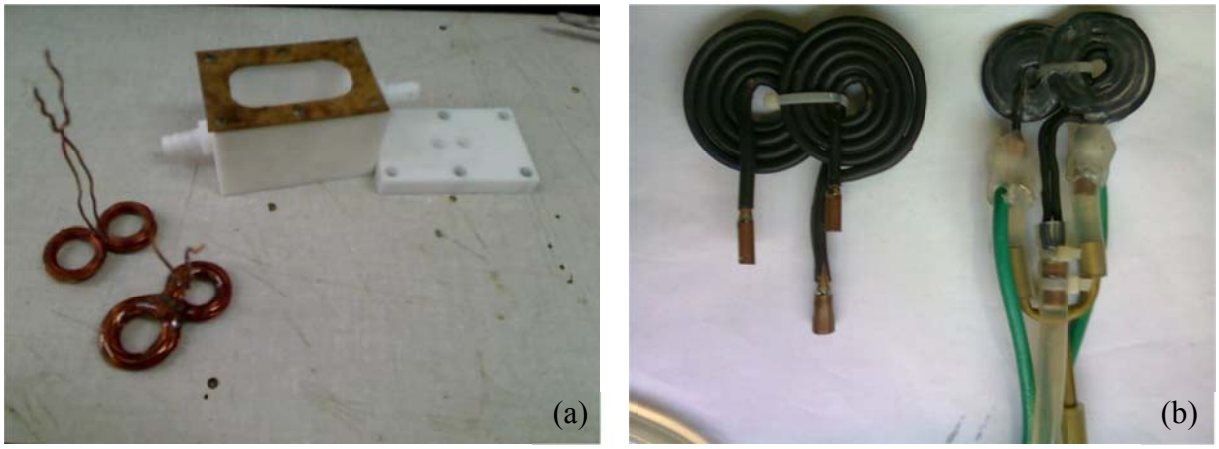


Figura 31. a) Bobinas 8 simples enroladas com fio de cobre e caixa para circulação de óleo. b) Bobinas enroladas com tubo de cobre. À esquerda, apenas a bobina, e à direita, a bobina acoplada ao Estimulador e ao sistema de arrefecimento.

Utilizada de forma convencional, a bobina 8 simples suportou até 5 pulsos consecutivos antes de superaquecer. Com a utilização do sistema de arrefecimento (Figura 31a), foi possível utilizá-la por mais de 15 minutos, recebendo 100% da capacidade da fonte do aparelho da NeuroSoft, totalizando 1000 pulos com frequência de 1 Hz, sem qualquer sinal de instabilidade da bobina. O mesmo comportamento foi observado para as bobinas em espiral dupla de tubos de cobre.

5.1.2 Implementação do Neuronavegador

A Figura 32 mostra a interface do Neuronavegador InVesalius em operação. A interface possibilita ao usuário selecionar qual rastreador quer utilizar, dentre os cinco modelos que atualmente são suportados pelo programa.

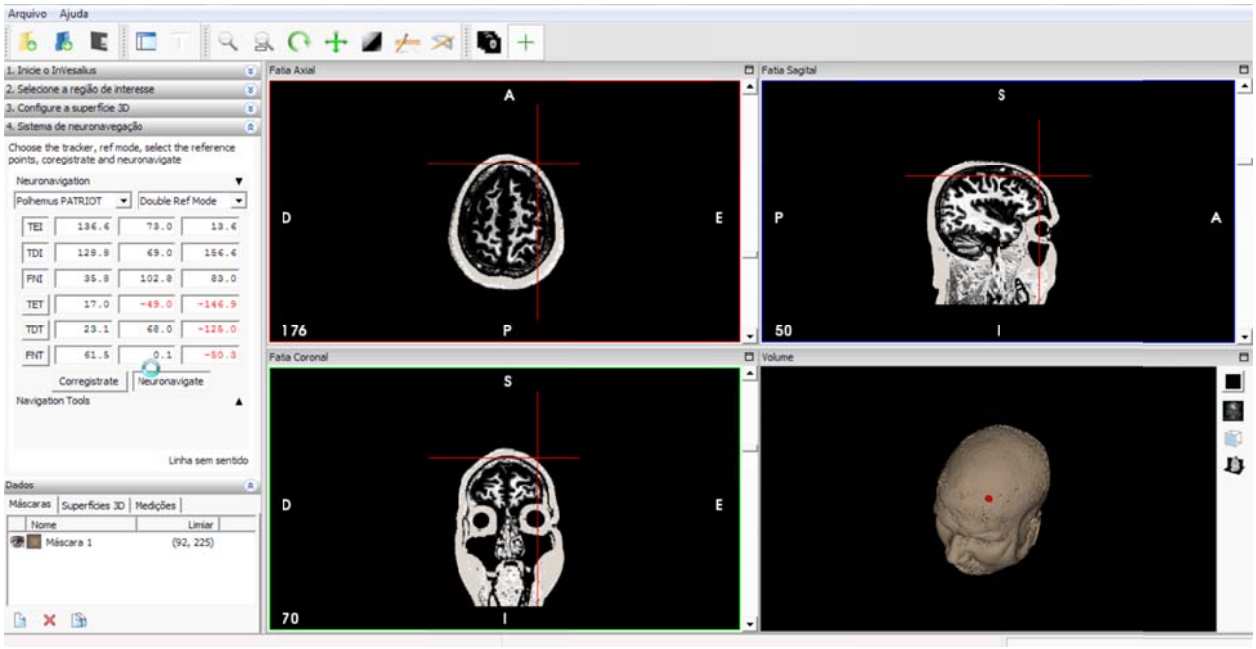


Figura 32. Tela do InVesalius com a aba de neuronavegação, o centro das cruzes vermelhas, que corresponde ao ponto vermelho na imagem de reconstrução volumétrica, indicam a posição relativa à sonda do rastreador espacial que se encontra sobre a cabeça do voluntário.

Ainda na Figura 32, em um segundo menu flutuante, pode se ler "Double Ref Mode". Esse menu permite selecionar o tipo de navegação que o usuário deseja realizar, com uma ou mais referências. No caso de uma única referência, o voluntário deve ficar com a cabeça fixa, como, por exemplo, pelo uso de uma queixeira oftalmológica. Com duas referências, é possível fixar uma delas na cabeça do sujeito e outra fazer o rastreamento, ou ainda, fixar em alguns instrumento de interação com o voluntário, como por exemplo, a bobina de TMS.

Logo abaixo pode-se notar botões (TEI, TDI, FNI,TET, TDT, FNT), e campos de edição de texto. Cada botão antecede 3 campos de edição texto, que correspondem às coordenadas ***x, y*** e ***z*** dos pontos estereotáxicos na imagem e no rastreador utilizados para o corregistro.

Uma vez que os pontos foram selecionados, o usuário deve clicar no botão "Corregistrate" para alinhar as posições da imagem com as obtidas pelo rastreador espacial, e em seguida clicar no botão "Neuronavigate", que fica ativo e faz com que o InVesalius leia a porta do rastreador, atualize as posições em tempo real, e mova o cursor (em vermelho) nas imagens.

Além de fazer o rastreamento, em muitas aplicações é necessário criar marcações nas imagens. Essas marcas geralmente estão relacionadas com alguma intervenção no escalpo do indivíduo naquela posição. Por exemplo, o posicionamento da bobina de TMS, ou a abertura de um orifício para a passagem de uma cânula. A Figura 33 mostra a aba do Neuronavegador com a ferramenta para criar marcadores e coletar os valores de suas posições relativas às imagens.

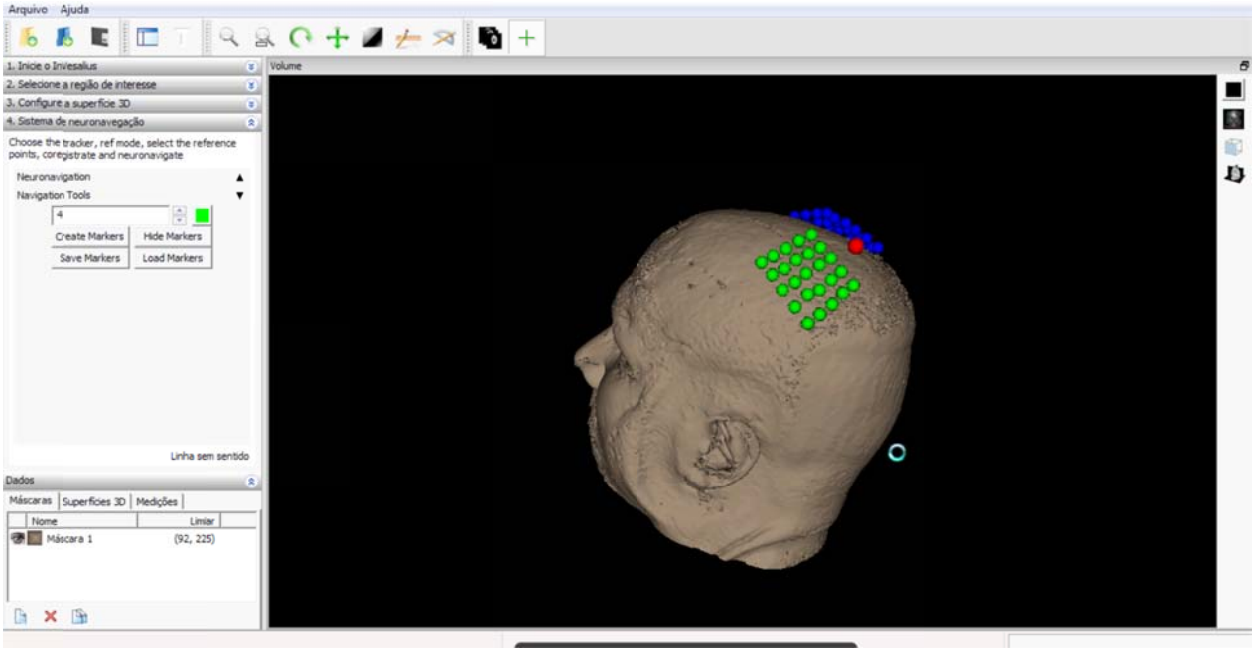


Figura 33. Tela do Neuronavegador InVesalius na aba de criação de marcadores. Nesse exemplo os pontos em azul e verde são as posições que receberam a TMS no mapeamento de córtex motor.

Nessa aba podemos ver o botão "Create Markers", e do lado dele um botão pequeno em verde. Quando ele é clicado, abre uma palheta de cores, que define a cor do marcador. A cor que foi selecionada é então apresentada no botão. Depois de selecionada a cor do marcador, o usuário deve posicionar o cursor na posição que deseja fazer a marcação e em seguida clicar no botão "Create Marker". Essa ação cria então um marcador na imagem, que pode ser visualizado na Figura 33, sendo eles as esferas em azul e verde. Nesse exemplo, os marcadores representam as posições que sofreram estimulação em um mapeamento por TMS. Os Marcadores também podem servir para aprimorar o alinhamento entre a imagem de ressonância e os pontos coletados pelo NeuroNavegador.

Na Figura 34 pode-se observar a nuvem de pontos coletados sobre a cabeça de um voluntário utilizando o InVesalius, e o posterior corregistro da nuvem de pontos com a imagem de ressonância magnética. Podemos notar que os pontos estão perfeitamente distribuídos sobre a reconstrução volumétrica da MRI estrutural.

Figura 34. Nuvem de pontos coletados com neuronavegador ao redor da cabeça de uma pessoal, e sua posterior sobreposição na reconstrução volumétrica da MRI estrutural.

A Figura 35 ilustra um caso no qual o alinhamento da MRI não foi devidamente ajustada à nuvem de pontos.

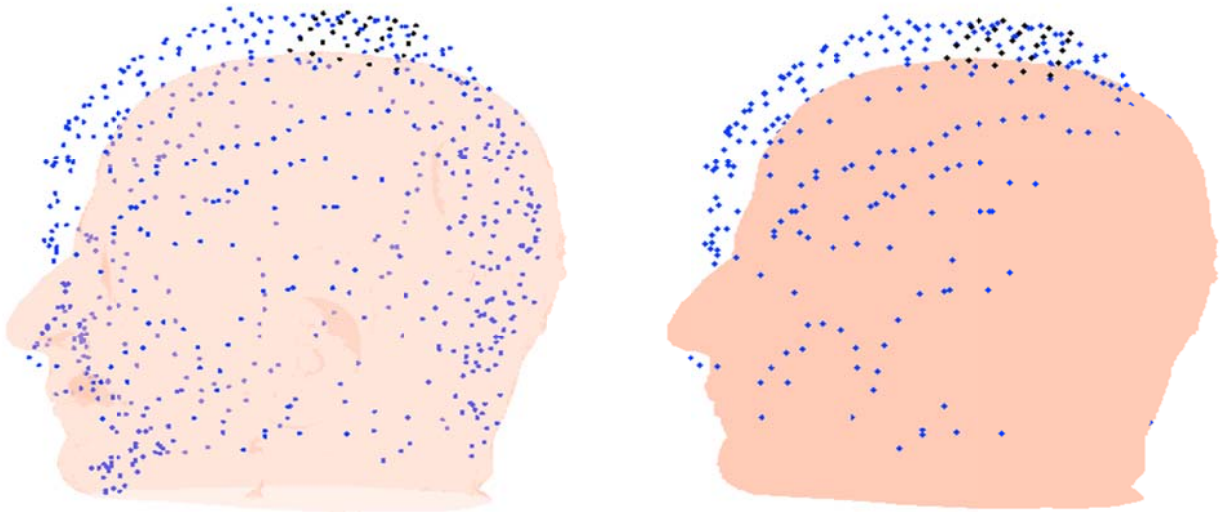


Figura 35. Exemplo de erro de corregistro da nuvem de pontos com a respectiva MRI.

Nos casos de erro de corregistro como na Figura 35, deve-se fazer o ajuste manual, baseado apenas nas informações visuais. Esses erros são geralmente provenientes do pequeno número de pontos utilizado no ajuste, na versão atual, utilizamos três pontos fiduciais, assim se for cometido um pequeno erro na aquisição de um desses pontos, esse erro vai se propagar, causando um grande desalinhamento no final, como mostrado na Figura 35. Porém, hoje já há pacotes computacionais dedicados para esse tipo de aplicação, como é o caso do Iterative Closest Point (ICP), implementado em VTK. Entretanto essas rotinas ainda estão sendo implementadas no Neuronavegador InVesalius, para fazer esse corregistro volumétrico fino de forma automatizada.

Por fim, para a calibração do software construímos um conjunto de coordenadas físicas e suas representações virtuais. Construímos também um sistema de grade para o controle de qualidade dos sistemas de rastreamento espacial, mostrado na Figura 36.

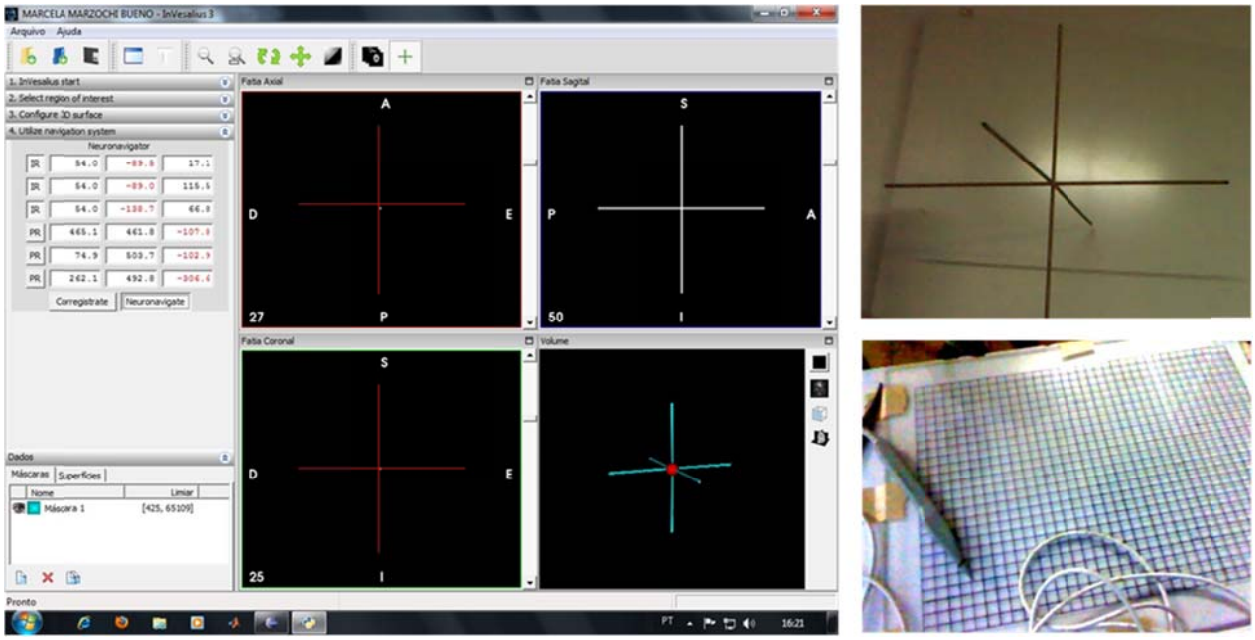


Figura 36. Tela do InVesalius na aba de neuronavegação, carregado com o sistema de coordenadas virtual, e fotografias do sistema de coordenadas correspondentes.

Embora ainda não tenhamos desenvolvido os protocolos de calibração do Neuronavegador, em observações preliminares notamos que os fatores limitantes da precisão são as fontes de ruído e artefatos do rastreador espacial, que no caso do Polhemus pode ser qualquer estrutura metálica que esteja próxima às sondas, para o Claron é a fonte de iluminação e para o Zebris o tamanho da sala onde são realizados os experimentos. Outro fator importante que pode gerar imprecisão no método vem dos algoritmos de corregistro, que atualmente são construídos com uma transformada de corpo rígido representada por 3 pontos.

5.1.3 Implementação do MEPHunter

Na Figura 37 é possível visualizar a tela principal do programa de análise de sinais MEPHunter.

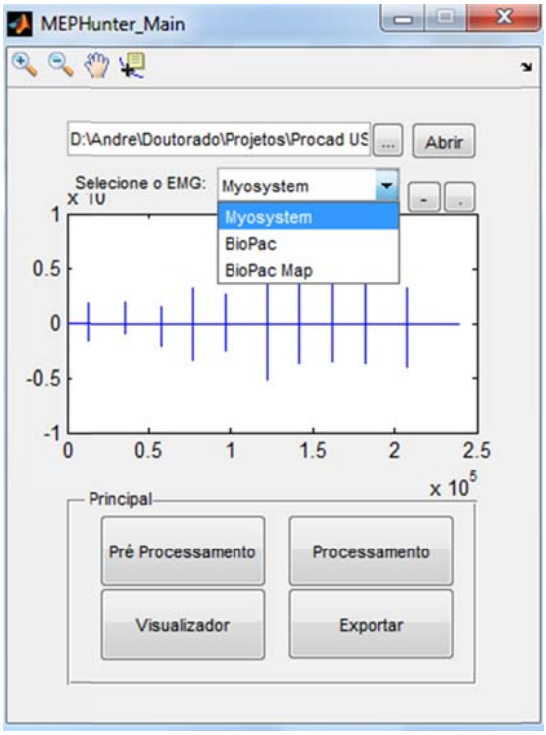


Figura 37. Tela inicial do programa MEPHunter como o menu flutuante dos tipos de arquivos de EMG que podem ser lidos.

Essa interface permite ao usuário carregar o sinal de EMG com facilidade. Atualmente o programa oferece suporte para dois formatos de arquivo, ASCII e Binário, provenientes de dois equipamentos de EMG, o Myosystem e o BioPac. Existe ainda a opção BioPac Map, que deve ser utilizada para estudos de mapeamento do córtex motor, no qual existe mais de um arquivo contendo informação de MEP de um mesmo estudo.

Após carregar o arquivo contendo o sinal de EMG, ele pode ser pré-visualizado na janela principal, a qual conta com ferramentas de *zoom in*, *zoom out*, arrastar e mostrar os valores de posição (x e y) de determinado sinal.

Após carregar o sinal na interface principal, ele deve passar por uma etapa de pré-processamento, cuja principal função é eliminar o ruído e tornar o sinal biológico mais evidente. Entretanto, utilizando o filtro de amplitude, algumas vezes o sinal biológico pode ser destruído junto com o ruído como mostra o exemplo da Figura 38.

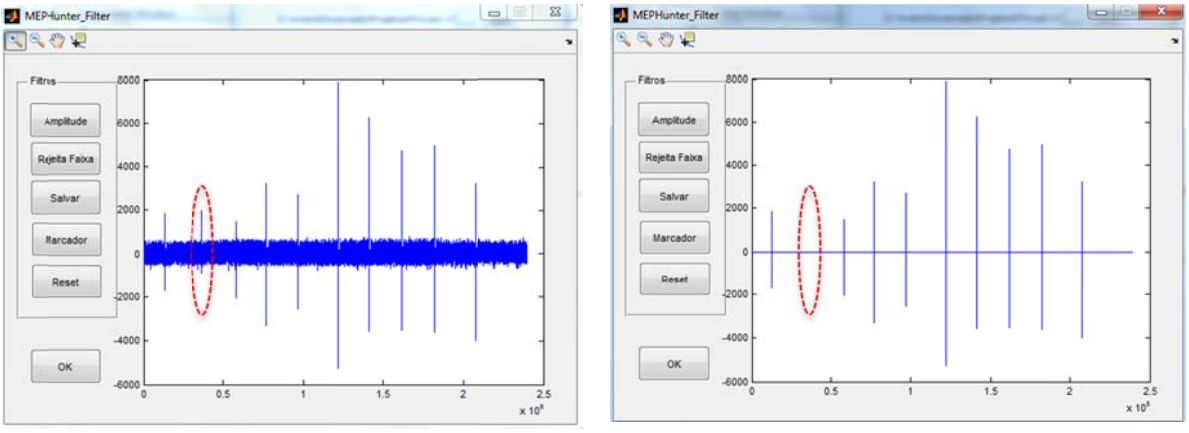


Figura 38. Tela da interface de pré-processamento do MEPHunter. No detalhe, a elipse em vermelho mostra a supressão indevida de um MEP durante o pré-processamento.

O sinal do MEP destacado com a elipse vermelha desapareceu na Figura 38 (b). Para evitar a eliminação indevida de sinal, criamos uma ferramenta que protege uma faixa do sinal, representada graficamente por um triângulo verde no início e um triângulo vermelho no final

da região a ser protegida. A Figura 39 mostra o mesmo exemplo acima, utilizando a ferramenta de proteção aplicada sobre o segundo MEP do sinal.

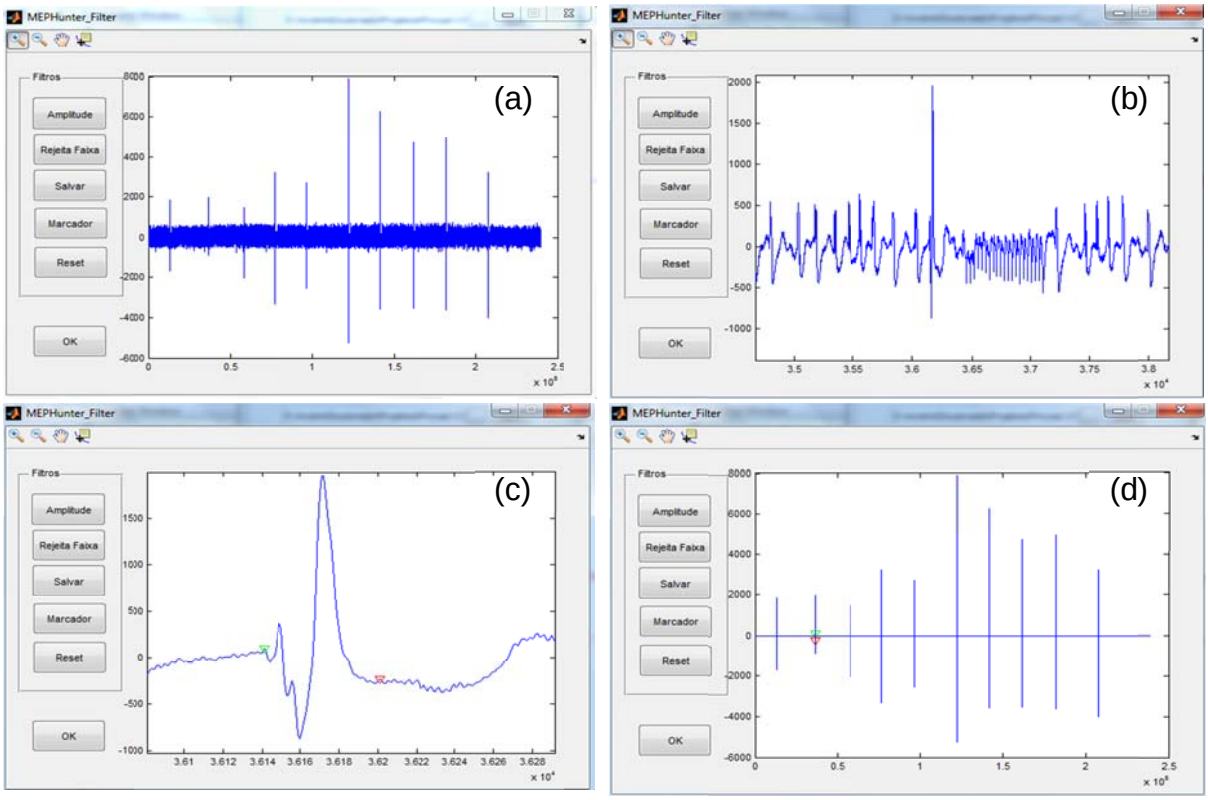


Figura 39. Exemplo de pré-processamento de um sinal de EMG. (a) Sinal bruto do EMG. (b) zoom in no segundo MEP. Nessa figura é possível notar que a amplitude do ruído é da mesma ordem da amplitude do MEP. (c) Colocação de marcadores pare evitar a eliminação desse trecho do sinal. (d) Sinal pré-processado sem a eliminação do segundo MEP como ocorreu no exemplo da Figura 38.

Uma vez que o ruído foi devidamente atenuado podemos passar para etapa de processamento. A Figura 40a mostra a interface de processamento do MEPHunter. Essa interface conta com três estratégias de detecção de MEP: por correlação cruzada, pela amplitude, e pela utilização de um trigger. Como a detecção do sinal é automatizada, criamos uma interface para selecionar os MEP que devem ser excluídos da amostra, mostrada na Figura 40b. Nessa interface também é possível visualizar a amplitude do MEP em evidência (em preto), bem como a média de todos os MEP do sinal (verde claro e preto). Após a seleção dos MEP, todas as variáveis do processamento são salvas e estão prontas para serem

exportadas para formato ASCII, possibilitando a realização de análises em outras plataformas, como por exemplo, o programa Origin, ou o programa Prisma. O MEPHunter ainda conta com uma interface de visualização, que permite o usuário visualizar informações do MEP de projetos salvos anteriormente. As Figura 40a e Figura 40b, respectivamente, mostram as interfaces visualização e de exportação.

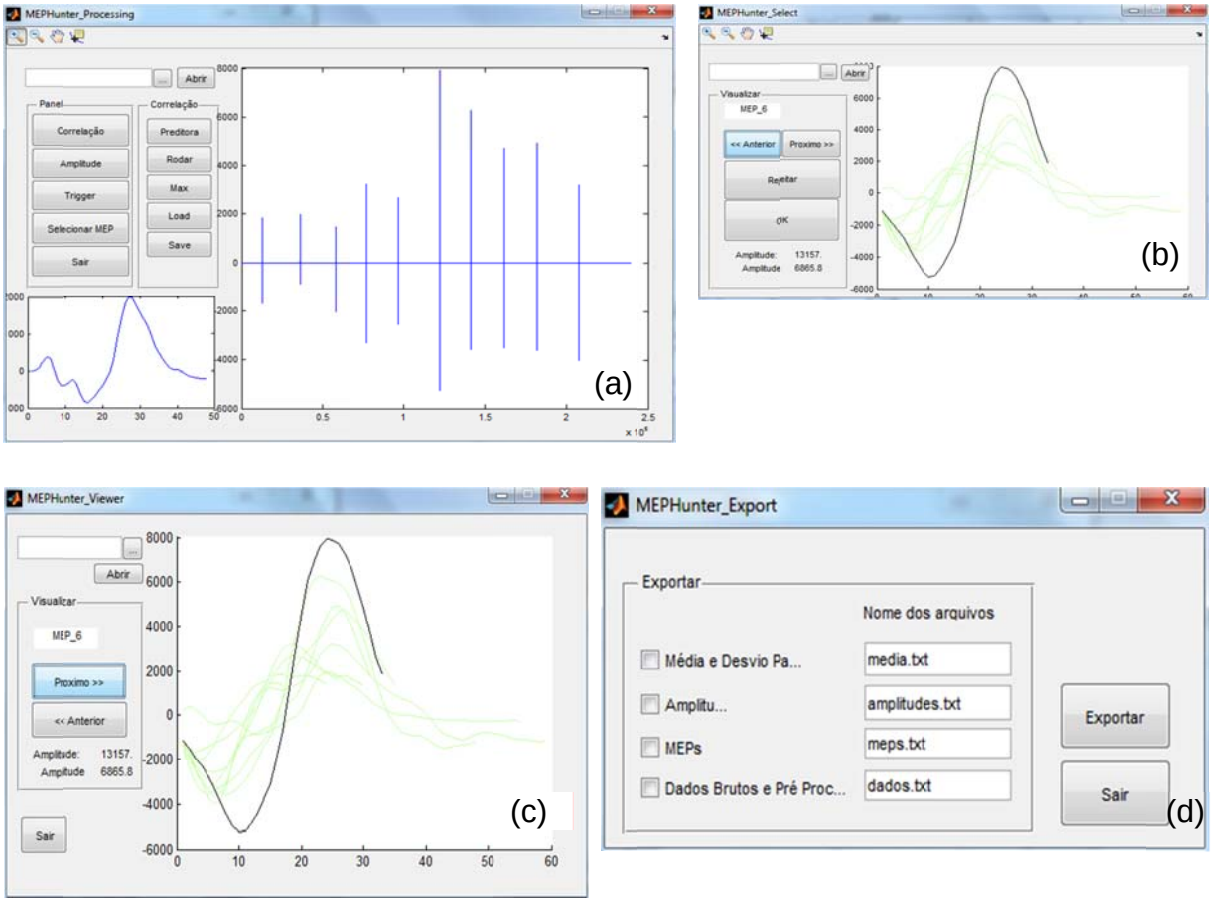


Figura 40. (a) Tela da Interface de processamento do MEPHunter, nesse exemplo podemos ver os botões relativos as ferramentas de correlação cruzada, sendo que na tela maior temos todo o sinal do EMG, e na tela pequena, temos a preditora para ser realizar a correlação. (b) Tela de seleção de MEP. (c) Tela de visualização dos sinais de MEP de projetos salvos. (d) Tela de exportação para o formato ASCII.

As Figura 41 a Figura 46 se referem à interface de análise do mapa motor pelo MEPHunter. Essa interface emprega as funções do MEPHunter convencional, entretanto permite que o usuário analise simultaneamente o sinal em diversas posições. Além disso,

nessa interface é possível analisar a respostas de vários canais do EMG no mesmo estudo, possibilitando avaliar a resposta de diferentes músculos simultaneamente.

A Figura 41 traz a tela do programa quando os dados brutos são carregados. Nesse caso, a escala temporal e a amplitude do artefato de TMS não possibilitam a visualização dos MEP. Para que seja possível visualizar os MEP, a interface conta com a ferramenta de *zoom*, arrastar e um cursor que mostra as coordenadas x e y de um determinado dado dentro do sinal. Para encontrar os MEP o programa utiliza como trigger o artefato de TMS. A Figura 42 mostra a seleção automática dos artefatos identificados por uma linha verde, e o pico do artefato por um círculo vermelho.

No entanto, em alguns casos, podem ocorrer erros na identificação dos artefatos. Para tanto o MEPHunter conta com uma estratégia de detecção semiassistida (interface que nomeamos de TriggerDetect), que pode ser visualizada na Figura 43.

Já na Figura 44 mostramos a tela da interface de análises múltiplas mostrando a sobreposição das faixas de 60 a 80 ms após a aplicação do pulso de TMS, enquanto que na Figura 45 mostramos a promediação dos sinais de cada janela da Figura 44, com marcações de máximo é mínimo do MEP (cruz vermelha), bem como o seu início e o fim (triângulos verde e vermelho).

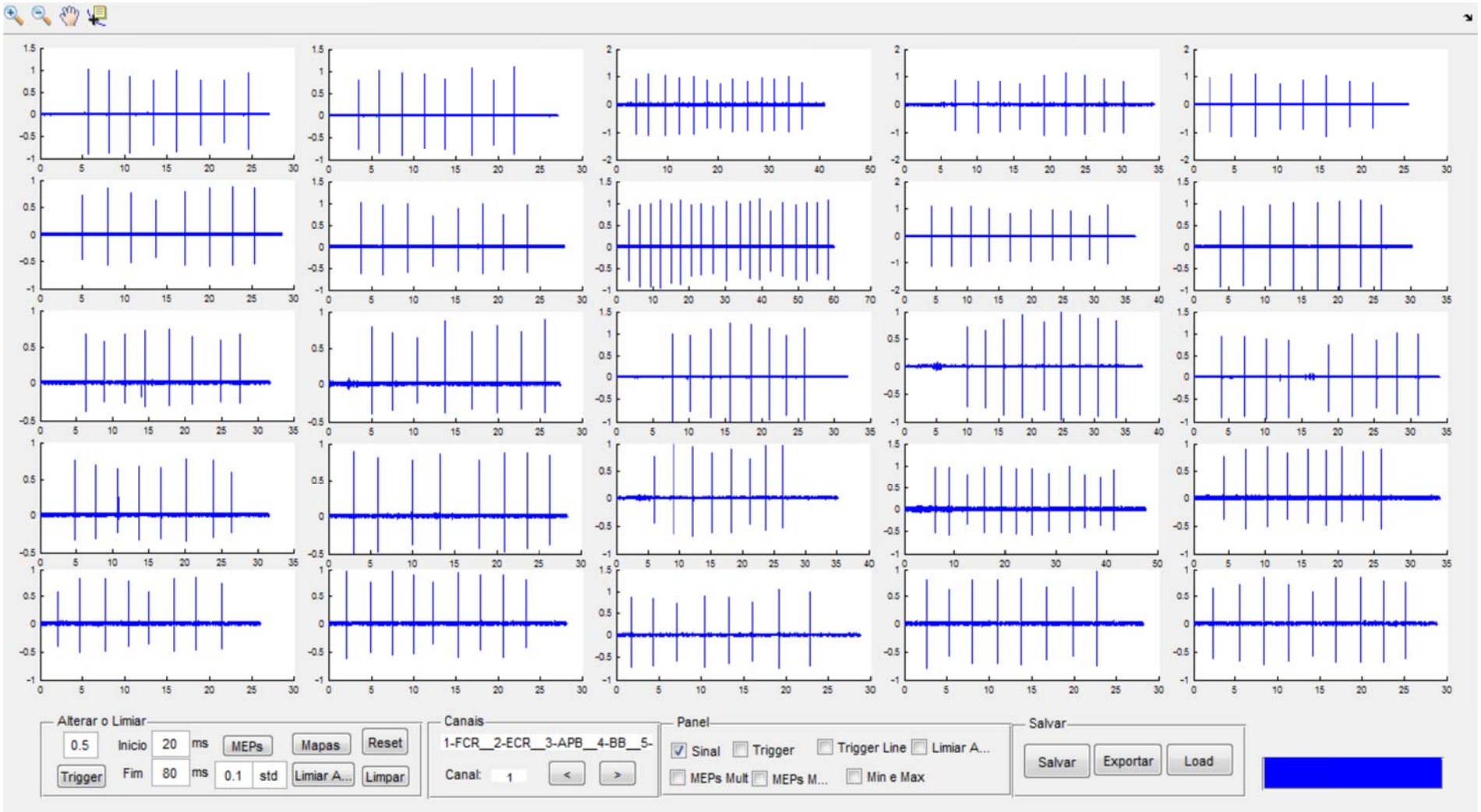


Figura 41. Interface para múltiplas análises do MEPHunter. Nesse exemplo temos um estudo de mapeamento do córtex motor com 25 regiões estimuladas, dando origem a um mapa 5x5cm^2

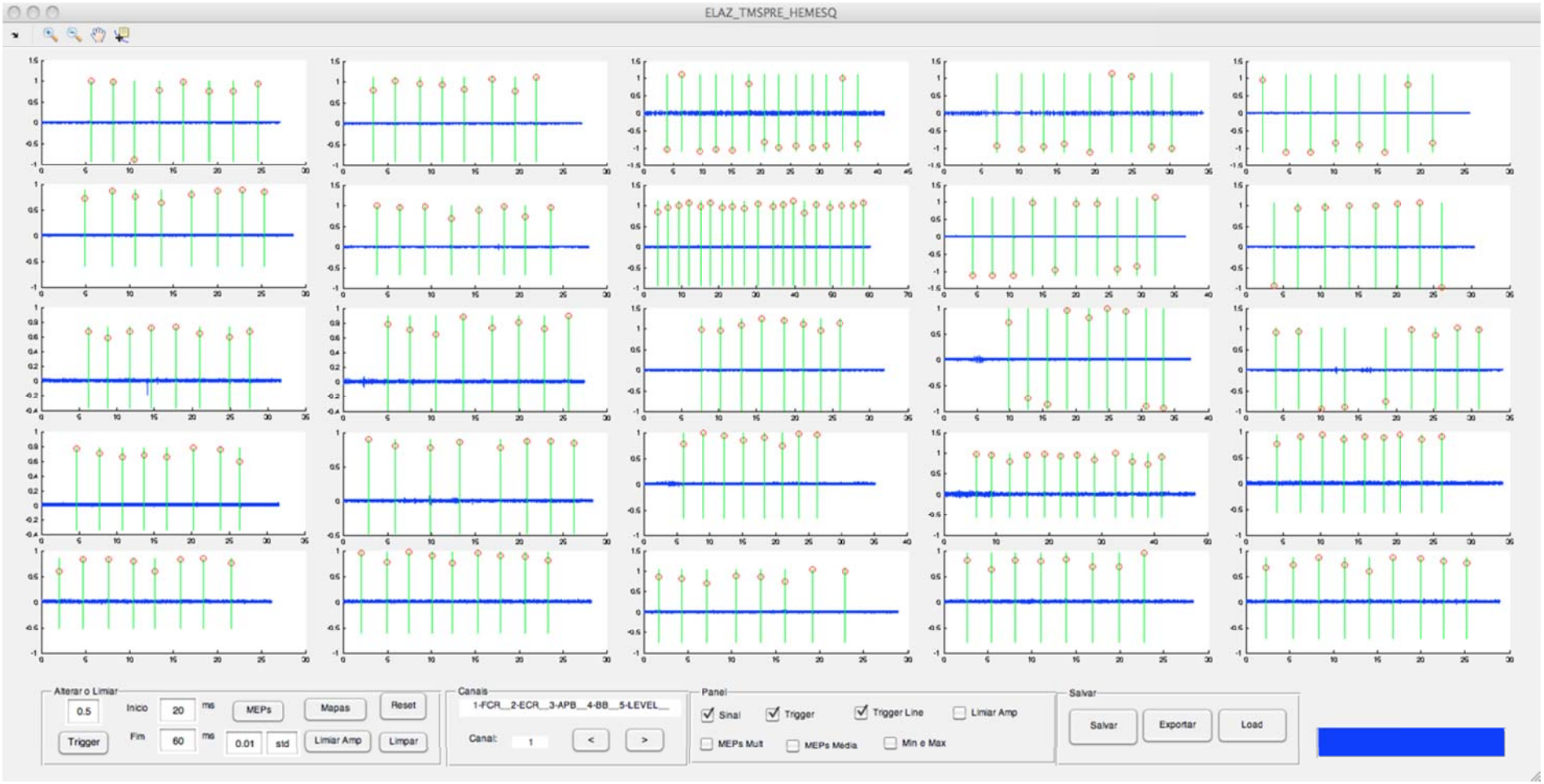


Figura 42. Interface de análise múltipla mostrando a seleção automática dos artefatos. Os pontos em vermelho indicam o valor de máximo do artefato e as linhas em verde marcam a posição do trigger.

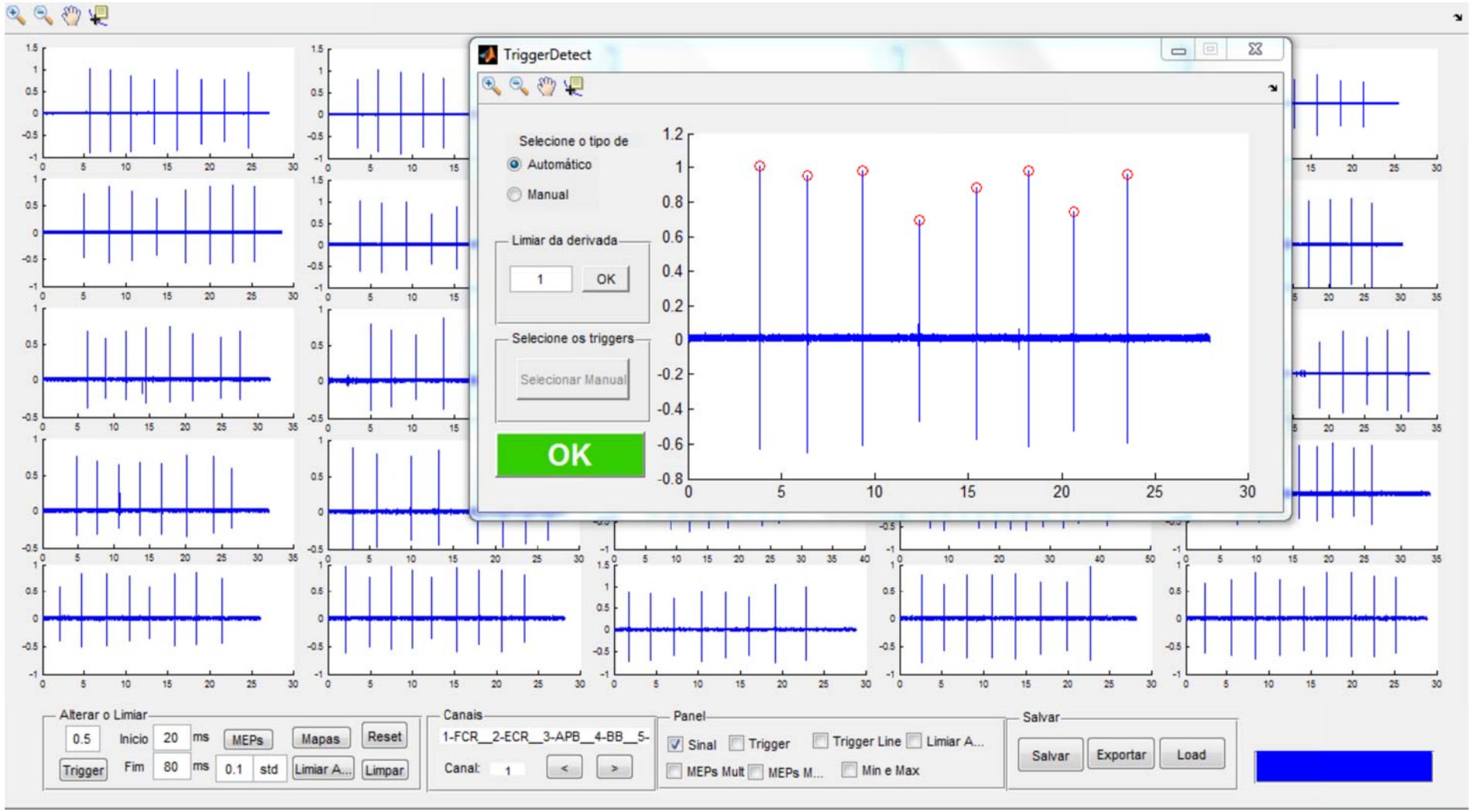
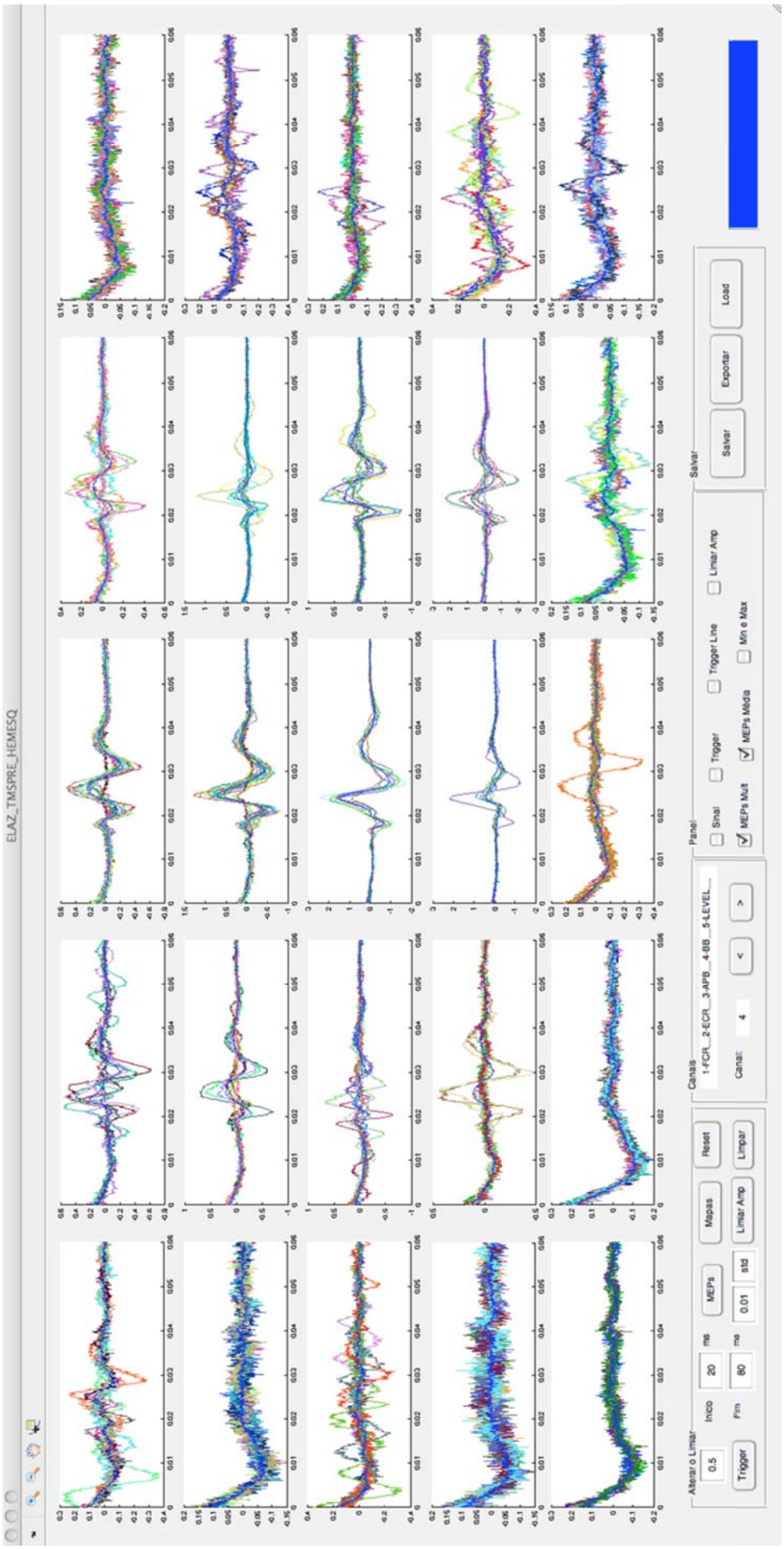


Figura 43. Tela da interface de análises múltiplas mostrando a janela de seleção manual do trigger.


ELAZ_TMSPRE_HEMESQ
Alterar o Limiar
0.5
Trigger
Inico
20
ms
Fim
80
ms
MEPs
0.01
std
Mapas
Limiar Amp
Reset
Limpar
Canais
1-FCR_2-ECR_3-APB_4-BB_5-LEVEL...
Canal:
4
<
>
Painel
Sinal
Trigger
Trigger Line
Limiar Amp
MEPs Mult
MEPs Media
Min e Max
Salvar
Salvar
Exportar
Load

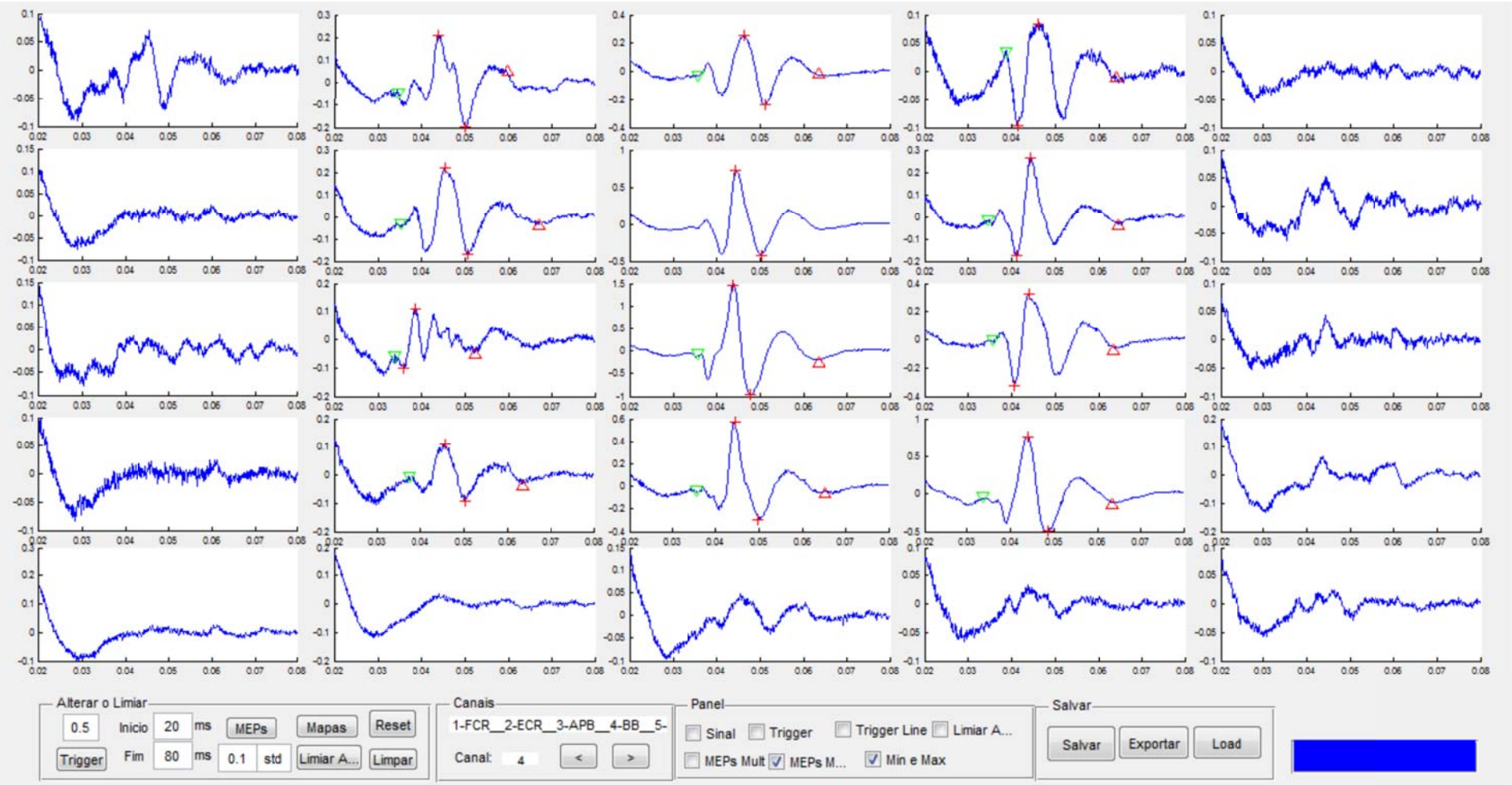


Figura 45. Promediação dos sinais de cada janela da Figura 44, com marcações de máximo é mínimo do MEP cruz vermelha), bem como o seu início e o fim (triângulos verde e vermelho).

A Figura 46 mostra a janela de edição (MEPDetect) que da mesma forma que no TriggerDetec permite o usuário identificar manualmente os valores de pico a pico e início e final do MEP, bastando pra isso clicar na posição de interesse. Nas imagens, o triangulo verde indica o início do MEP, o triangulo vermelho o final e os círculos vermelhos o valor de máximo e mínimo.

Depois de identificado os valores de máximo e mínimo, o programa permite a visualização dos resultados em um mapa de cores como mostrado na Figura 46b. Esse mapa pode ser utilizado a posteriori para comparação com outras técnicas de mapeamento, ou ainda para sobreposição a imagens anatômicas, de modo a possibilitar que informações anatômicas e funcionais sejam sobrepostas.

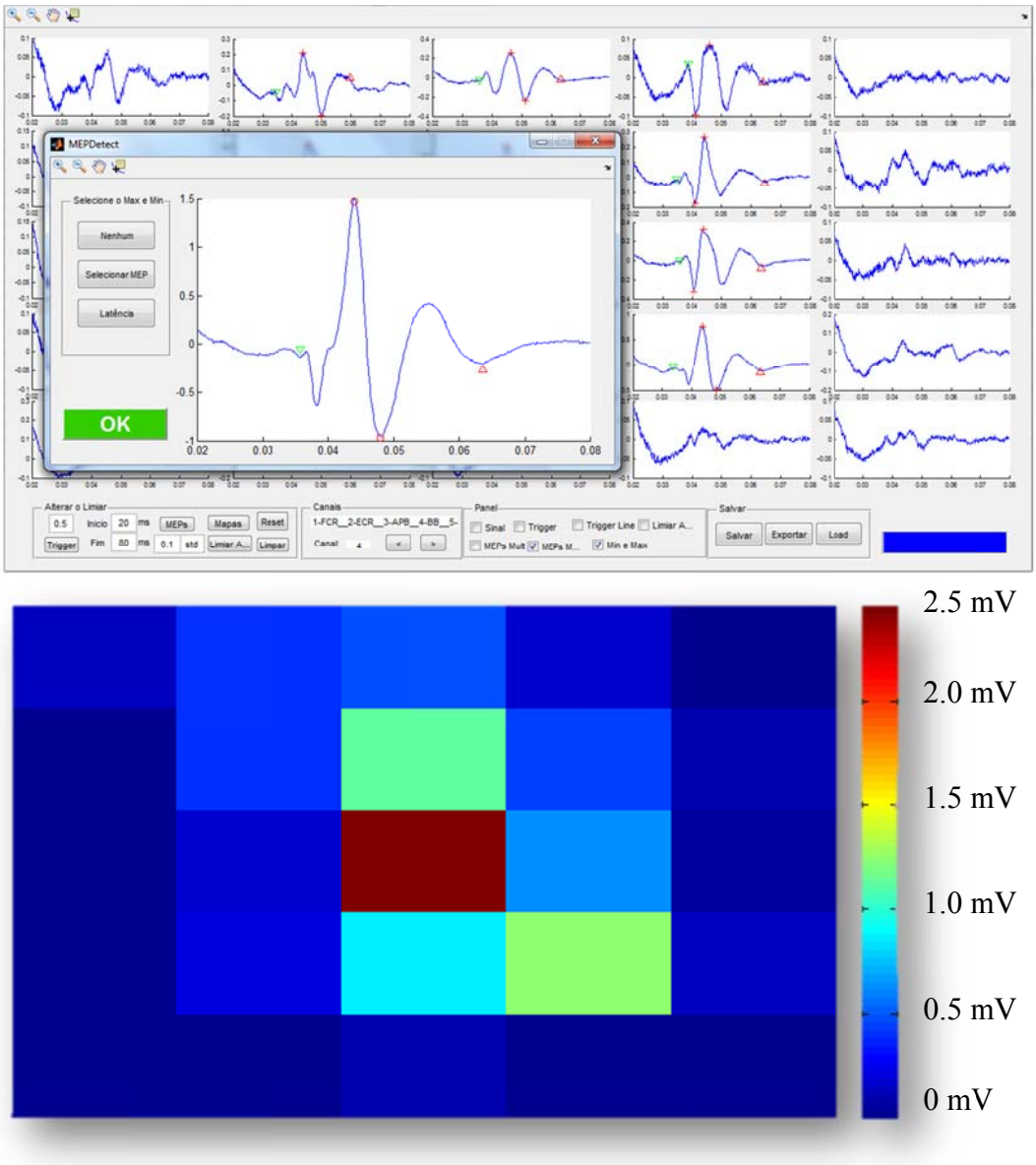


Figura 46. Tela da interface de análises múltiplas mostrando a janela de seleção manual dos valores de mínimo e máximo do MEP, bem como o seu início e fim. b) Mapa de cores relativos aos valores de pico a pico dos MEPs mostrados em a).

5.1.4 Implementação do TMSProjection

A Figura 47 mostra a interface do programa TMSProjection carregado com os volumes estrutural e funcional, a máscara de pontos obtidas pelo neuronavegador e os mapas de fMRI e MEP.

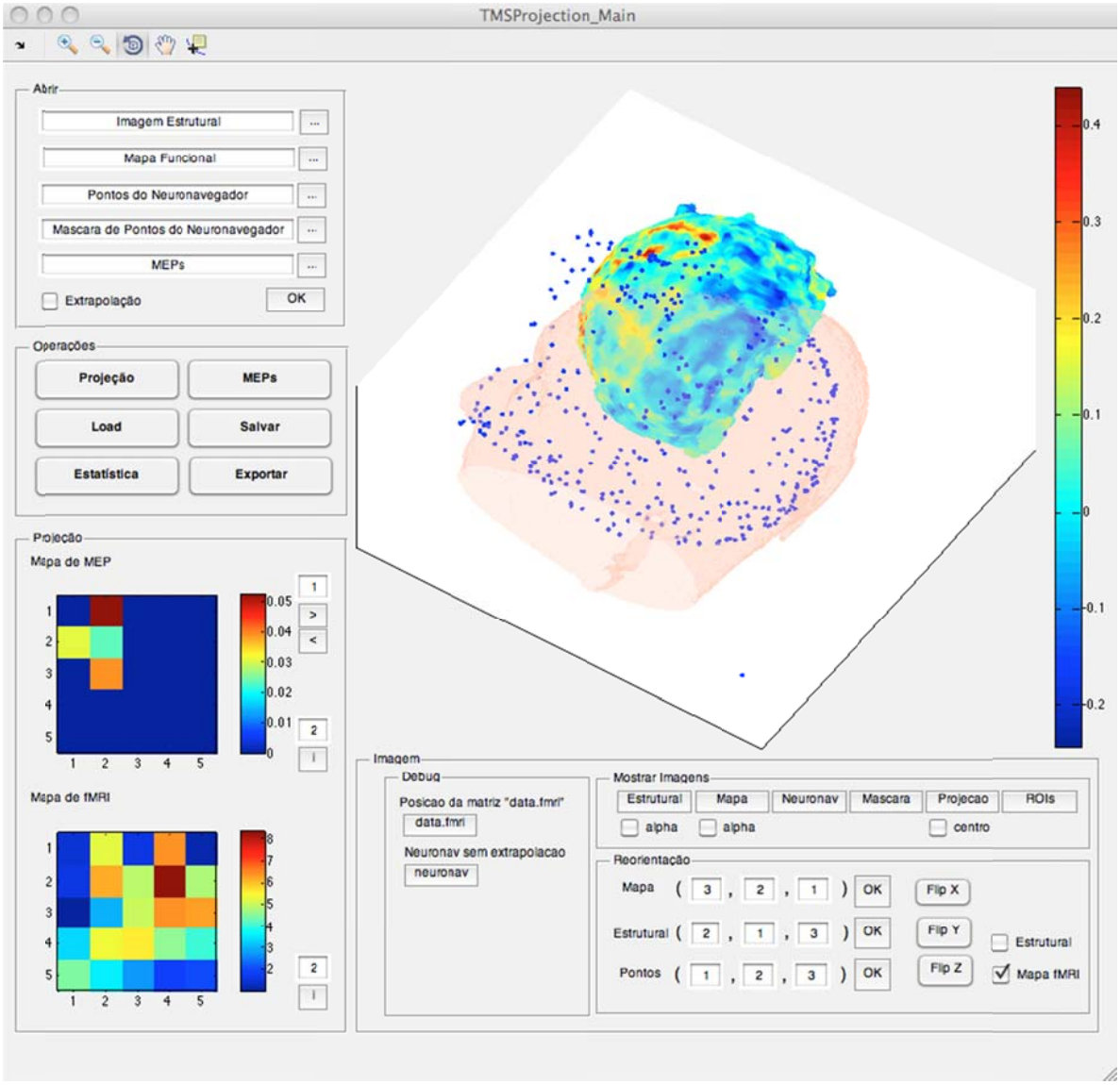


Figura 47. Tela da interface do TMSProjection. A interface conta um eixo de visualização tridimensional, onde são exibidos os volumes de MRI e nuvem de pontos, e com 4 painéis (Abrir, Operações, Projeção, Imagem). O painel Abrir apresenta cinco caixas de edição de texto para os caminhos dos arquivos que serão abertos. No painel Operações ficam os botões com as ferramentas principais do TMSProjection. No painel Projeção, podemos observar o Mapa de TMS e a projeção das posições que receberam a TMS nas fMRI. O painel Imagem apresenta as ferramentas gráficas, como reorientação, espelhamento, transparência, entre outras. Nesse exemplo chamamos a atenção para o desalinhamento dos volumes de ressonância funcional e estrutural, bem como a nuvem de pontos.

Podemos notar que os volumes funcional (mapa volumétrico colorido) e estrutural (superfície rosa translúcida, que representa a parte externa da cabeça), bem como a máscara de pontos (pontos em azul, resultado da varredura do neuronavegador sobre toda a superfície da cabeça), se encontram em orientações diferentes. Assim, utilizando a ferramenta de reorientação é possível alinhar os três objetos virtuais.

A Figura 48 mostra as imagens estrutural e funcional, juntamente com a máscara de pontos alinhadas depois da reorientação.

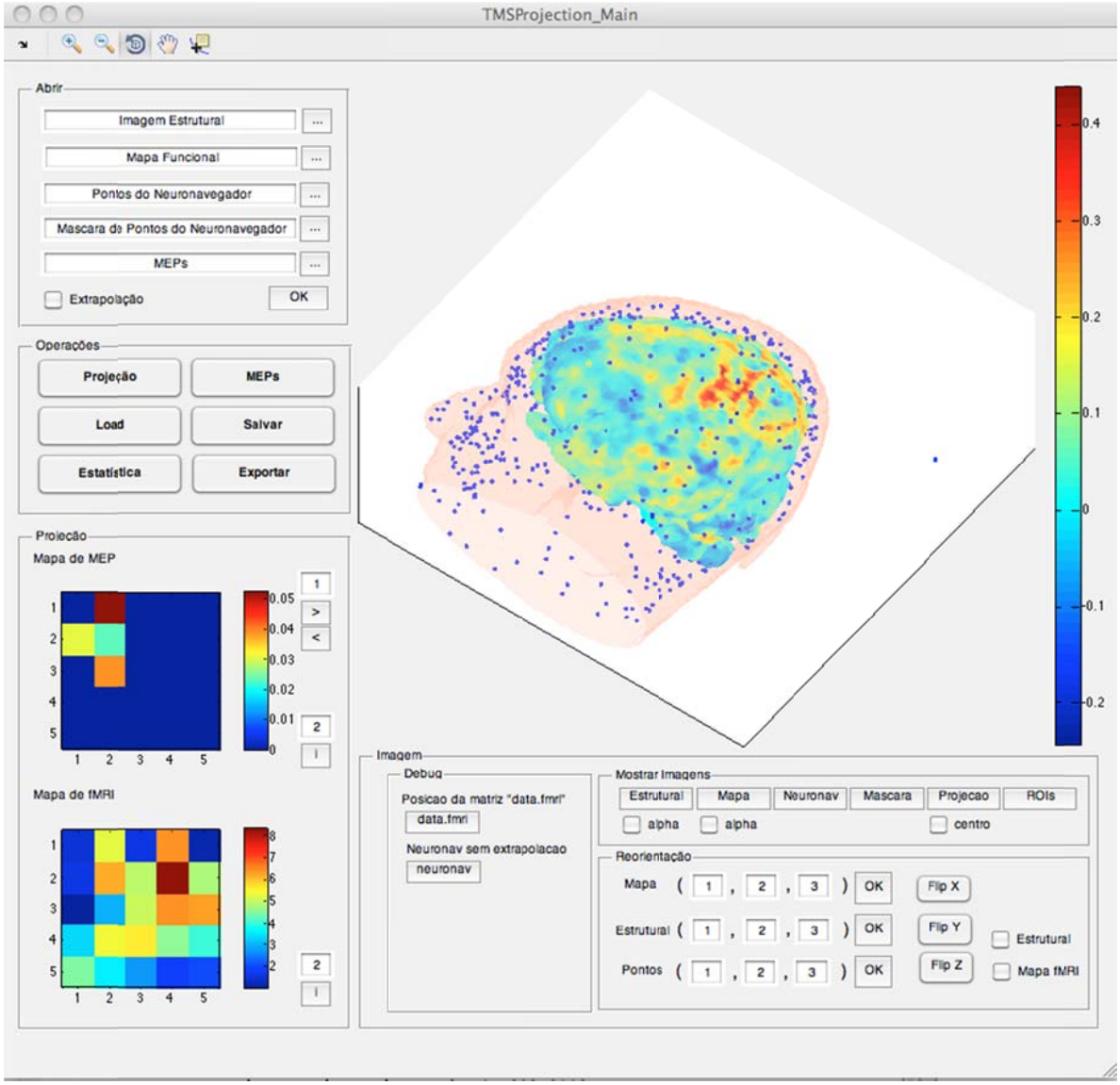


Figura 48. Tela da interface do TMSProjection com os volumes de MRI e nuvem de pontos alinhadas.

Uma vez que os objetos se encontram alinhados, o TMSProjection faz a projeção dos pontos onde foram realizadas as TMS sobre o volume funcional para a criação do mapa de fMRI com a mesma dimensão do mapa de TMS. A Figura 49 traz um exemplo da projeção dos pontos que foram estimulados.

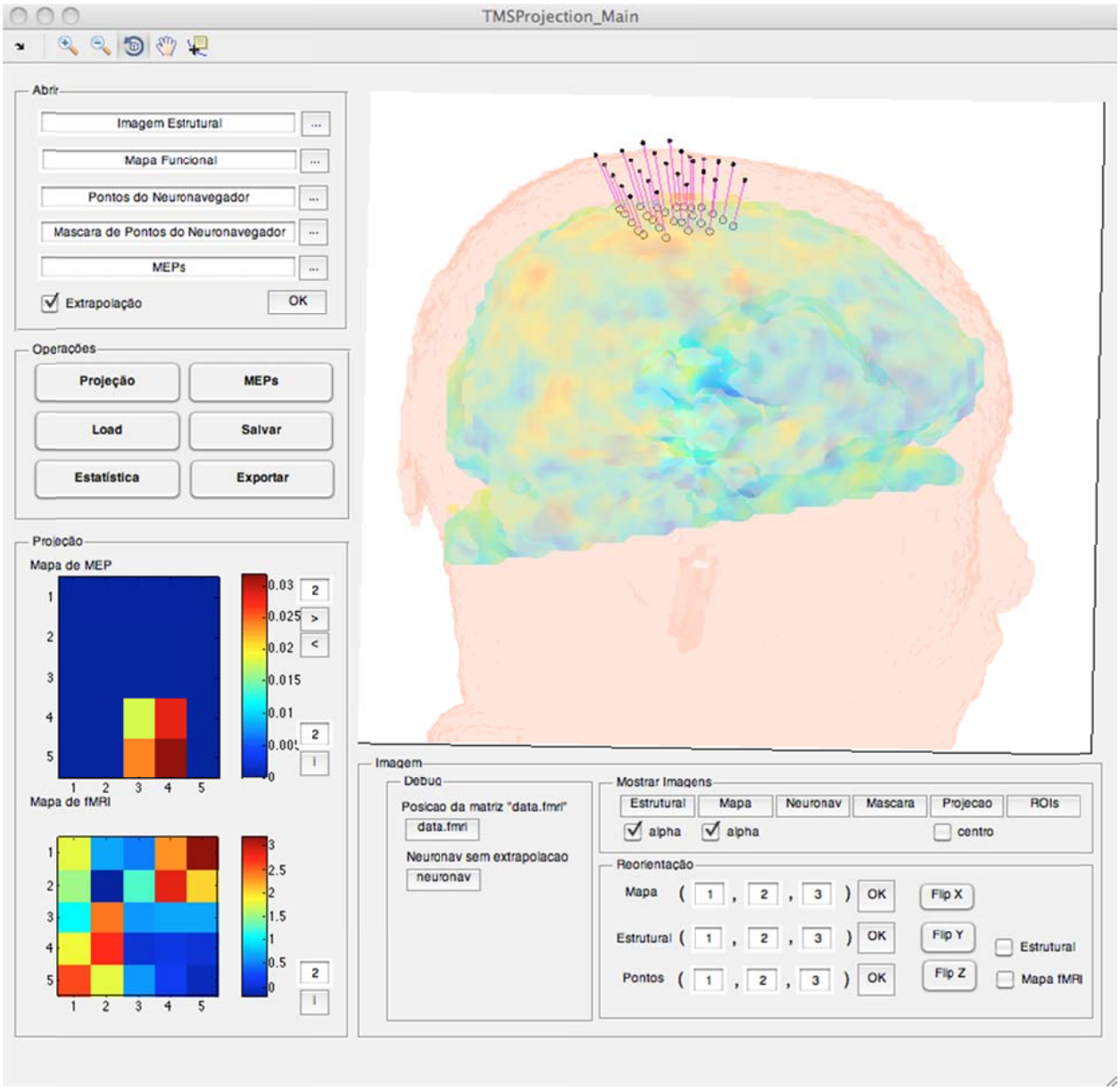


Figura 49. Tela da interface do TMSProjection mostrando a projeção dos pontos obtidos pelo neuronavegador de um mapeamento motor de TMS, sobre as imagens funcionais. O resultado da projeção é o mapa que se encontra no canto inferior esquerdo da figura. Na representação tridimensional os pontos em preto representam as posições que receberam a TMS; as linhas em rosa representam a direção da projeção das posições que receberam a TMS ao centro de massa do volume da fMRI; e os círculos em preto são as regiões projetadas no volume da fMRI.

No painel Projeção, o primeiro mapa é relativo ao exame de TMS e o segundo ao exame de fMRI. Podemos observar na representação tridimensional os pontos em preto, que representam as posições que receberam a TMS; as linhas em rosa, que representam a direção da projeção das posições que receberam a TMS ao centro de massa do volume funcional; e os círculos em preto são as regiões projetadas no volume das fMRI.

5.2 Aplicação em Pacientes com AVC

5.2.1 Estudos dos mapas motores por fMRI e TMS

Nessa sessão trazemos os resultados dos experimentos de mapeamento motor por fMRI e TMS, dos pacientes e dos sujeitos controle. Mostramos aqui três análises, a primeira é a respeito das características do mapa de fMRI, comparando os resultados dos sujeitos controle, pacientes mão parética e pacientes mão sadia; a segunda sobre as características do mapa de TMS, comparando os resultados dos sujeitos controle, pacientes mão parética e pacientes mão sadia; por fim, a terceira é a comparação entre os mapas de fMRI e TMS dentro de cada um dos grupos.

A Figura 50 traz um exemplo de mapas de fMRI em representação planar, nos cortes Sagital, Coronal e Axial para um sujeito controle e um paciente com AVC. As cores representam os valores de β obtidos pelo GLM para a tarefa de abrir e fechar a mão.

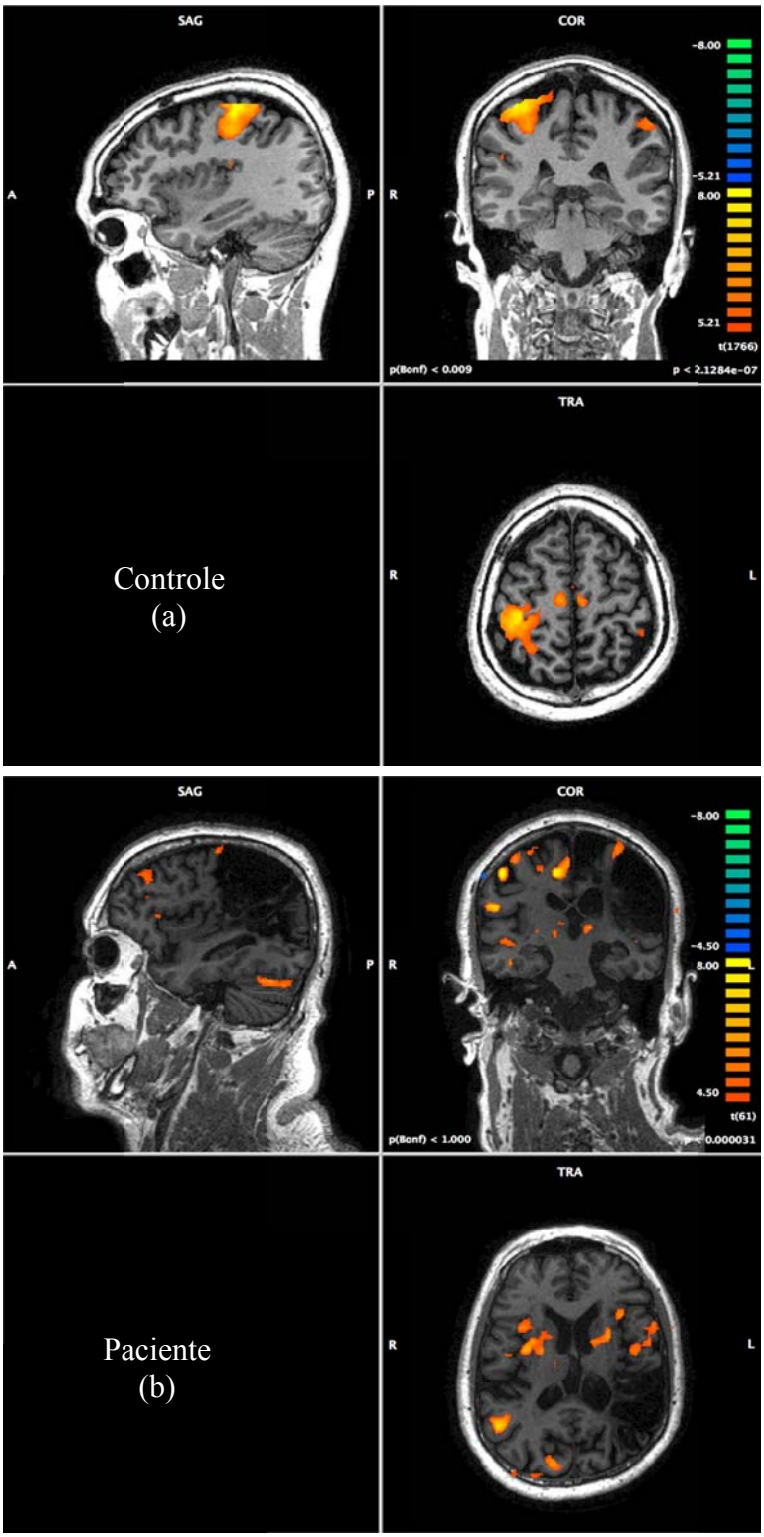


Figura 50. Mapas de fMRI em representação planar, nos cortes Sagital, Coronal e Axial. Os mapas de cores representam os valores obtidos do GLM para a tarefa de abrir e fechar a mão. (a) fMRI de um sujeito controle. (b) fMRI de um paciente com AVC.

Podemos observar na Figura 50 que as regiões estatisticamente engajadas na tarefa motora determinadas pelo GLM, parecem estra mais difusas nos pacientes do que no sujeitos controle. Então, para analisar de forma quantitativa essas possíveis diferenças, realizamos um estudo para avaliar as características das fMRI em um ROI de 5x5cm^2 sobre o córtex motor.

A Figura 51 traz os gráficos de barra das características dos mapas de fMRI em resposta à movimentação da mão parética e sadia de pacientes com AVC crônico e indivíduos controle. As características avaliadas para os mapas de fMRI foram a entropia do mapa de projeção (5x5 pixels) mostrado na Figura 51a; a entropia do mapa motor (50x50 pixels) mostrado na Figura 51b; o valor máximo de β provindo dos cálculos do GLM, mostrado na Figura 51c e o número de ocorrências de pixels que possuíam um valor de p associado (provindo do GLM) menor do que 0,001, mostrado na Figura 51d.

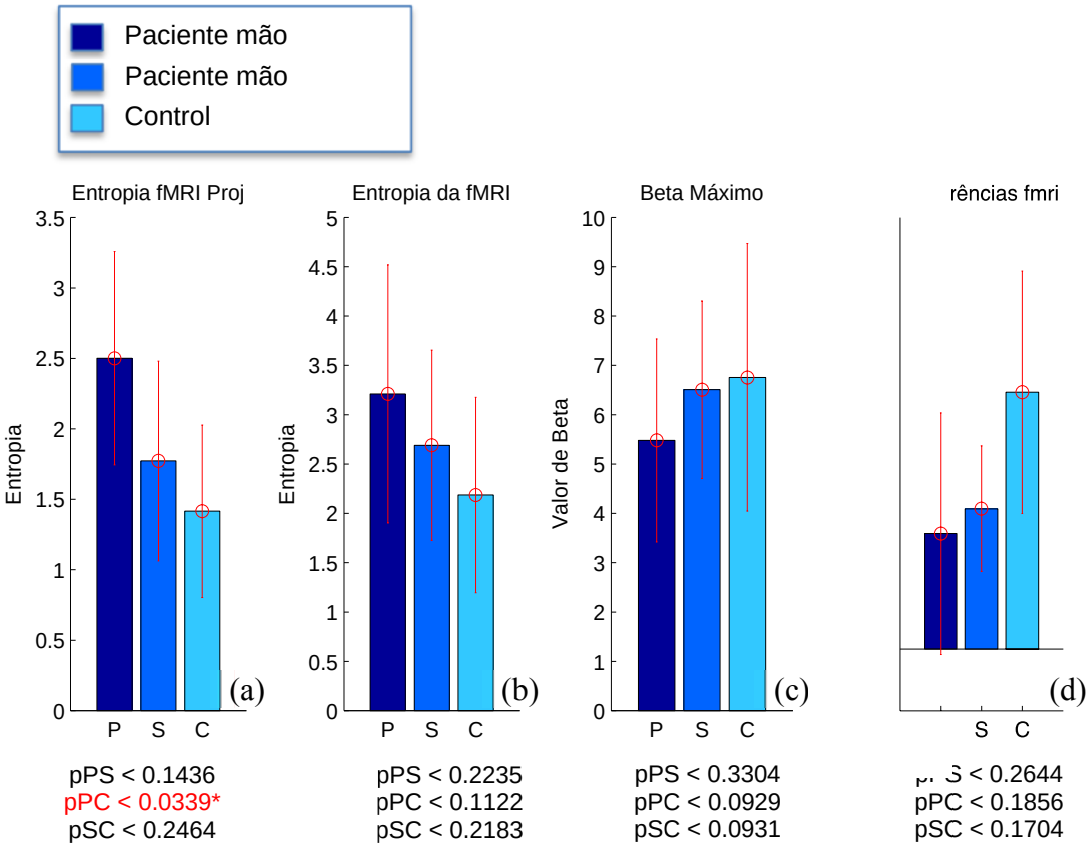


Figura 51. Resultados das análises dos mapas de fMRI em resposta a movimentação da mão parética e sadia de pacientes com AVC crônico e indivíduos saudáveis. (a) Entropia da projeção 5x5 pixels; (b) Entropia da projeção 50x50 pixels; (c) Máximo valor de β; (d) Número de voxels acima do limiar. pPS representa o p valor da comparação entre o grupo de pacientes mão parética e pacientes mão sadia; pPC representa o p valor da comparação entre o grupo de pacientes mão parética e sujeitos controle; pSC representa o p valor da comparação entre o grupo de pacientes mão sadia e sujeitos controle.

A Figura 51a e Figura 51b trazem informações de entropia dos mapas de fMRI, na mesma região em que foi feito o mapeamento por TMS.

O achado de que a entropia nos mapas relativos à mão parética é maior do que nos voluntários ($p < 0.04$), sugere que as regiões motoras no córtex dos pacientes está mais difusa do que nos sujeitos normais. Assim, de maneira diferente dos indivíduos controles, que geralmente apresentam respostas BOLD em regiões melhor delimitadas em resposta a tarefas motoras, pacientes que sofreram AVC podem apresentar respostas BOLD em regiões que não estão classicamente relacionadas ao sistema motor (Pineiro, Pendlebury *et al.*, 2001a). Essas diferenças tem duas possíveis explicações. A primeira delas é que devido a lesão das estruturas motoras o cortéx sofreu plasticidade, e as estruturas motoras não clássicas estão realmente engajadas na tarefa motora. A segunda é que o mapa reflete as alterações vasculares dos pacientes com AVC e que podem ser, inclusive, um artefato metodológico assunto tratado em um trabalho recente do nosso grupo, o qual demonstra que o sinal BOLD pode estar alterado em pacientes que sofreram AVC (Mazzetto-Betti, Pontes-Neto *et al.*, 2010).

Baseado nos resultados desse mesmo trabalho, esperávamos encontrar uma redução dos valores de β em pacientes com AVC crônicos, devido a queda da amplitude do sinal BOLD durante a aquisição. Entretanto na Figura 51c notamos que embora a mediana dos valores máximo de beta nos mapas dos sujeitos controle sejam maiores que a mediana relativa à mão parética, essa diferença não foi significativa ($p < 0.1$).

Da mesma forma, também esperávamos encontrar um maior número de ocorrências de valores acima do limiar nos mapas dos sujeitos controle quando comparado com os pacientes, porém mais uma vez a diferença não foi significativa ($p < 0.19$), como é possível notar na Figura 51d.

A fim de responder a pergunta colocada anteriormente, se a resposta motora nos mapas de fMRI em regiões anatômicas não clássicas, seria realmente devido ao engajamento

dessas regiões, mostrando então indícios de plasticidade, ou se seria apenas artefato, devido ao comprometimento da resposta hemodinâmica dos pacientes que sofreram AVC, realizamos o mapeamento do córtex motor pelo técnica de TMS, pois ela realiza medida eletrofisiológicas, sendo menos afetada pela alteração da vasorreatividade.

Assim, primeiramente realizamos um estudo das características dos mapas de TMS, como anteriormente feito para os mapas de fMRI, e em seguida realizamos uma comparação entre os dois mapas. A Figura 52 traz os resultados das características dos mapas de TMS em resposta ao pulso de TMS aplicado sobre o córtex motor da mão parética e sadia de pacientes com AVC crônico e indivíduos saudáveis. As características avaliadas para os mapas de TMS foram a entropia do mapa de TMS (5x5 pixels), mostrado na Figura 52a e o número de ocorrências de pixels que possuíam amplitude maior do que 50µV, mostrado na Figura 52b.

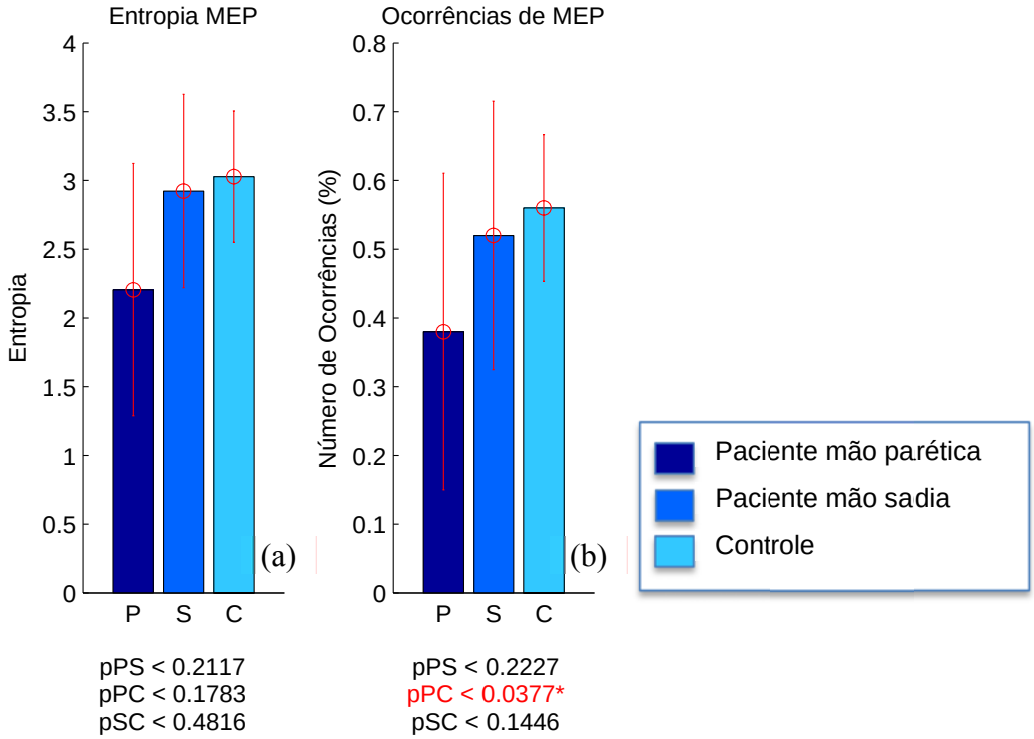


Figura 52. Resultados das análises dos mapas de MEP da mão parética e sadia de pacientes com AVC crônico e indivíduos saudáveis. (a) Entropia do mapa de 5x5 pixels; (b) Número de células que obtiveram MEP acima de 50µV. pPS representa o p valor da comparação entre o grupo de pacientes mão parética e pacientes mão sadia; pPC representa o p valor da comparação entre o grupo de pacientes mão parética e sujeitos controle; pSC representa o p valor da comparação entre o grupo de pacientes mão sadia e sujeitos controle.

A Figura 52a revela comportamento oposto ao da Figura 51a e Figura 51b, que trata da entropia dos mapas funcionais, sendo que a entropia para o mapa de TMS dos controles foi maior do que no hemisfério afetado dos pacientes. Embora esse resultado possa parecer contraditório pode ser explicado pelo método que foi realizado para o cálculo de entropia. Na equação 7 podemos notar que a entropia é diretamente proporcional a n, que está relacionada ao número de ocorrências em um determinado intervalo do histograma. Como os dados de MEP são todos normalizados devido à grande variação intra e interespecífica, o número de elementos não nulos, dentro da matriz que compões o mapa de TMS, se torna predominante para determinar a entropia do mapa. A Figura 52b confirma essa hipótese, na qual pode-se notar que o número de pixels em que ocorreram os MEPs são maiores no sujeitos controle do que no córtex ipsilesional ($p < 0.04$) e mais que isso, podemos notar que os gráficos de barra das Figura 52a e Figura 52b apresentam comportamento muito parecido, embora na Figura 52a não tenhamos encontrado nenhuma diferença significativa entre os grupos.

Provavelmente essa diferença no número de ocorrências se deve ao fato de que no córtex ipsilesional o número de neurônios com projeção corticoespinhal esteja reduzido em relação ao hemisfério contralesional e dos sujeitos controle. Dessa maneira, a resposta de MEP é reduzida e por consequência, tem-se uma redução no número de ocorrência de MEP no mapeamento.

Aqui vale a pena chamar a atenção para um fato interessante, que embora o teste estatístico tenha rejeitado a maioria das comparações entre os grupos, todos os gráficos apresentam o mesmo comportamento, no qual os resultados obtidos para a mão contralateral ao hemisfério com a lesão e os resultados obtidos para os sujeitos controles, sempre apresentam valores extremos (um é mínimo e o outro é máximo, e vice-versa), enquanto os resultados para a mão ipsilateral ao hemisfério com a lesão, apresenta valores intermediários.

Esse comportamento vai na mesma direção de achados recentes, que encontraram que em pacientes que sofreram AVC unilateral, embora apresentem déficits motores mais severos

na mão contralateral à lesão, a mão ipsilateral também pode apresentar déficits sensoriomotores (Desrosiers, Bourbonnais *et al.*, 1996; Brasil-Neto e De Lima, 2008).

A Figura 53 traz os resultados para as comparações entre os mapas de fMRI e de MEP obtidos da mão parética e sadia de pacientes com AVC crônico e de indivíduos saudáveis. As características avaliadas para a comparação dos mapas de fMRI e TMS foram a correlação cruzada bidimensional entre os mapas de fMRI e TMS; a distância entre as posições de ocupação do pixel que possui o valor máximo de β do mapa de fMRI e do pixels que possui a maior amplitude de MEP do mapa de TMS (Distância pico-pico) e o número de coincidências de valores não nulos (Intersecção AND).

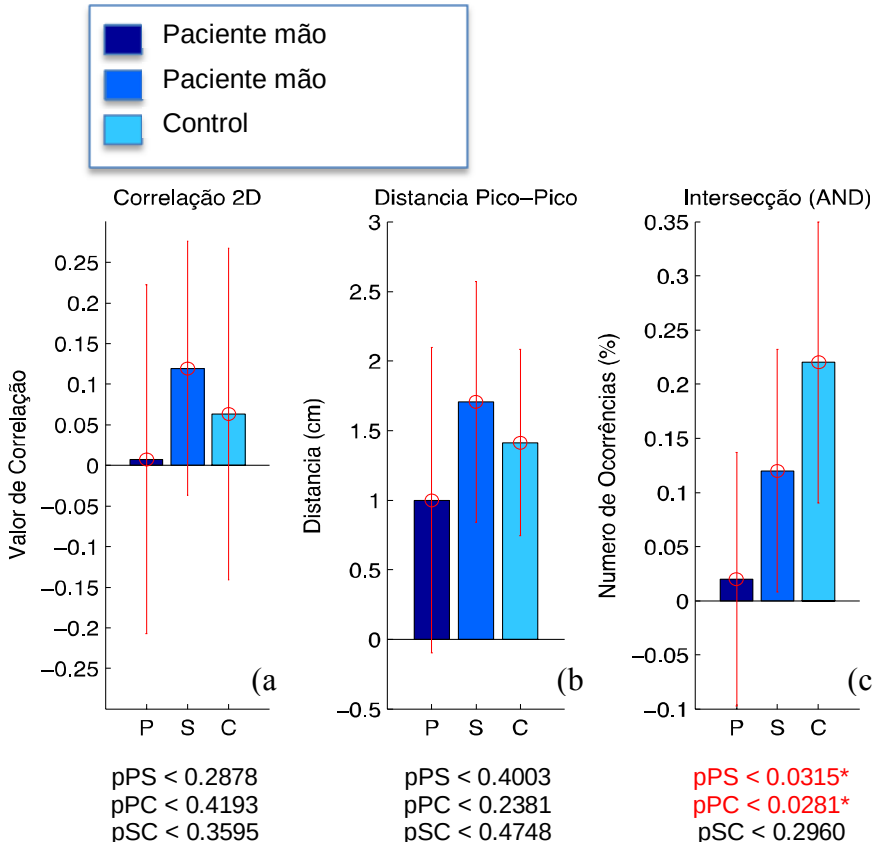


Figura 53. Resultados das comparações entre os mapas de fMRI e TMS. (a) Correlação cruzada bidimensional; (b) Distância euclidiana entre as posições do máximo de β e de máximo valor de MEP; (c) Intersecção tipo "AND", que considera as coincidências de valores não nulos. pPS representa o p valor da comparação entre o grupo de pacientes mão parética e pacientes mão sadia; pPC representa o p valor da comparação entre o grupo de pacientes mão parética e sujeitos controle; pSC representa o p valor da comparação entre o grupo de pacientes mão sadia e sujeitos controle.

Analisando a Figura 53a, podemos notar que os mapas de fMRI e MEP tiveram correlação muito baixa, sendo praticamente indistinguíveis os valores de correlação entre sujeitos controle e pacientes. O coeficiente de correlação é uma boa ferramenta para se comparar comportamentos de duas funções. Entretanto, os mapas de fMRI e MEP são medidas de fenômenos distintos, inclusive de tarefas distintas, e portanto não envolvem exatamente as mesmas regiões corticais na tarefa, muito embora espera-se que regiões correlatas estejam engajadas em ambas tarefas. Sendo assim, o teste de correlação cruzada bidimensional não é o mais apropriado para a comparação entre os mapas de fMRI e MEP. Desse modo, outras análises foram buscadas.

A Figura 53b apresenta a distância média entre o máximo encontrado na fMRI (posição do máximo valor de beta) e o máximo valor encontrado no mapa de TMS (posição da maior amplitude pico a pico). Mais uma vez praticamente não encontramos diferença entre as amostras. Uma possível explicação para isso, e devido a baixa resolução espacial dos mapas, de 1 cm^2, o que torna a medida muito imprecisa, uma vez que nossa ROI tem dimensões de 5 x 5 cm^2.

Como alternativa, transformamos os elementos dos mapas em valores binários, fazendo com que todos os valores acima do limiar valessem 1, e os abaixo, zero. Com isso, os efeitos de flutuação foram reduzidos e um teste de intersecção, realizado. A Figura 53c mostra os resultados da intersecção do tipo “AND” dos mapas de fMRI e MEP, na qual são contadas as coincidências dos valores não nulos.

Fica claro que tanto o lado contralesional quanto os resultados dos sujeitos controles obtiveram valores de intersecção maiores que do hemisfério ipsilesional ($p < 0.03$). Esse achado corrobora os resultados de Manganotti *et al*. (2012), observando redução dos agrupamentos no hemisfério ipsilesional. Além disso, notamos que existe correlação entre os mapas de fMRI e de MEP, prejudicada no hemisfério ipisilesional.

É certo que os mapas de MEP são mais restritivos que os de fMRI, sendo que o primeiro apenas é capaz de encontrar as regiões motoras que têm projeção corticoespinhal, enquanto os mapas de fMRI são sensíveis à atividade das diversas estruturas envolvidas na tarefa motora. Sendo assim podemos esperar que os índices de comparação entre os mapas não seja perfeito. Mesmo assim, nos sujeitos controle foi observada concordância em mais de 20% de regiões significativas nos mapas de fMRI e de MEP, provavelmente relativas ao córtex motor primário e pré-motor, que apresentam projeções corticoespinhais.

Para explicar essa diferença entre os valores de correlação dos pacientes e dos sujeitos controle podemos criar duas hipóteses, a primeira se deve ao fato das repostas hemodinâmicas estarem alteradas no hemisfério com a lesão, produzindo mapas funcionais mais difusos e com valores de β reduzido (Cramer, Nelles *et al.*, 1997). A outra hipótese vem de resultados de alguns estudos que demonstraram que as regiões motoras podem estar deslocadas em pacientes que sofreram AVC, em relação aos sujeitos controle (Pineiro, Pendlebury *et al.*, 2001b). Essa hipótese pode ser levantada quando lembramos que o mapeamento por TMS só é capaz de encontrar as regiões que tem projeção corticoespinhal e quando consideramos a possibilidade do mapeamento de MEP ter sido realizado sobre algumas poucas fibras que tenham restado nas regiões motoras anteriores ao AVC, embora a maioria das unidades motoras tenham migrado para outra posição.

Poderíamos ainda arguir se a baixa intersecção das regiões ativas nos dois mapas para o hemisfério ipsilesional em relação ao hemisfério contralesional e sujeitos controle não seria devido apenas à diferença de ocorrência de atividade em seus mapas (Figura 51d e Figura 52b). Assim, calculamos a razão do número de valores não nulos nos mapas de fMRI e TMS dos sujeitos controle pelo valores não nulos dos mapas de fMRI e TMS dos pacientes.

O valor da razão do número de valores não nulos entre sujeitos controle foi de 3.4, entretanto a razão entre os valores de intersecção (Figura 53c) dos sujeitos controle e o hemisfério com a lesão dos pacientes foi de 11, ou seja, mais de três vezes maior que a razão entre o número de valores não nulos.

Já a razão do número de valores não nulos entre o hemisfério contralesional e ipsilesional, forneceu o quociente 1.66, enquanto que a razão entre os valores de intersecção para esses mesmos hemisférios foi de 6, portanto a razão do número de intersecção é 3,6 vezes maior do que a razão entre os valores não nulos.

Com isso, podemos concluir que o pequeno número de intersecção dos mapas de fMRI e MEP do hemisfério ipsilesional não é devido apenas ao seu menor número de ocorrência em relação aos mapas contralesional e controle, mas sim porque de fato existe uma menor correlação entre os mapas de resposta hemodinâmica e elétrica no córtex lesado.

5.2.2 Avaliação dos efeitos da SES por TMS

A Figura 54 mostra a amplitude dos MEPs pré e pós SES, quando foi realizada a TMS no *hot spot*, dos pacientes que sofreram AVC e dos sujeitos controle.

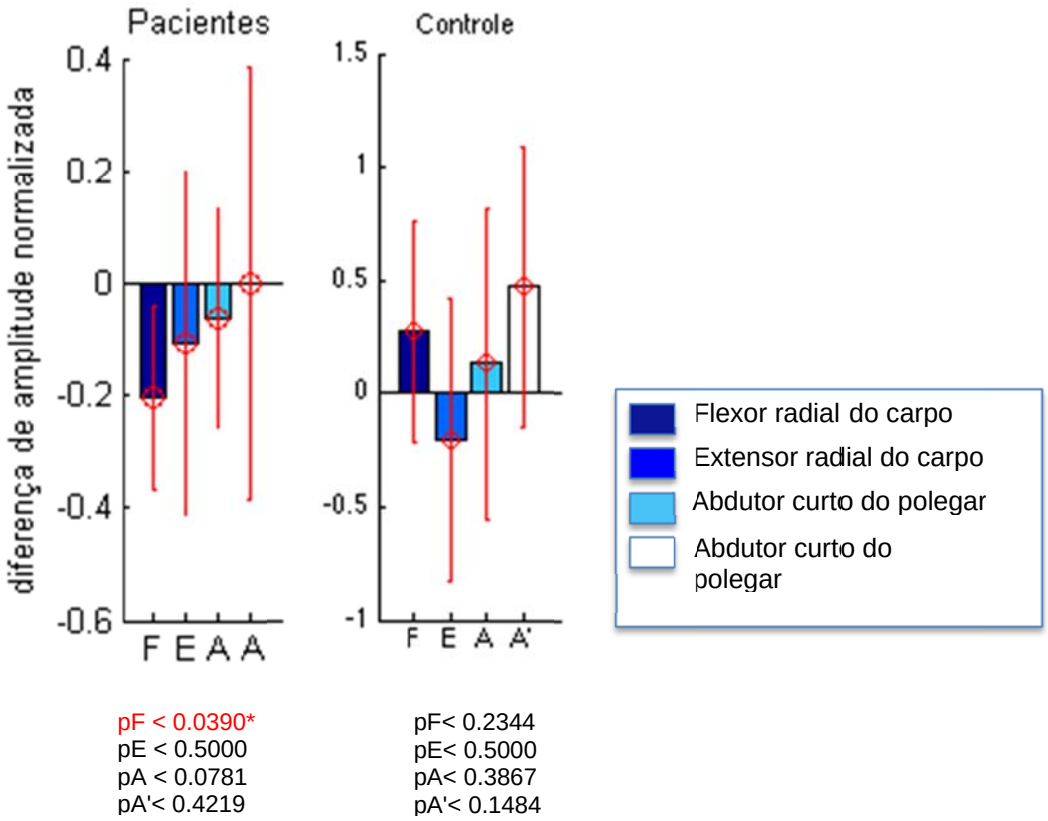


Figura 54. Diferença de amplitude dos MEPs antes e após a SES. (a) Resultados para os pacientes com AVC crônico; (b) Resultados para os indivíduos saudáveis. pF representa o p valor do teste de verificação se os resultados para o músculo flexor radial do carpo são estatisticamente diferentes de zero; pE para o músculo extensor radial do carpo; pA para o abdutor curto do polegar e pA' para o Abdutor curto do polegar contralateral a SES.

Podemos notar que na Figura 54a que, com exceção do abdutor curto do polegar da mão não parética, todas as outras medianas reduziram após a aplicação da SES. O único resultado significativo foi para o músculo flexor radial do carpo que teve um valor associado de $p < 0.039$. Esses resultados são muito similares aos encontrados por Garcia (Garcia, 2011), no qual utilizando os mesmos protocolos de SES e TMS dos apresentados nessa tese, também encontrou redução nos MEPs após a aplicação da SES, inclusive também encontrando o resultado mais expressivo para o flexor radial do carpo.

Os nossos resultados estão em concordância com outros trabalhos na literatura, como é o caso do estudo de Pitcher (Pitcher, Ridding *et al.*, 2003) que também sugerem redução da excitabilidade corticoespinhal após a aplicação SES a 3Hz. Em contrapartida nesse mesmo trabalho, Pitcher conclui que altas frequências (30Hz) podem induzir facilitação prolongada, por mais de 30 minutos, quando os sujeitos eram submetidos a uma única sessão de SES de 30 minutos. Esse resultado chama a atenção para o fato que diferentes frequências podem causar diferentes respostas fisiológicas como também observado por Garcia (Garcia, 2011).

O único músculo que não teve sua mediana reduzida foi o abdutor curto do polegar da mão não afetada, cujo membro não foi realizado SES, já que a SES foi realizada apenas no membro afetado.

Esse resultado também foi encontrado no trabalho de Conforto (Conforto, Dos Santos *et al.*, 2008), no qual não se encontraram nenhuma diferença significativa em nenhum marcador fisiológico no hemisfério não afetado pelo AVC, depois de realizar SES no membro afetado de pacientes com AVC crônico.

Da mesma forma que no hemisfério contralesional de pacientes, não observamos nenhuma alteração significativa nos valores de MEP pré e pós SES nos indivíduos saudáveis (Figura 54b). Ainda, surpreendentemente as medianas dos MEPs relativas aos

músculos flexor e abdutor aumentaram depois da aplicação da SES, embora os valores do teste estatístico tenham sido pouco significativos ($pF < 0.4688$ e $pA < 0.2883$), levando-nos a acreditar que esses aumentos no valor de MEP provavelmente ocorreram devido ao acaso.

Conforto *et.al.* (Conforto, Ferreiro *et al.*, 2010), em um estudo realizado em 2010 não encontraram diferenças significativas nas funções corticais motoras de pacientes subagudos de AVC, quando submetidos a apenas duas intervenções de SES. Entretanto, quando esse número de intervenções foi de 12 vezes distribuídos ao longo de 1 mês, foi observada uma facilitação da excitabilidade corticomotora. Em tal estudo, a autora chama a atenção para o cuidado ao extrapolar resultados de uma única aplicação de SES para efeitos de terapia que devem ser aplicados em várias sessões.

Além da amplitude do MEP, a latência entre a aplicação do estímulo de TMS até o instante em que se iniciou o MEP também foi analisada no presente trabalho. As Figura 55 e Figura 56 trazem os gráficos de barras dos resultados de latência dos pacientes e dos controles.

A Figura 55c, é um resumo das Figura 55a e Figura 55b, sendo que nela mostramos a mediana dos valores de latência de todos os músculos, confrontando os valores dos pacientes com os dos controles.

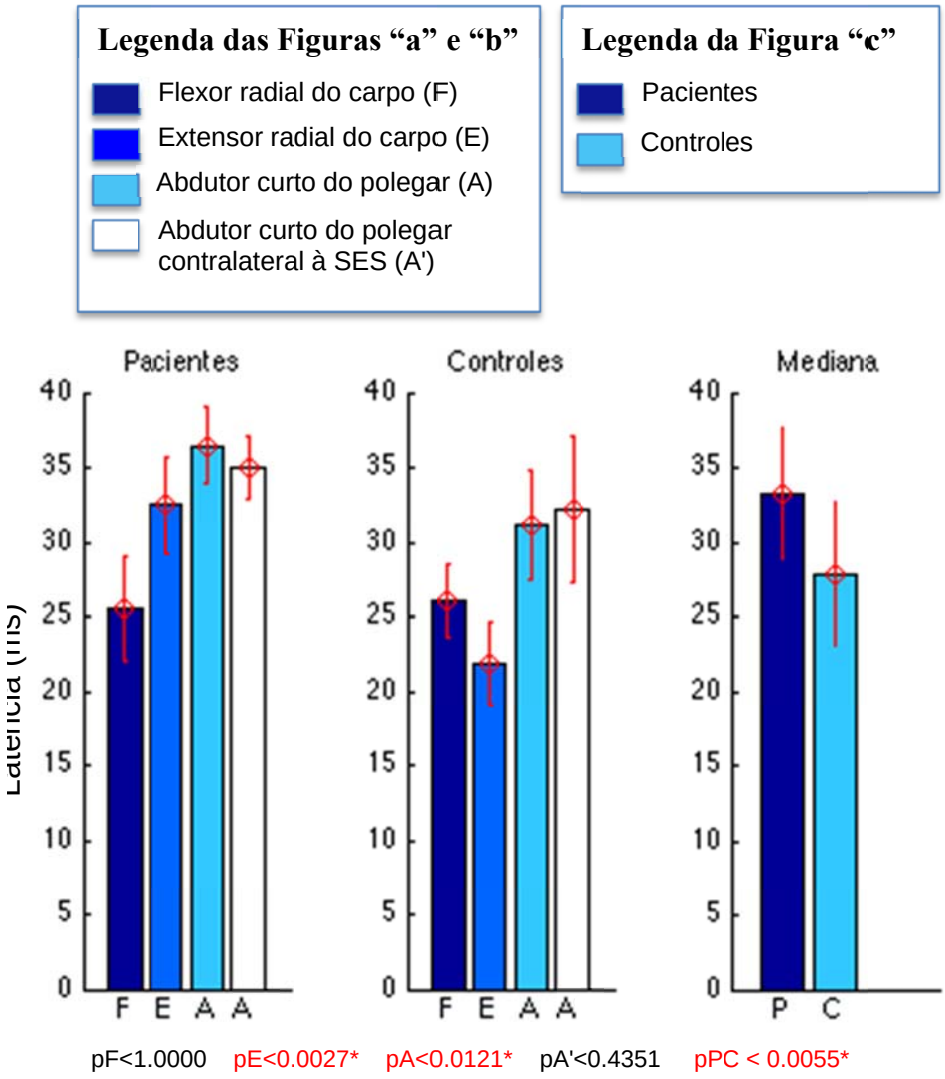


Figura 55. Resultados das análises das latências do MEP antes da aplicação da SES. (a) Resultados para os pacientes com AVC crônico; (b) Resultados para os indivíduos controle; (c) Mediana dos valores de latência de todos os músculos, confrontando os valores dos pacientes com os dos controles. pF representa o p valor do teste de verificação se os resultados para o músculo flexor radial do carpo são estatisticamente diferentes de zero; pE para o músculo extensor radial do carpo; pA para o abdutor curto do polegar e pA' para o Abdutor curto do polegar contralateral a SES.

Pela comparação dos resultados na Figura 55a e Figura 55b, notamos que as latências dos grupamentos musculares extensor radial do carpo e abdutor curto do polegar se encontraram aumentadas nos pacientes em relação aos controles ($p < 0{,}003$ e $p < 0{,}02$ respectivamente). Para avaliar a condição global dos pacientes, comparamos a sua mediana da latência de todos os grupamentos musculares estudados com a media da latência de todos os grupamentos musculares do grupo controle. A Figura 55c mostra essa comparação, na qual

podemos notar que a latência entre o estímulo de TMS até o início do sinal do MEP se encontra aumentado nos pacientes quando comparado com a latência dos controles ($p < 0.006$). Esse resultado corrobora os achados de Gilio e colaboradores (Gilio, Bettolo *et al.*, 2008), que demonstrou que o período silente cutâneo era significativamente maior em pacientes que sofreram AVC do que em sujeitos assintomáticos. Resultados similares também foram encontrados no estudo de Garcia (Garcia, 2011), no qual encontrou que em pacientes hemiparéticos, com AVC, a latência do membro superior afetado é maior do que no membro superior não aetado.

Uma vez que nossos dados sugerem que a latência está aumentada nos pacientes com AVC, procuramos observar se a SES teria algum efeito modulatório da latência. Os resultados são mostrados na Figura 56.

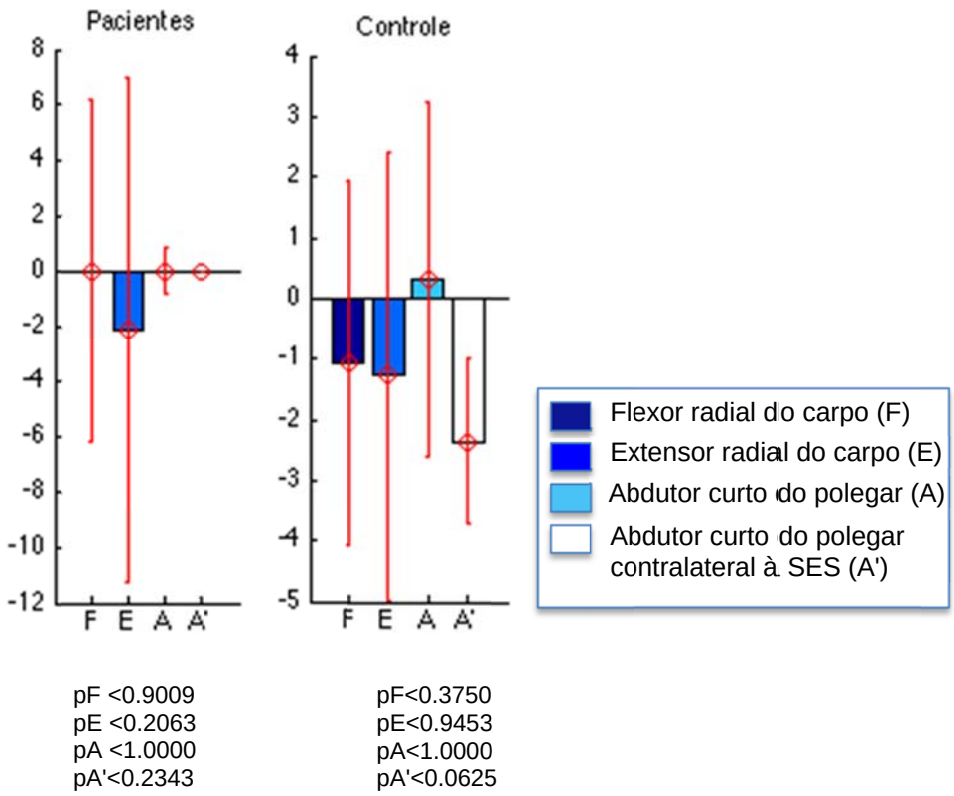


Figura 56. Diferença das latências do MEP antes e após a SES. (a) Resultados para os pacientes com AVC crônico; (b) Resultados para os indivíduos controle. pF representa o p valor do teste de verificação se os resultados para o músculo flexor radial do carpo são estatisticamente diferentes de zero; pE para o músculo extensor radial do carpo; pA para o abdutor curto do polegar e pA' para o Abdutor curto do polegar contralateral a SES.

Analisando as Figura 56a e Figura 56b, não encontramos diferença significativa entre as latências pré e pós SES. No estudo de Garcia (Garcia, 2011) também não encontraram diferenças nas latências ates e após a SES. Embora em outros estudos, como o de Tarlaci (Tarlaci, Turman *et al.*, 2010), mostraram uma redução da latência em pacientes com AVC e sujeitos controle após a aplicação de terapia vibracional acústica.

5.2.3 Avaliação dos efeitos da SES por fMRI

Nessa sessão trazemos os resultados dos experimentos relativos ao efeito da SES na alteração da resposta hemodinâmica. Para tanto mostramos aqui duas análises do mapeamento motor por fMRI antes e após a aplicação da SES para os sujeitos controle. A primeira é uma análise de grupo dos resultados do GLM, no qual mostramos dois contrastes, sendo eles a diferença entre pré e pós-SES e a diferença entre a tarefa realizada pela mão estimulada e tarefa realizada com a mão contralateral à SES. A segunda é uma análise de segundo nível, no qual utilizamos um algoritmos auto-regressivo para (BLM) para estudar as características da resposta hemodinâmicas.

A **Figura 57** traz os resultados dos mapas de fMRI em representação volumétrica da superfície cortical, representados em cinza claro, com exposição dos sulcos, representados em cinza escuro. Os mapas de cores representam a diferença entre a os mapas obtidos do GLM para a tarefa motora após e antes da SES.

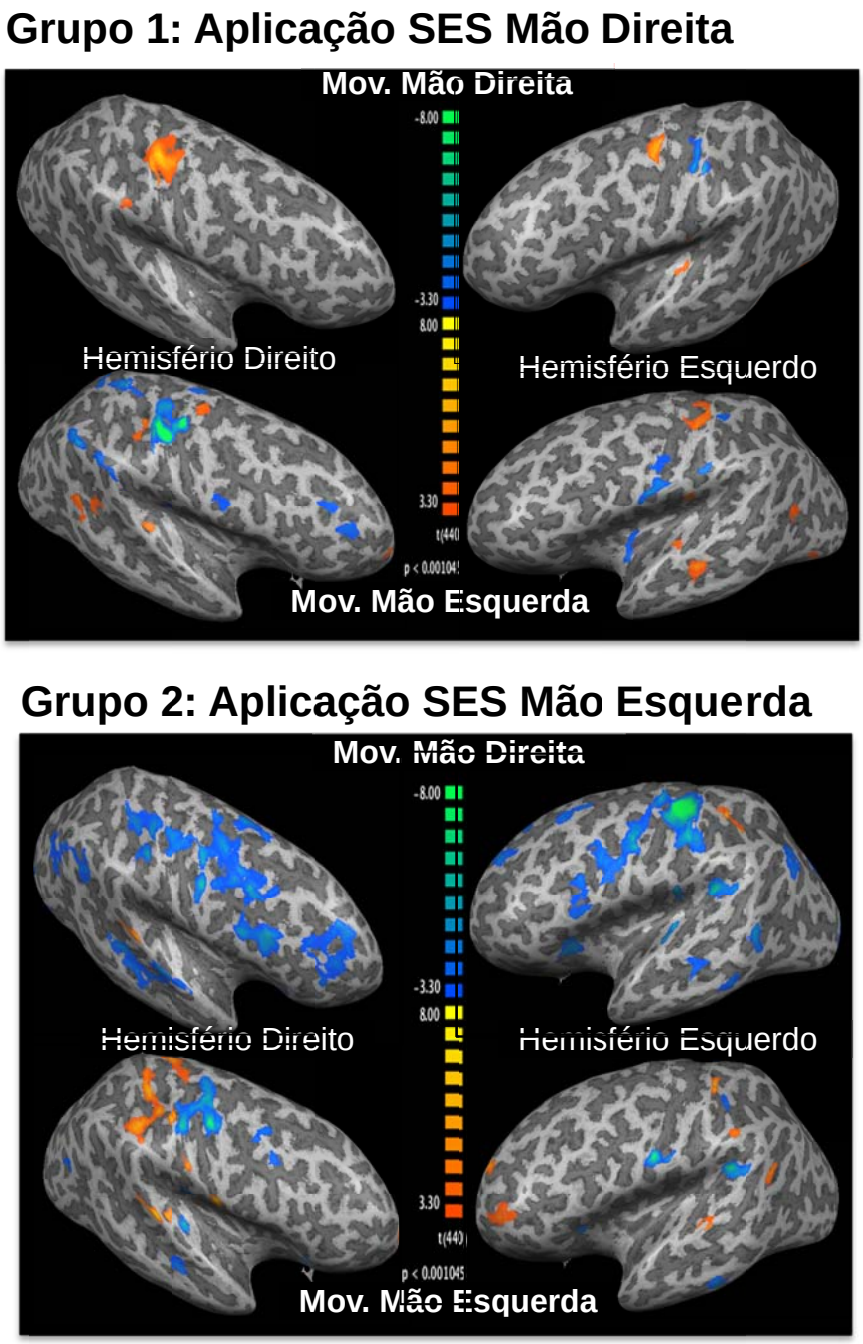


Figura 57. Mapas de fMRI em representação volumétrica da superfície cortical (cinza claro) com exposição dos sulcos (cinza escuro). Os mapas de cores representam a diferença entre a os valores obtidos do GLM para a tarefa motora

Para realizarmos a análise quantitativa criamos a tabela 1. Essa tabela contém o número de voxels da **Figura 57** que apresentaram significância estatística acima do limiar escolhido (FDR = 0.05), dividido pelas áreas de Brodmann relativas ao processamento motor e somatossensorial.

Tabela 1: Número de voxels nas VOIs obtidos pela diferença entre tarefa antes da SES e tarefa motara depois da SES					
Áreas de Brodmann	**Hemisfério**	**N de voxels fmriD_sesD**	**N de voxels fmriD_sesE**	**N de voxels fmriE_sesE**	**N de voxels fmriE_sesD**
1	Esquerdo	21	17	0	0
1	Direito	0	0	0	11
2	Esquerdo	422	204	0	0
2	Direito	104	0	59	113
3	Esquerdo	142	1011	77	0
3	Direito	701	9	420	524
4	Esquerdo	744	971	87	0
4	Direito	208	331	814	194
5	Esquerdo	11	0	0	0
5	Direito	5	0	48	0
6	Esquerdo	366	1260	869	1
6	Direito	106	2175	238	0

Olhando para a **Figura 57**, notamos que quando a SES é feita na mesma mão que é realizada a tarefa, nos pacientes que receberam a estimulação à direita aparentemente ocorre um aumento de sinal no hemisfério ipsilateral ao movimento enquanto que no hemisfério contralateral pouco efeito da SES pode ser notado, embora notamos um pequeno aumento da sinal no giro pré-central e uma pequena redução no pós central. Esse resultado corrobora os resultados de Kimberley (Kimberley, Lewis *et al.*, 2004) a qual seguiram os pacientes com AVC durante 10 dias fazendo estimulações diárias de 6 horas, não observaram diferenças significativas no número de voxels ativos pré e pós terapia, porém encontraram aumento do sinal no giro pós-central ipsilateral a mão estimulada, que também era a mão parética, que realizou a tarefa.

Entretanto, quando olhamos para as fMRI realizadas com tarefa e SES na mão esquerda, observamos redução do sinal BOLD no sulco central e giro pré-central, enquanto observamos aumento do sinal BOLD no pós-central do hemisfério contralateral, e não encontramos praticamente nenhuma alteração no hemisfério ipsilateral.

O aumento do sinal BOLD no giro pós-central também foi encontrado em outros trabalhos como o de Khaslavskaia (Khaslavskaia, Klucharev *et al.*, 2006) no qual observaram aumento no número de voxels acima do limiar depois da estimulação elétrica repetitiva no córtex somatossensorial, e no trabalho de Wu (Wu, Van Gelderen *et al.*, 2005) que observaram aumento no número de voxels acima do limiar e na amplitude do sinal BOLD no córtex motor primário e somatossensorial depois de duas horas de estimulação elétrica no músculo deltóide e no nervo mediano.

Agora um resultado bastante interessante foi quando a SES foi aplicada em um braço e a tarefa da fMRI realizada com a mão do braço não estimulado. Nesses experimentos observamos redução do sinal BOLD no hemisfério contralateral à tarefa e aumento do sinal BOLD no hemisfério ipsilateral à tarefa, quando a SES foi realizada no braço direito, e observamos redução do sinal BOLD em ambos hemisférios para a SES aplicada a esquerda, sendo nesse caso, a maior redução na região do córtex motor primário contralateral ao movimento. Uma hipótese que podemos levantar é que a SES estaria excitando o córtex contralateral à SES, portanto ipsilateral à tarefa, que por sua vez estaria inibindo o hemisfério contralateral à tarefa. Entretanto, na fMRI da estimulação à esquerda, também observamos redução do sinal no hemisfério ipsilateral ao movimento. Assim, para compreender melhor o efeito da SES aplicada no membro que não realiza a tarefa fizemos a diferença as fMRI relativa à SES aplicada na mesma mão da tarefa e as fMRI relativas a tarefa realizada com a mão contralateral a SES.

A Figura 58 ilustra os resultados dos mapas de fMRI em representação volumétrica da superfície cortical, representados em cinza claro, com exposição dos sulcos, representados em cinza escuro. Os mapas de cores representam a diferença entre a tarefa realizada pela mão estimulada (pós menos pré-SES) e tarefa realizada com a mão contralateral à SES (pós menos pré-SES).

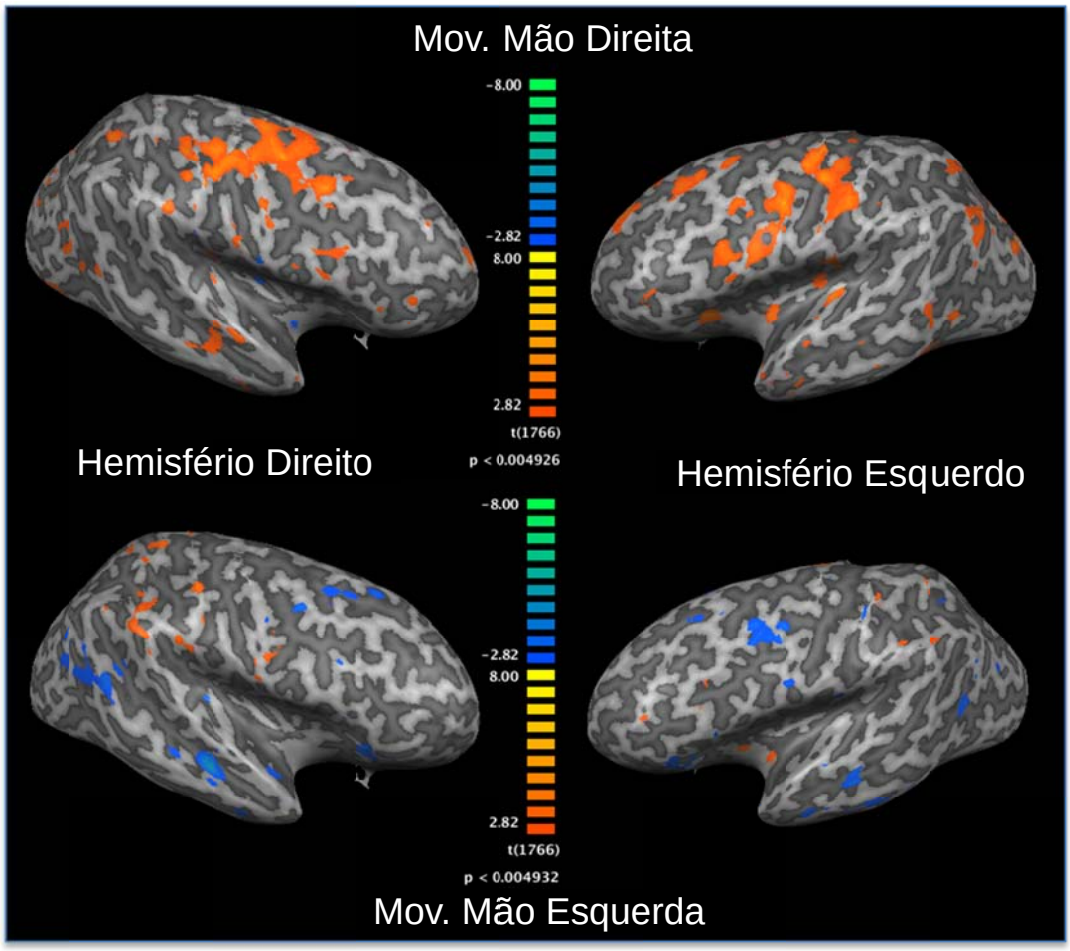


Figura 58. Mapas de fMRI em representação volumétrica da superfície cortical (cinza claro) com exposição dos sulcos (cinza escuro). Os mapas de cores representam a diferença entre a os valores obtidos do GLM para a tarefa motora do braço ipsilateral a SES e braço contralateral a SES.

Como feito para a análise pós menos pré-SES, também criamos a tabela 2 que contém o número de voxels que apresentaram significância estatística acima do limiar escolhido (FDR = 0.05), para a diferença entre a os valores obtidos do GLM para a tarefa motora do braço ipsilateral a SES e braço contralateral a SES. Os resultados foram dividido pelas áreas de Brodmann relativas ao processamento motor e somatossensorial.

Tabela2: Número de voxels nas VOIs obtidos pela diferença entre tarefa motora ipsilateral à SES e tarefa motora contralateral à SES			
Áreas de Brodmann	**Hemisfério**	**N de voxels fMRI Direita**	**N de voxels fMRI Esquerda**
1	Esquerdo	0	56
1	Direito	0	11
2	Esquerdo	0	2
2	Direito	0	54
3	Esquerdo	0	18
3	Direito	0	133
4	Esquerdo	209	0
4	Direito	26	86
5	Esquerdo	0	1
5	Direito	0	128
6	Esquerdo	492	1172
6	Direito	1280	204

Na Figura 58 observamos que o contraste é positivo para a tarefa realizada com a mão direita. Isso indica que o sinal BOLD está aumentado nas fMRI relativas à mão que recebeu a SES e realizou tarefa quando comparadas as fMRI relativas à mão contralateral à SES. Porém, quando o movimento é realizado com a mão esquerda, a variação é muito menor do que a diferença observada quando o movimento é realizado com a mão direita, inclusive sendo negativo em algumas regiões.

Assim, um ponto importante que deve ser levantando aqui é se a dominância dos sujeitos influenciaram nos resultados. A nossa amostra foi composta por 6 indivíduos destros e 2 canhotos, assim no primeiro caso onde o movimento foi realizado com a mão direita, temos que o contraste é devido a subtração entre a fMRI que recebeu a SES no braço dominante menos a SES realizada no braço não dominante para a maioria dos sujeitos, já quando a tarefa é realizada com o braço esquerdo temos a situação contrária, a subtração foi feita as fMRI que receberam SES no braço não dominante pelas que receberam SES no braço dominante. Esse resultado sugere então, que o efeito modulatório da SES é maior quando

aplicado no braço dominante, entretanto essa hipótese deve ser testada em um desenho experimental dedicado à esse fim.

Partimos então para a análise quantitativa da resposta hemodinâmica utilizando o algoritmo BLM. Para tanto os resultados obtidos foram divididos dois grupos, relativos à área de Brodmann 4 (motor primário) e Brodmann 6 (pré-motor e motor suplementar). Dentro de cada um dos grupos, separamos os resultados mais uma vez em outros dois grupos: (i) resultados para as fMRI realizadas com a mão estimulada (tanto direita quanto esquerda) e (ii) resultados para as fMRI realizadas com a mão contralateral a SES (tanto direita quanto esquerda).

A Figura 59 mostra os resultados do BLM em gráficos de barra para a área de Brodmann 4, e a Figura 60 mostra os resultados do BLM em gráficos de barra para a área de Brodmann 6.

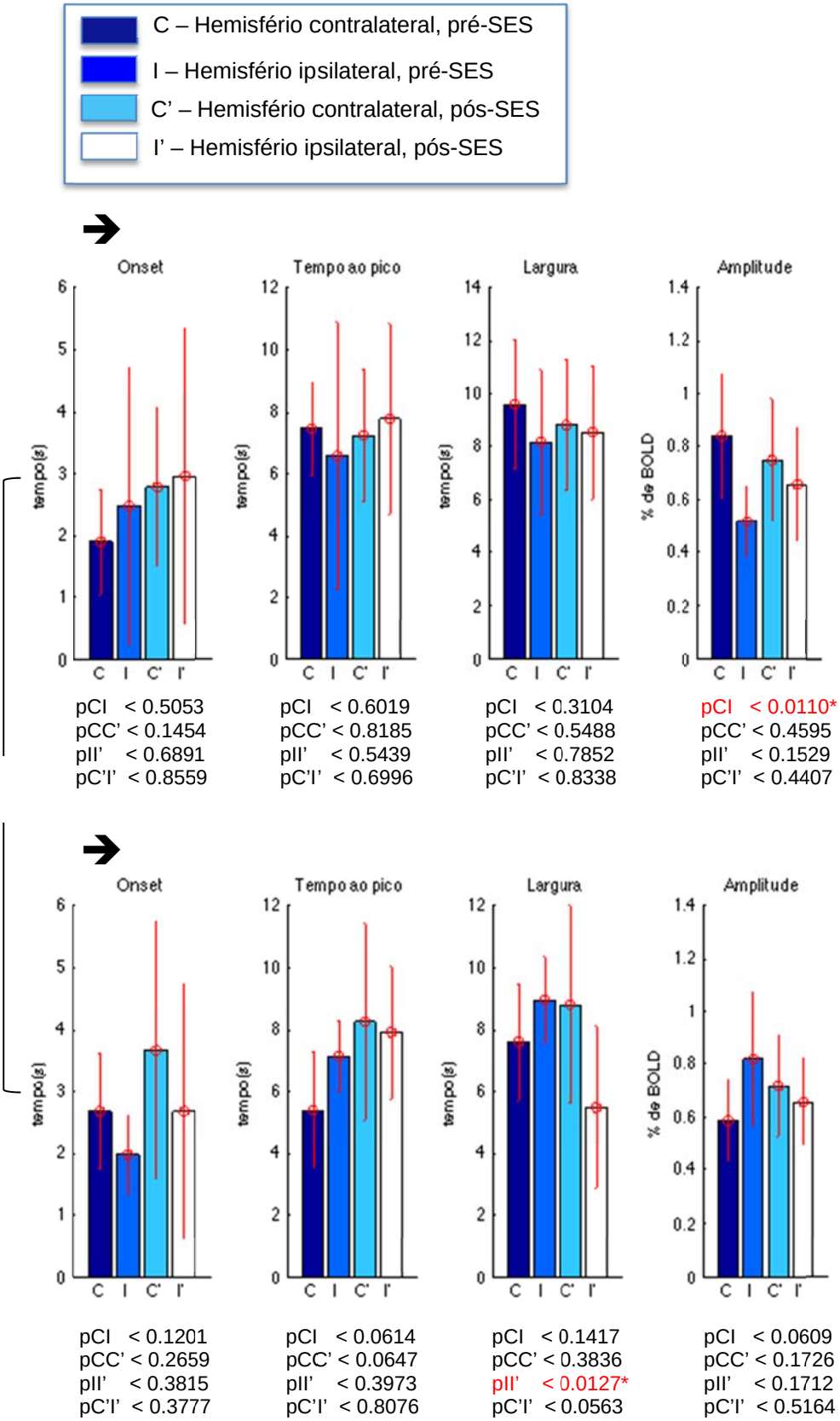


Figura 59. Resultados do algoritmo BLM nas análises da área de Brodmann 4, antes e após a aplicação da SES em indivíduos controle. (a) Onset, tempo do início da tarefa até iniciar a resposta hemodonâmica; (b) Tempo ao pico, tempo entre o início do sinal até o máximo por ele atingido; (c) Largura a meia altura da resposta hemodinâmica; (d) Amplitude do sinal da resposta hemodinâmica. Sendo pCI, pCC', pII' e pC'I' o p valor dos teste estatísticos para a comparação entre duas condições.

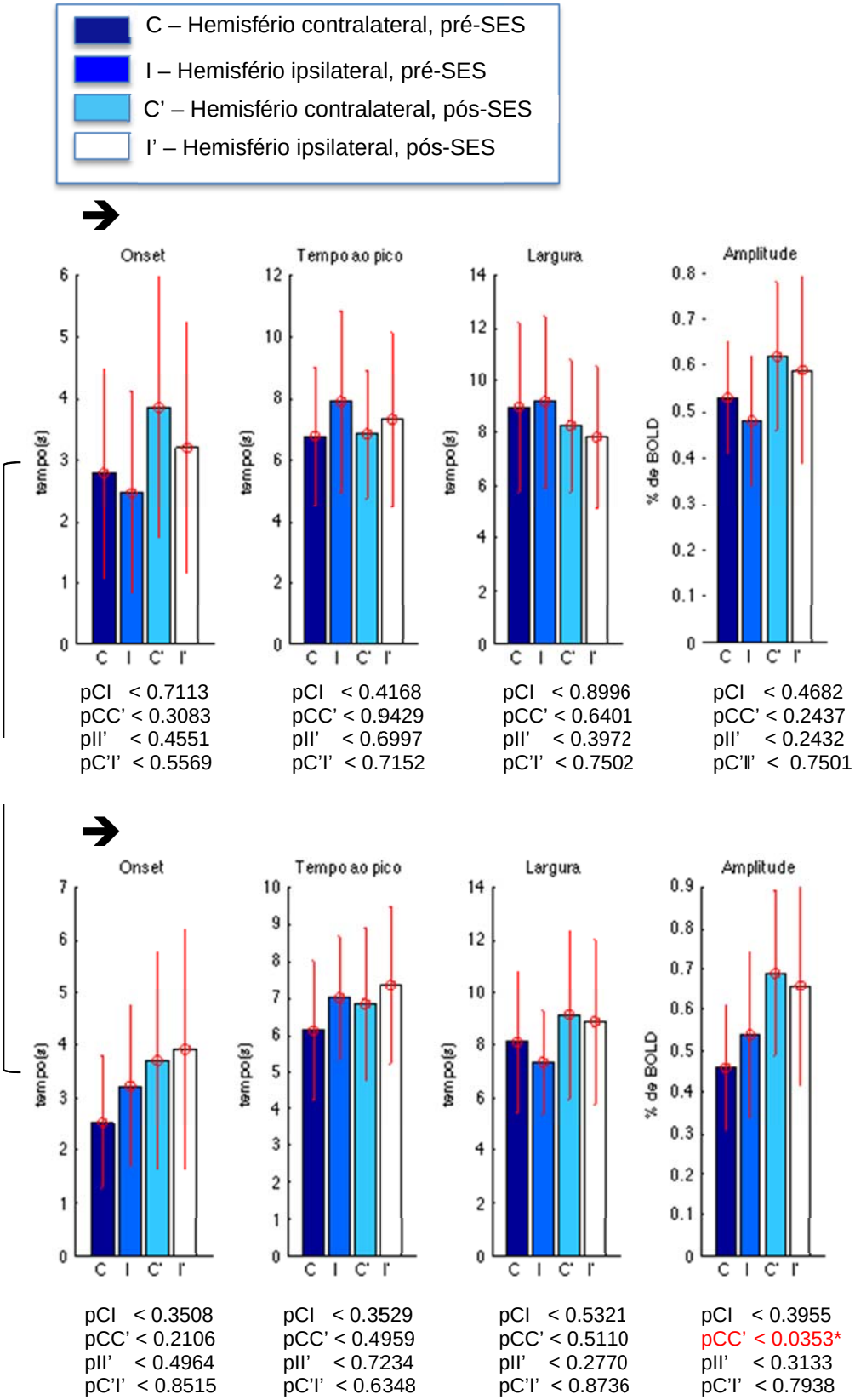


Figura 60. Resultados do algoritmo BLM nas análises da área de Brodmann 6, antes e após a aplicação da SES em indivíduos controle. (a) Onset, tempo do início da tarefa até iniciar a resposta hemodonâmica; (b) Tempo ao pico, tempo entre o início do sinal até o máximo por ele atingido; (c) Largura a meia altura da resposta hemodinâmica; (d) Amplitude do sinal da resposta hemodinâmica. Sendo pCI, pCC', pII' e pC'I' o p valor dos teste estatísticos para a comparação entre duas condições.

Observando as Figura 59 e Figura 60, não encontramos nenhuma diferença significativa em nenhum dos grupos para o tempo de onset e tempo ao pico (Figura 59a, 59b, Figura 60a e 60b). Para a largura a meia altura encontramos uma redução significativa após a SES na área de Brodmann 4 do hemisfério ipsilateral à tarefa quando comparado com a mesma região antes da SES, quando a tarefa foi realizada com a mão contralateral à que recebeu a SES ($p < 0,02$) (Figura 59c - Tarefa com a mão não estimulada). Como o onset e o tempo ao pico não tiveram alterações depois da aplicação da SES, então a diminuição da largura a meia altura da resposta hemodinâmica deve estar relacionada com o encurtamento do sinal. Uma provável causa desse encurtamento, seria que a vasoconstrição, depois da vasodilatação devido a despolarização de uma região cerebral, estaria ocorrendo mais rapidamente após a SES.

Encontramos também que o hemisfério contralateral à tarefa da área de Brodmann 4, Figura 59d (Tarefa com a mão estimulada) do estudo na qual a mão que realizou a tarefa foi a mesma que recebeu a SES, apresenta a amplitude do sinal aumentada com relação ao hemisfério ipsilateral à tarefa, antes de receber qualquer intervenção ($p < 0,02$). Esse resultado é esperado, pois em sujeitos assintomáticos espera-se que o hemisfério contralateral à tarefa esteja mais engajado do que o hemisfério ipsilateral que pode ser medido pelo índice de lateralização (Marshall, Perera *et al.*, 2000; Pineiro, Pendlebury *et al.*, 2001a). Entretanto, após a realização da SES não se observa nenhuma diferença significativa entre os hemisférios contra e ipsilateral.

Por fim analisando a Figura 60d (Tarefa com a mão não estimulada), observamos que o hemisfério contralateral à tarefa, portanto ipsilateral à SES apresentou aumento do sinal BOLD após a SES quando comparado com a mesma região antes da realização da SES ($p < 0,04$). No trabalho de Wu (Wu, Van Gelderen *et al.*, 2005) foi observado aumento do sinal no giro pré-central, entretanto nesse trabalho a estimulação elétrica era realizada na mesma mão

que recebia a estimulação. Como em nossos dados a SES foi realizada na mão contralateral a mão da tarefa, nossos resultados sugerem que mesmo a SES sendo aplicada no membro contralateral à tarefa, a SES ainda preservaria os efeitos modulatórios do córtex motor.

Uma consideração que deve ser feita nessa sessão é o fato dos resultados terem apresentado algumas divergências, por exemplo, a Figura 59d (Tarefa realizada com a mão não estimulada) não apresentar diferença significativa entre os hemisférios contra e ipsilateral antes da aplicação da SES. Bem como a alteração significativa da amplitude do sinal BOLD só ocorrer nos resultados mostrados na Figura 60d (Tarefa com a mão não estimulada), sendo que a resposta que era mais esperada seria no hemisfério contralateral quando a tarefa é realizada com a mão estimulada.

Conclusões

6.1 Desenvolvimento tecnológico

Nossos resultados mostraram que o mapeamento vetorial de campo magnético por MRI de fase demonstrou ser uma boa alternativa para medir campos complexos, como os produzidos pelas bobinas de TMS tanto em fantomas quanto em seres humanos. Esse mapeamento também foi utilizado para ajudar no desenvolvimento de arranjo de bobinas mais sofisticadas, que em nosso estudo, foram destinadas à estimulação de estruturas periféricas e pequenos animais.

Essas bobinas produzem um campo elétrico induzido mais focalizado com decaimento mais rápido com a distância em relação as bobinas convencionais utilizadas em TMS. Com isso as suas dimensões tendem a ser menores, aumentando o problema de aquecimento, que por sua vez foi solucionado com o desenvolvimento de dois sistema de arrefecimento.

Também foi objetivo desse trabalho o desenvolvimento de um sistema de neuronavegação, Neuronavegador InVesalius, baseado em um modelo de software livre, i.e., gratuito e de código aberto. Esse sistema permite o corregistro da cabeça de indivíduos com suas respectivas neuroimagens, bem como instrumentos médicos, como bisturis e cânulas, e até mesmo com o as bobinas de TMS, possibilitando ver a distribuição do campo nas estruturas cerebrais em tempo real.

Outros dois programas computacionais completam a etapa de desenvolvimento tecnológicos, o MEPHunter e o TMSProjection. O MEPHunter foi desenvolvido para realizar análises de MEPs em sinais contínuos de EMG, com ferramentas específicas para mapeamento do córtex motor por TMS. O TMSProjection é uma ferramenta para integrar as informações do MEPHunter com as do Neuronavegador InVesalius, permitindo comparar os mapas de MEP com neuroimagens, mais especificamente fMRI.

6.2 Aplicações em Pacientes com AVC

6.2.1 Correlação entre os mapas de MEP e de fMRI

Nossos dados mostraram uma correlação maior entre os mapas de MEP e os mapas de fMRI, nos sujeitos normais do que nos pacientes com AVC, principalmente no hemisfério afetado. Muito provavelmente essa diminuição de correlação nos pacientes se deve ao fato das repostas hemodinâmicas estarem alteradas no hemisfério ipsilesional, produzindo mapas funcionais mais difusos, como mostra nosso resultado de medida de entropia, no qual os valores nos pacientes aparecem aumentados em relação aos controles. Outra hipótese é a de que o mapeamento de MEP pode ter sido realizado sobre algumas poucas fibras que tenham restado nas regiões motoras anteriores ao AVC, embora boa parte das redes motoras tenham migrado para outra posição. Assim como os exames de fMRI identificam todas as áreas relacionadas à atividade motora, enquanto os exames de TMS trazem informação apenas de regiões que possuem projeções corticoespinais, pode ter ocorrido uma discrepância entre os dois mapas.

6.2.2 Avaliação dos efeitos da SES por TMS e fMRI

Nossos resultados corroboram com diversos estudos da literatura, o quais sugerem que a SES pode provocar modulação na excitabilidade cortical motora. Sendo mais específico, acreditamos que a SES aplicada a 3Hz em uma única sessão de 30 minutos é capaz de causar uma diminuição dos MEP do córtex motora primário. Já nos resultados obtidos com a técnica de fMRI apresentaram muita flutuação estatística, desses não permitindo nenhuma afirmação conclusiva.

Considarações Finais

Desde o início em 2006 nosso grupo tinha por objetivo a criação de ferramentas e protocolos que pudessem trazer melhorias para a técnica de TMS, e que fossem de livre acesso para toda a comunidade científica. Esse objetivo se estendeu em quatro projetos de Iniciação Ciêntífica, dois projeto de Mestrado e esse projeto de Doutorado. No decorrer desses seis anos nós criamos o Neuronavegador InVesalius, que possui ferramentas específicas para TMS e fMRI, o MEPHunter, programa de análise de EMG com ferramentas específicas para mapeamento do córtex motor e o TMSProjection, um programa que realiza o corregistro dos mapas de MEP e fMRI, integrando as duas primeiras plataformas.

O InVesalius (Martins, Barbara *et al.*, 2008) é um *software* brasileiro inicialmente desenvolvido pelo Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer (CTI) para criar modelos virtuais tridimensionais de estruturas anatômicas a partir de imagens médicas tomográficas. O objetivo inicial da proposta foi a produção de peças por prototipagem rápida. Em 2008 foi firmada uma parceria das Instituições CTI e USP para a implementação do neuronavegador já desenvolvido no Laboratório de Biomagnetismo (Peres, Souza *et al.*, 2010) na base do InVesalius. Em 2010 foram feitos os primeiros testes com o protótipo e no início de 2011 foi rodado o primeiro experimento em pacientes com a utilização do Neuronavegador InVesalius.

Atualmente o software se encontra na sua terceira versão e está hospedado no portal do Software Público do Ministério da Ciência e Tecnologia (Portal do Software Público: InVesalius, 2007). A sua utilização se estende para diversas áreas da medicina e como o InVesalius é um software livre, hoje conta com diversos colaboradores no seu desenvolvimento.

O MEPHunter e o TMSProjection ainda estão em desenvolvimento, porém assim como o Neuronavegador InVesalius, nós pretendemos disponibilizá-los gratuitamente para

download. Por hora, para a obtenção dos softwares será necessário entrar em contato com o autor.

As ferramentas de mapeamento de campo, desenvolvidas ao longo desses seis anos, possibilitam a aplicação de protocolos de controle de qualidade em TMS, ainda muito pouco difundidos. Entretanto, a implementação das ferramentas computacionais ainda se encontram em uma fase intermediária, não sendo possível ainda a sua utilização por usuários finais, porém, assim como os outros programas desenvolvidos, essas rotinas também devem ser disponibilizadas para *download*.

A coleta dos dados foi realizada por uma equipe multidisciplinar composta por pesquisadores do Labaratório de Biomagnetismo – DF – FFCLRP/USP, do Laboratório de Doenças Cérebro Vascular FMRP/USP, do Núcleo de Estudos do Movimento Humano (NEMoH) da EEFD/UFRJ e do Laboratório de Neurobiologia II – IBCCF/UFRJ, durante dois meses no início do ano de 2011. A finalização dos programas MEPHunter e TMSProjection, bem como os processamento dos sinais de MEP e as análises dos resultados foram realizadas no segundo semestre de 2011 e no primeiro semestre de 2012 no Laboratório NeuroImago ICe/UFRN.

Perspectivas Futuras

O desenvolvimento de programas computacionais é um processo contínuo. Nesse sentido, sempre estamos adicionando novas ferramentas em nossos programas. A nossa intenção é que cada vez mais as plataformas desenvolvidas estejam integradas, e mais do que isso, possam se integrar com outras plataformas já existentes, e que de preferencia sejam livres. A Seguir segue uma lista das ferramentas que deverão ser implementadas em nossos programas.

➔Neuronavegador InVesalius

- Implementar ferramentas de sobreposição de imagens para visualização de fMRI, e dar suporte para formato de imagem médica NIfTI, para integração com o programa SPM.

- Criação de ferramentas de medida de ângulo de instrumentos em relação ao crânio, como por exemplo, para aumentar a precisão do posicionamento da bobina de TMS.

- Criação de saída de trigger, para sincronização com outros equipamentos, permitindo, por exemplo, o dispara automático do TMS quando a bobina estiver devidamente posicionada em uma posição pré-selecionada.

➔ MEPHunter

- Dar suporte a outros modelos de EMG, como por exemplo, equipamentos de HDsEMG.

- Possibilitar mapeamento com diferentes geometrias, por exemplo, mapeamento em espiral.

- Possibilitar a análise de sinais provenientes de outros sistemas de medida, que não seja EMG, por exemplo, análise de séries temporais de fMRI para se obter informação de latência, amplitude, etc.

➔ TMSProjection

- Criar ferramentas que possibilitem alteração de orientações das imagens volumétricas manualmente.

- Inserir as rotinas de *unwrapping* e sobreposição dos mapas de campo magnético, para a geração dos mapas vetoriais no código do TMSProjection. Criando assim, uma interface gráfica para os algoritmos de mapeamento de campo magnético.

➔ Estudos em pacientes com AVC

Com relação aos estudos em pacientes com AVC, nós pretendemos selecionar mais um grupo de pacientes e voluntários para a realização do experimento de fMRI, aumentando assim nosso espaço amostral, sendo que com esse novo experimento esperamos melhorar nossos índices estatísticos e com isso permitir outras análises ainda não realizadas, como por exemplo, avaliar alterações na conectividade entre os agrupamentos ativos na tarefa motora antes e após a aplicação da SES. Pretendemos também selecionar um grupo mais restrito, levando em conta a dominância dos membros superiores, evitando assim um possível viés.

Referências

ALTSCHULER, E. et al. Rehabilitation of hemiparesis after stroke with a mirror. **Lancet,** v. 353, n. 9169, p. 2035-2036, JUN 12 1999 1999. ISSN 0140-6736.

BANDETTINI, P. A. et al. PROCESSING STRATEGIES FOR TIME-COURSE DATA SETS IN FUNCTIONAL MRI OF THE HUMAN BRAIN. **Magnetic Resonance in Medicine,** v. 30, n. 2, p. 161-173, Aug 1993. ISSN 0740-3194. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1993LP88200003 >.

BARKER, A. T.; JALINOUS, R. NON-INVASIVE MAGNETIC STIMULATION OF HUMAN MOTOR CORTEX. **Lancet,** v. 1, n. 8437, p. 1106-1107, 1985. ISSN 0140-6736.

BARKER, A. T.; JALINOUS, R.; FREESTON, I. L. Non-invasive magnetic stimulation of human motor cortex. **Lancet,** v. 1, n. 8437, p. 1106-7, May 1985. ISSN 0140-6736. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2860322 >.

BISCHOFF, C. et al. Comparison of various coils used for magnetic stimulation of peripheral motor nerves: Physiological considerations and consequences for diagnostic use. **Electromyography and Motor Control-Electroencephalography and Clinical Neurophysiology,** v. 97, n. 6, p. 332-340, 1995. ISSN 0924-980X.

BRASIL-NETO, J. P.; DE LIMA, A. C. Sensory Deficits in the Unaffected Hand of Hemiparetic Stroke Patients. **Cognitive and Behavioral Neurology,** v. 21, n. 4, Dec 2008. ISSN 1543-3633. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000262217000002 >.

BRASIL-NETO, J. P. et al. Topographic mapping of the human motor cortex with magnetic stimulation: factors affecting accuracy and reproducibility. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology/Evoked Potentials Section,** v. 85, n. 1, p. 9-16, 1992. ISSN 0168-5597. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/B6SYY-482RBW9-15/2/7ca233c6cff6ec33676e80e0e90596fc >.

CABELLA, B. C. T. et al. Generalized relative entropy in functional magnetic resonance imaging. **Physica a-Statistical Mechanics and Its Applications,** v. 388, n. 1, p. 41-50, 2009. ISSN 0378-4371.

_____. A numerical study of the Kullback-Leibler distance in functional magnetic resonance imaging. **Brazilian Journal of Physics,** v. 38, n. 1, p. 20-25, 2008. ISSN 0103-9733.

CHARLTON, C. S. et al. Prolonged peripheral nerve stimulation induces persistent changes in excitability of human motor cortex. **Journal of the Neurological Sciences,** v. 208, n. 1-2, Apr 15 2003. ISSN 0022-510X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000181923400012 >.

CHIPCHASE, L. S.; SCHABRUN, S. M.; HODGES, P. W. Peripheral electrical stimulation to induce cortical plasticity: A systematic review of stimulus parameters. **Clinical Neurophysiology,** v. 122, n. 3, Mar 2011. ISSN 1388-2457. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000286456300008 >.

CLARE, S. et al. Detecting activations in event-related fMRI using analysis of variance. **Magnetic Resonance in Medicine,** v. 42, n. 6, Dec 1999. ISSN 0740-3194. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000083959300016 >.

CONFORTO, A. et al. Impact of coil position and electrophysiological monitoring on determination of motor thresholds to transcranial magnetic stimulation. **Clinical Neurophysiology,** v. 115, n. 4, p. 812-819, APR 2004 2004. ISSN 1388-2457.

CONFORTO, A. B. et al. Effects of somatosensory stimulation on motor function in chronic cortico-subcortical strokes. **Journal of Neurology,** v. 254, n. 3, p. 333-339, Mar 2007. ISSN 0340-5354. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000244837000009 >.

_____. EFFECTS OF SOMATOSENSORY STIMULATION ON THE EXCITABILITY OF THE UNAFFECTED HEMISPHERE IN CHRONIC STROKE PATIENTS. **Clinics,** v. 63, n. 6, p. 735-740, 2008 2008. ISSN 1807-5932. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000261418600004 >.

_____. Effects of Somatosensory Stimulation on Motor Function After Subacute Stroke. **Neurorehabilitation and Neural Repair,** v. 24, n. 3, p. 263-272, Mar 2010. ISSN 1545-9683. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000274586500006 >.

_____. Impact of coil position and electrophysiological monitoring on determination of motor thresholds to transcranial magnetic stimulation. **Clinical Neurophysiology,** v. 115, n. 4, p. 812-819, 2004. ISSN 1388-2457. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VNP-4B8P5T0-4/2/30424b1f3043680cf319840f720817a7 >.

CRAMER, S. C. et al. A functional MRI study of subjects recovered from hemiparetic stroke. **Stroke,** v. 28, n. 12, p. 2518-2527, Dec 1997. ISSN 0039-2499. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997YL15700033 >.

CUSACK, R.; PAPADAKIS, N. New robust 3-D phase unwrapping algorithms: Application to magnetic field mapping and undistorting echoplanar images. **Neuroimage,** v. 16, n. 3, p. 754-764, 2002. ISSN 1053-8119.

DE ARAUJO, D. B. et al. Shannon entropy applied to the analysis of event-related fMRI time series. **Neuroimage,** v. 20, n. 1, p. 311-317, 2003. ISSN 1053-8119.

DESROSIERS, J. et al. Performance of the 'unaffected' upper extremity of elderly stroke patients. **Stroke,** v. 27, n. 9, p. 1564-1570, SEP 1996 1996. ISSN 0039-2499.

ESTOMBELO-MONTESCO, C. A. et al. Detection of Auditory Cortex Activity by fMRI Using a Dependent Component Analysis. **Brain Inspired Cognitive Systems 2008,** v. 657, p. 135-145, 2010 2010. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000276322400007 >.

FRASER, C. et al. Driving plasticity in human adult motor cortex is associated with improved motor function after brain injury. **Neuron,** v. 34, n. 5, May 30 2002. ISSN 0896-6273. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000175951800016 >.

FUKUMURA, K. et al. Influence of mirror therapy on human motor cortex. **International Journal of Neuroscience,** v. 117, n. 7, p. 1039-1048, JUL 2007 2007. ISSN 0020-7454.

FUNASE, K. et al. Increased corticospinal excitability during direct observation of self-movement and indirect observation with a mirror box. **Neurosci Lett,** v. 419, n. 2, p. 108-12, May 2007. ISSN 0304-3940. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17481817 >.

GARCIA, M. A. C. **Efeito Modulatório Agudo da Eletroestimulação Somatossensorial Aplicada em Diferentes Frequências na Excitabilidade Corticoespinhal** 2011. 170 (Doutorado). COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro

GARRY, M.; LOFTUS, A.; SUMMERS, J. Mirror, mirror on the wall: viewing a mirror reflection of unilateral hand movements facilitates ipsilateral M1 excitability. **Experimental Brain Research,** v. 163, n. 1, p. 118-122, MAY 2005 2005. ISSN 0014-4819.

GILIO, F. et al. Influence of the corticospinal tract on the cutaneous silent period: A study in patients with pyramidal syndrome. **Neuroscience Letters,** v. 433, n. 2, p. 109-113, Mar 12 2008. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000254440000007 >.

GLOVER, G. H. MULTIPOINT DIXON TECHNIQUE FOR WATER AND FAT PROTON AND SUSCEPTIBILITY IMAGING. **Jmri-Journal of Magnetic Resonance Imaging,** v. 1, n. 5, p. 521-530, 1991. ISSN 1053-1807.

GOEBEL, R.; ESPOSITO, F.; FORMISANO, E. Analysis of Functional Image Analysis Contest (FIAC) data with BrainVoyager QX: From single-subject to cortically aligned group general linear model analysis and self-organizing group independent component analysis. **Human Brain Mapping,** v. 27, n. 5, May 2006. ISSN 1065-9471. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000237145800005 >.

GUGGISBERG, A. G. et al. Motor evoked potentials from masseter muscle induced by transcranial magnetic stimulation of the pyramidal tract: the importance of coil orientation. **Clinical Neurophysiology,** v. 112, n. 12, Dec 2001. ISSN 1388-2457. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000172935800017 >.

HALLETT, M. Transcranial magnetic stimulation and the human brain. **Nature,** v. 406, n. 6792, Jul 13 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000088221100036 >.

HALLETT, M. Transcranial magnetic stimulation: A primer. **Neuron,** v. 55, n. 2, p. 187-199, Jul 2007. ISSN 0896-6273. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000248635800005 >.

HAMZEI, F. et al. Two different reorganization patterns after rehabilitative therapy: An exploratory study with fMRI and TMS. **Neuroimage,** v. 31, n. 2, p. 710-720, 2006. ISSN 1053-8119. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000238232100026 >.

HERNANDEZ-GARCIA, L.; LEE, S.; GRISSOM, W. An approach to MRI-based dosimetry for transcranial magnetic stimulation. **Neuroimage,** v. 36, n. 4, p. 1171-1178, Jul 15 2007. ISSN 1053-8119. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000248152400011 >.

HUETTEL, S. A.; SONG, A. W.; MACCARTHY, G. **Functional Magnetic Resonance Imaging**. 1st. Sinauer Associates, 2004. ISBN 0-87893-288-7.

ISI Web of Knowledge. Disponível em: < http://www.isiknowledge.com >. Acesso em: August 9.

JULKUNEN, P. et al. Comparison of navigated and non-navigated transcranial magnetic stimulation for motor cortex mapping, motor threshold and motor evoked potentials. **Neuroimage,** v. 44, n. 3, Feb 1 2009. ISSN 1053-8119. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000262301500019 >.

KHASLAVSKAIA, S. et al. The effect of repetitive electrical stimulation on the motor evoked hemodynamic responses. **International Journal of Neuroscience,** v. 116, n. 3, Mar 2006. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000235683500010 >.

KIMBERLEY, T. J. et al. Electrical stimulation driving functional improvements and cortical changes in subjects with stroke. **Experimental Brain Research,** v. 154, n. 4, p. 450-460, Feb 2004. ISSN 0014-4819. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000188670200008 >.

KOSKI, L.; MERNAR, T. J.; DOBKIN, B. H. Immediate and long-term changes in corticomotor output in response to rehabilitation: correlation with functional improvements in chronic stroke. **Neurorehabil Neural Repair,** v. 18, n. 4, p. 230-49, Dec 2004. ISSN 1545-9683. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15537994 >.

LEONI, R. F. et al. Quantitative evaluation of hemodynamic response after hypercapnia among different brain territories by fMRI. **Neuroimage,** v. 41, n. 4, p. 1192-1198, 2008. ISSN 1053-8119.

LEVKOVITZ, Y. et al. A randomized controlled feasibility and safety study of deep transcranial magnetic stimulation. **Clinical Neurophysiology,** v. 118, n. 12, p. 2730-2744, 2007. ISSN 1388-2457.

LUFT, A. R. et al. Transcranial magnetic stimulation in the rat. **Experimental Brain Research,** v. 140, n. 1, p. 112-121, 2001. ISSN 0014-4819.

MACDONELL, R. A. L. et al. Motor cortex localization using functional MRI and transcranial magnetic stimulation. **Neurology,** v. 53, n. 7, p. 1462-1467, Oct 1999. ISSN 0028-3878. Disponível em: < <Go to ISI>://000083180400016 >.

MANGANOTTI, P. et al. Effect of median-nerve electrical stimulation on BOLD activity in acute ischemic stroke patients. **Clinical Neurophysiology,** v. 123, n. 1, p. 142-153, Jan 2012. ISSN 1388-2457. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000298324800020 >.

MARLER, J. R. et al. TISSUE-PLASMINOGEN ACTIVATOR FOR ACUTE ISCHEMIC STROKE. **New England Journal of Medicine,** v. 333, n. 24, p. 1581-1587, Dec 1995. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1995TK06500001 >.

MARSHALL, R. S. et al. Evolution of cortical activation during recovery from corticospinal tract infarction. **Stroke,** v. 31, n. 3, p. 656-661, Mar 2000. ISSN 0039-2499. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000085614700015 >.

MARTINS, T. et al. InVesalius: Three-dimensional medical reconstruction software. **Virtual and Rapid Manufacturing**, p. 135-141, 2008.

MATSUMOTO, H. et al. Magnetic stimulation of the cauda equina in the spinal canal with a flat, large round coil. **Journal of the Neurological Sciences,** v. 284, n. 1-2, p. 46-51, 2009. ISSN 0022-510X.

MAZZETTO-BETTI, K. C. et al. The Stability of the Blood Oxygenation Level-Dependent Functional MRI Response to Motor Tasks Is Altered in Patients With Chronic Ischemic Stroke. **Stroke,** v. 41, n. 9, p. 1921-1926, Sep 2010. ISSN 0039-2499. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000281503000013 >.

_____. BOLD Response Stability is Altered Patients With Chronic Ischemic Stroke. **Stroke,** v. 41, n. 4, p. E370-E370, Apr 2010. ISSN 0039-2499. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000276106100701 >.

MCKEOWN, M. J. et al. Analysis of fMRI data by blind separation into independent spatial components. **Human Brain Mapping,** v. 6, n. 3, 1998 1998. ISSN 1065-9471. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000073916100005 >.

MERCIER, C. et al. Mapping phantom movement representations in the motor cortex of amputees. **Brain,** v. 129, p. 2202-2210, Aug 2006. ISSN 0006-8950. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000239900600026 >.

MICHIELSEN, M. et al. The neuronal correlates of mirror therapy: an fMRI study on mirror induced visual illusions in patients with stroke. **Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry,** v. 82, n. 4, p. 393-398, APR 2011 2011. ISSN 0022-3050.

MICHIELSEN, M. E. et al. Motor recovery and cortical reorganization after mirror therapy in chronic stroke patients: a phase II randomized controlled trial. **Neurorehabil Neural Repair,** v. 25, n. 3, p. 223-33, 2011 Mar-Apr 2011. ISSN 1552-6844. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21051765 >.

MINISTÉRIO-DA-SAÚDE. PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS - TROMBÓLISE NO ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO AGUDO http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2012/anexo/anexo_prt0664_12_04_2012.pdf, p. Portaria Nº 664, 2012. Acesso em: 17/08/2012.

MORTIFEE, P. et al. RELIABILITY OF TRANSCRANIAL MAGNETIC STIMULATION FOR MAPPING THE HUMAN MOTOR CORTEX. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology,** v. 93, n. 2, Apr 1994. ISSN 0013-4694. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1994NH90100007 >.

MOURAO-MIRANDA, J. et al. Classifying brain states and determining the discriminating activation patterns: Support Vector Machine on functional MRI data. **Neuroimage,** v. 28, n. 4, Dec 2005. ISSN 1053-8119. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000234015300023 >.

NAIR, D. G. et al. Imaging correlates of motor recovery from cerebral infarction and their physiological significance in well-recovered patients. **Neuroimage,** v. 34, n. 1, p. 253-263, 2007. ISSN 1053-8119. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000242735300025 >.

NICHOLS, T. E.; HOLMES, A. P. Nonparametric permutation tests for functional neuroimaging: A primer with examples. **Human Brain Mapping,** v. 15, n. 1, Jan 2002. ISSN 1065-9471. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000172887500001 >.

O'SULLIVAN, S. B.; SCHMITZ, T. J. **Fisioterapia: Avaliação e Tratamento**. 3. 2004.

PERES, A. S. C. **Implementação de um sistema de localização espacial de regiões cerebrais em tempo real para aplicação de TMS por co-registro com fMRI**. 2008. (Mestrado). Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59135/tde-21052009-151939/en.php.

PERES, A. S. C. et al. Real-Time Spatial Localization System of Brain Regions for TMS Application by Co-registration with fMRI. In: SUSAC, S. S. A. A., 17th International Conference on Biomagnetism Advances in Biomagnetism – Biomag 2010, 2010, Heidelberg. Springer. p.92-96.

PINEIRO, R. et al. Functional MRI detects posterior shifts in primary sensorimotor cortex activation after stroke - Evidence of local adaptive reorganization? **Stroke,** v. 32, n. 5, p. 1134-1139, May 2001a. ISSN 0039-2499. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000168577200019 >.

_____. Functional MRI detects posterior shifts in primary sensorimotor cortex activation after stroke: evidence of local adaptive reorganization? **Stroke,** v. 32, n. 5, p. 1134-9, May 2001b. ISSN 1524-4628. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ 11340222 >.

PITCHER, J. B.; RIDDING, M. C.; MILES, T. S. Frequency-dependent, bi-directional plasticity in motor cortex of human adults. **Clinical Neurophysiology,** v. 114, n. 7, p. 1265-1271, Jul 2003. ISSN 1388-2457. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000184168100014 >.

Portal do Software Público: InVesalius. http://www.softwarepublico.gov.br/ver-comunidade?community_id=626732, 2007. Acesso em: 2012.

RAMACHANDRAN, V.; ROGERSRAMACHANDRAN, D. Synaesthesia in phantom limbs induced with mirrors. **Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences,** v. 263, n. 1369, p. 377-386, APR 22 1996 1996. ISSN 0962-8452.

RICHARDS, L. G. et al. Movement-dependent stroke recovery: A systematic review and meta-analysis of TMS and fMR1 evidence. **Neuropsychologia,** v. 46, n. 1, p. 3-11, 2008. ISSN 0028-3932. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000253362300002 >.

RIDDING, M. C. et al. Changes in muscle responses to stimulation of the motor cortex induced by peripheral nerve stimulation in human subjects. **Experimental Brain Research,** v. 131, n. 1, Mar 2000. ISSN 0014-4819. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000087790200014 >.

_____. Changes in corticomotor representations induced by prolonged peripheral nerve stimulation in humans. **Clinical Neurophysiology,** v. 112, n. 8, Aug 2001. ISSN 1388-2457. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000170253600012 >.

RIDDING, M. C.; TAYLOR, J. L. Mechanisms of motor-evoked potential facilitation following prolonged dual peripheral and central stimulation in humans. **Journal of Physiology-London,** v. 537, n. 2, Dec 1 2001. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000172624700028 >.

ROSSI, S. et al. Safety, ethical considerations, and application guidelines for the use of transcranial magnetic stimulation in clinical practice and research. **Clinical Neurophysiology,** v. 120, n. 12, Dec 2009. ISSN 1388-2457. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000273017600006 >.

ROSSINI, P. M. et al. Non-invasive electrical and magnetic stimulation of the brain, spinal cord and roots: basic principles and procedures for routine clinical application. Report of an IFCN committee. **Electroencephalogr Clin Neurophysiol,** v. 91, n. 2, p. 79-92, Aug 1994. ISSN 0013-4694 (Print) 0013-4694 (Linking).

SARFELD, A.-S. et al. Convergence of human brain mapping tools: Neuronavigated TMS Parameters and fMRI activity in the hand motor area. **Human Brain Mapping,** v. 33, n. 5, May 2012. ISSN 1065-9471. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000302533100008 >.

SATHIAN, K.; GREENSPAN, A.; WOLF, S. Doing it with mirrors: A case study of a novel approach to neurorehabilitation. **Neurorehabilitation and Neural Repair,** v. 14, n. 1, p. 73-76, 2000 2000. ISSN 0888-4390.

STURZBECHER, M. J. et al. Non-extensive entropy and the extraction of BOLD spatial information in event-related functional MRI. **Physics in Medicine and Biology,** v. 54, n. 1, p. 161-174, 2009. ISSN 0031-9155.

SULLIVAN, J. E.; HEDMAN, L. D. A home program of sensory and neuromuscular electrical stimulation with upper-limb task practice in a patient 5 years after a stroke. **Physical Therapy,** v. 84, n. 11, Nov 2004. ISSN 0031-9023. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000224903200002 >.

TALELLI, P.; GREENWOOD, R. J.; ROTHWELL, J. C. Arm function after stroke: Neurophysiological correlates and recovery mechanisms assessed by transcranial magnetic stimulation. **Clinical Neurophysiology,** v. 117, n. 8, p. 1641-1659, 2006. ISSN 1388-2457. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000239876700003 >.

TARLACI, S. et al. Differential Effects of Peripheral Vibration on Motor-Evoked Potentials in Acute Stages of Stroke. **Neuromodulation,** v. 13, n. 3, p. 232-236, Jul 2010. ISSN 1094-7159. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000279764700027 >.

TEDESCHI, W. et al. Generalized mutual information fMRI analysis: a study of the Tsallis q parameter. **Physica a-Statistical Mechanics and Its Applications,** v. 344, n. 3-4, p. 705-711, 2004. ISSN 0378-4371.

_____. Generalized mutual information tests applied to fMRI analysis. **Physica a-Statistical Mechanics and Its Applications,** v. 352, n. 2-4, p. 629-644, 2005. ISSN 0378-4371.

THICKBROOM, G. W.; SAMMUT, R.; MASTAGLIA, F. L. Magnetic stimulation mapping of motor cortex: factors contributing to map area. **Electromyography and Motor Control-Electroencephalography and Clinical Neurophysiology,** v. 109, n. 2, Apr 1998. ISSN 0924-980X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000073376300001 >.

THIELSCHER, A.; KAMMER, T. Electric field properties of two commercial figure-8 coils in TMS: calculation of focality and efficiency. **Clinical Neurophysiology,** v. 115, n. 7, Jul 2004. ISSN 1388-2457. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000222814800024 >.

TINAZZI, M. et al. Long-lasting modulation of human motor cortex following prolonged transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) of forearm muscles: evidence of reciprocal inhibition and facilitation. **Experimental Brain Research,** v. 161, n. 4, p. 457-464, 2005. ISSN 0014-4819. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000227442900006 >.

TISCHLER, H. et al. Mini-coil for magnetic stimulation in the behaving primate. **Journal of Neuroscience Methods,** v. 194, n. 2, Jan 15 2011. ISSN 0165-0270. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000289923100006 >.

TOMASI, D.; PANEPUCCI, H. Magnetic fields mapping with the phase reference method. **Magnetic Resonance Imaging,** v. 17, n. 1, p. 157-160, 1999. ISSN 0730-725X.

UY, J.; RIDDING, M. C. Increased cortical excitability induced by transcranial DC and peripheral nerve stimulation. **Journal of Neuroscience Methods,** v. 127, n. 2, Aug 15 2003. ISSN 0165-0270. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000184850300008 >.

VARGAS, C. D. et al. The influence of hand posture on corticospinal excitability during motor imagery: A transcranial magnetic stimulation study. **Cerebral Cortex,** v. 14, n. 11, Nov 2004. ISSN 1047-3211. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000224360100003 >.

WENDICKE, K. et al. **Device for stimulation of body tissue, has magnetic coil arrangement, which has two side by side mirror-symmetric coil areas arranged next to each other in large parts out spiral to turn wound electrical conductors**: Schwarzer Gmbh.

WILSON, S. A.; THICKBROOM, G. W.; MASTAGLIA, F. L. TRANSCRANIAL MAGNETIC STIMULATION MAPPING OF THE MOTOR CORTEX IN NORMAL SUBJECTS - THE REPRESENTATION OF 2 INTRINSIC HAND MUSCLES. **Journal of the Neurological Sciences,** v. 118, n. 2, Sep 1993. ISSN 0022-510X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1993LV96500004 >.

WORLD HEALTH, O. ***World health statistics***. Geneva: World Health Organization. 2008.

WU, C. W. H. et al. Enduring representational plasticity after somatosensory stimulation. **Neuroimage,** v. 27, n. 4, p. 872-884, Oct 2005. ISSN 1053-8119. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000232141200016 >.

YAVUZER, G. et al. Mirror therapy improves hand function in subacute stroke: a randomized controlled trial. **Arch Phys Med Rehabil,** v. 89, n. 3, p. 393-8, Mar 2008. ISSN 1532-821X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18295613 >.

Z'GRAGGEN, W. J. et al. Mapping of direction and muscle representation in the human primary motor cortex controlling thumb movements. **Journal of Physiology-London,** v. 587, n. 9, May 1 2009. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000265617000015 >.

ZIEMANN, U. TMS and drugs. **Clinical Neurophysiology,** v. 115, n. 8, p. 1717-1729, Aug 2004. ISSN 1388-2457. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000223591700001 >.

Anexos

ANEXO I

Tabela 1: Escala de Ashworth	
Grau	Característica
0	Tônus muscular normal.
1	Leve aumento do tônus muscular, manifestado por tensão momentânea ou por mínima resistência no final da amplitude do movimento, quando a região afetada é movida em extensão ou flexão.
1+	Leve aumento do tônus muscular, manifestado por tensão abrupta, seguido de resistência mínima em menos da metade da amplitude do movimento restante.
2	Aumento mais marcante do tônus muscular durante a maior parte da amplitude do movimento, mas a região afetada é movida facilmente.
3	Considerável aumento do tônus muscular. O movimento passivo é fácil.
4	Parte rígida em flexão ou extensão.

ANEXO II

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.usp.br

USP - RIBEIRÃO
assistência - ensino - pesquisa

Ribeirão Preto, 10 de novembro de 2010

Ofício nº 3777/2010
CEP/MGV

Prezado Senhor,

O trabalho intitulado **"TERAPIA DE ELETROESTIMULAÇÃO PARA ESPASTICIDADE EM PACIENTES COM ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL"** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 314ª Reunião Ordinária realizada em 08/11/2010 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido,** de acordo com o Processo HCRP nº 8728/2010.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
ANDRÉ SALLES CUNHA PERES
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP – Depto. de Física e Matemática

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP - Campus Universitário
FWA – 0000 2733; IRB – 0000 2186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP