Universidade de São Paulo
Instituto de Física de São Carlos
Departamento de Física e Informática

Implementação da Técnica de Espectroscopia *in Vivo* por RMN e sua Aplicação na Fisiologia do Exercício.

USP / IFQSC / SBI
8-2-001162

Maria do Rosário Zucchi

Dissertação apresentada ao Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências: Física Básica.

Orientador: Prof. Dr. Tito José Bonagamba

São Carlos
1997

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

Zucchi, Maria do Rosário
Implementação da Técnica de Espectroscopia *in Vivo* por RMN e sua Aplicação na Fisiologia do Exercício/Maria do Rosário Zucchi. - São Carlos, 1997.
69 p.

Tese (Mestrado)-Instituto de Física de São Carlos, 1997.

Orientador: Prof. Dr.Tito José Bonagamba

1.Ressonância magnética. 2. Espectroscopia *in vivo*.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Instituto de Física de São Carlos

Av. Dr. Carlos botelho, 1465
CEP 13560-250 - São Carlos - SP
Brasil

Fone (016) 274-3444
Fax (016) 272-2218

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE **MARIA DO ROSÁRIO ZUCCHI** APRESENTADA AO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS, DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 17 DE ABRIL DE 1997.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Tito José Bonagamba/IFSC-USP

Prof. Dr. Claudio José Magon/IFSC-USP

Dr. Luiz Alberto Colnago/EMBRAPA

"...quando vier a perfeição, o que é limitado desaparecerá;
agora vemos em espelho e de maneira confusa,
mas depois veremos face a face..."

(Coríntios I-13)

Dedico este trabalho
à meus pais

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

Agradecimentos:

Ao Prof. Dr. Tito José Bonagamba, por sua dedicada orientação, pelo grande incentivo e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Horácio Carlos Panepucci pelas dicas, discussões e pelo interesse neste trabalho.

Ao engenheiro e técnico do grupo de Ressonância Edson Luiz Géa Vidoto pela disponibilidade e vital ajuda neste projeto.

Ao pessoal da UFSCar: a Prof. Drª. Tânia de Fátima Salvini, e aos alunos de pós graduação, Alexandre, Cláudio e André pelas discussões, pela preparação dos animais e pela indispensável ajuda durante as medidas.

Aos técnicos José Carlos Gazziro, Odir Adolfo Canevarollo e João Gomes da Silva e ao engenheiro Mateus José Martins por toda ajuda, e colaboração durante este trabalho.

Ao Henrique pela ajuda computacional e pela amizade.

A secretária do grupo (Leila), ao pessoal da biblioteca (Mara, Neusa, Cibele, Betânia, etc) e ao pessoal da seção de alunos (Beth e Wlá.) por toda ajuda.

Amigos do laboratório: Nilson, Marquinhos, Giotto, Ana Carolina, Alessandro, Paulinho, Fábio e a desertora Ednalva; e aos amigos do Grupo de Ressonância: Eduardo, Bráulio, Ruberley, Roberto, Rodrigo, Rogério, pela amizade.

Aos amigos Jabáh, Esponja, Alexandre, Érika, Fernandão, Fernandinho, Suzana, Claudinha & familia; ao Prof. Renê, Iná, Elisa e Júlio pela amizade. E as amigas de república: Cristiane e Ligia pela louca convivência e sincera amizade.

Aos meus pais Ivani e Mathilde, por todo carinho e pelo apoio.

A minha irmã Maria Imaculada pelo incentivo e carinho, e a toda minha família pela alegria.

As cobaias, sem as quais não seria possível a realização deste trabalho.

A todo pessoal da Ressonância que com paciência suportou o mau cheiro dos animais no corredor...

Ao CNPq, FAPESP, FINEP, IFSC-USP por ter proporcionado a realização deste trabalho.

Enfim, ao Criador de todas as coisas.

Sumário

Resumo.....i

Abstract.....ii

Introdução.....1

Capítulo I - Princípios Básicos da RMN.....3

I.1.Propriedades Magnéticas do Núcleo Atômico.....3

I.2. Efeito Zeemann.....4

I.3. Pulso de RF.....7

I.4. O sinal de RMN.....10

I.5. Relaxação.....11

I.5.1.Relaxação Transversal.....12

I.5.2.Relaxação Longitudinal.....14

I.6. Método para Medir T_1.....15

I.7. Deslocamento Químico.....17

I.8. Acoplamento J.....22

Capítulo II - Espectroscopia *in vivo*.....25

II.1. Introdução.....25

II.1.1. Técnicas Seletivas.....26

II.2. Núcleos Importantes em Espectroscopia *in vivo*.....26

II.3. O ^{31}P.....28

II.4. Metabolismo Energético do Fósforo.....29

II.5. Bioquímica do músculo estudada através de RMN do ^{31}P.....31

II.6. Medida do pH intracelular através de RMN *in vivo* do ^{31}P.....32

II.7. Exemplos de Estudos Realizados através Espectroscopia do ^{31}P....34

Capítulo III - Materiais e Métodos.....37

III.1. Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear.....37

III.2. Sondas de RMN.....38

III.2.1. Susceptibilidade Magnética da Amostra.....39

III.3. Adaptações do espectrômetro para as medidas de RMN *in vivo*....41

III.4. Metodologia na preparação dos animais antes e durante as medidas de RMN.....42

Capítulo IV - Resultados e Discussões.....45

IV.1.Medidas Básicas.....45

IV.1.1.Medidas de T_1 e Fator de Saturação.....46

IV.1.2.Determinação do pH intracelular.....48

IV.2. Estudo de músculos esqueléticos de camundongos com lesão muscular, provocada por exercício físico intenso.....49

IV.3. Estudo de músculos de ratos estimulados eletricamente.....53

IV.3.1. Introdução.....53

IV.3.2. Análise dos Grupos Experimentais.....58

Conclusões e Perspectivas.....62

Apêndice.....63

Referências 64

Resumo

A Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) tem oferecido inúmeras possibilidades de pesquisa nas áreas de Biologia e Medicina. Uma de suas principais aplicações é a Espectroscopia *in vivo* do ^{31}P no estudo da fisiologia de músculos esqueléticos. A partir desta metodologia pode-se quantificar as concentrações dos diferentes metabólitos fosforados que participam do metabolismo energético dos músculos, bem como suas alterações em função de contrações musculares. Com o objetivo de implantar a técnica de Espectroscopia *in vivo* no Laboratório de RMN do IFSC/USP, introduzimos várias adaptações ao Espectrômetro de Alta Resolução em Sólidos já existente, incluindo a confecção de sondas. A partir desta adaptação, estudamos as alterações metabólicas dos compostos fosforados presentes em músculos esqueléticos, bem como o pH intracelular, de ratos e camundongos em função de estímulos elétricos e exercício físico intenso.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

Abstract

The Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy has been offering many possibilities of research in the areas of Biology and Medicine. One of the most important applications is the ^{31}P *in vivo* Spectroscopy to study the skeletal muscle physiology. Using this methodology, it is possible to quantify different phosphorus metabolite concentrations that take part of the muscle energetic metabolism, as their variations as a function of muscle contraction. To accomplish the objective of developing the *in vivo* spectroscopy technique in the NMR laboratory of the IFSC/USP, many modifications to our Solid High Resolution Spectrometer were introduced and probes were constructed. Following these changes, we studied phosphorus compounds metabolic changes in the skeletal muscle and the intracellular pH of rats and mice as a function of electric stimulation and intensive running exercise.

Introdução

O fenômeno da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi observado primeiramente por Bloch e colaboradores (BLOCH F.; HANSEN W.W.; PACKARD H.E., 1946) e desde a sua inicial aplicação, foi utilizada principalmente por químicos e bioquímicos no estudo de compostos inorgânicos e orgânicos isolados. Nos últimos anos, com o aumento do interesse no conhecimento da química e física fundamental dos processos biológicos, a espectroscopia por RMN vem sendo aplicada no estudo de sistemas biológicos organizados. Sua utilização fornece uma quantidade considerável de informações sobre os processos de vida em organismos simples ou em partes isoladas de sistemas vivos.

A espectroscopia por RMN *in vivo* de alta resolução é utilizada para identificar a presença de moléculas específicas ou ambientes químicos, que possuem características próprias no espectro. Além de detectar, a RMN permite quantificar os metabólitos que não estejam imobilizados na célula. Sendo um método não destrutivo e não invasivo, pode ser utilizada repetidas vezes, permitindo assim obter informações sobre processos metabólicos e detalhes estruturais *in vivo*.

Em 1974 observou-se o primeiro espectro de ^{31}P, em músculos de ratos (HOULT D.I. et al., 1974). Com o desenvolvimento da tecnologia em RMN, como bobinas de superfície (ACKERMAN J.H. et al., 1980) e alto campo magnético, gerado por magnetos supercondutores, explorações metabólicas foram realizadas em animais e humanos *in vivo* (CHANCE B. et al., (1981), ROSS D.B. et al., (1981), TAYLOR D.J. et al., (1983)). A RMN permite o estudo do metabolismo muscular realizado não somente em condições de repouso, mas também em situações de exercício e recuperação muscular, permitindo acompanhar a cinética deste metabolismo. Muitos trabalhos foram realizados nos últimos anos na observação e caracterização das diversas disfunções musculares através do monitoramento da cinética dos metabólitos fosforados. Através do estudo de RMN *in vivo* do ^{31}P, observou-se uma correlação entre os espectros e as

mudanças do pH intracelular do músculo (TAYLOR D.J. et al. (1983). Baixos valores da razão da PCr e Pi foram medidos em músculos de pacientes com mitocondriopatias, indicando uma diminuição no estado energético do músculo em repouso, devido ao enfraquecimento da função mitocondrial (ARGOV Z.B., 1987, CHANCE B. et al., 1986). Entre outros foram realizados estudos com miopatia hipotireóideas (ARGOV Z.B., 1988), e em músculos lesados (McCULLY K. et. al., 1988).

Obter espectros de RMN *in vivo* de regiões específicas de certos tecidos, órgãos ou mesmo partes destes, sem que haja informação de regiões vizinhas não desejadas, torna a esta técnica ainda mais interessante. E este problema, de localização precisa e quantificação tem sido o grande desafio dos espectroscopistas de RMN *in vivo* nos últimos tempos.

Neste trabalho será discutido a implementação da técnica de espectroscopia por RMN *in vivo* no laboratório de RMN, do IFSC-USP, que consistiu na adaptação de um espectrômetro de alta resolução em sólidos para o estudo *in vivo* do ^{31}P em músculo de ratos e camundongos.

Este texto está dividido em quatro capítulos, sendo que no primeiro serão apresentados os princípios básicos da RMN. No segundo capítulo, será abordada a espectroscopia *in vivo* no seu aspecto geral, dando um enfoque especial para a espectroscopia do ^{31}P em músculos. No terceiro capítulo será descrito o espectrômetro de RMN utilizado, a instrumentação desenvolvida durante a adaptação do mesmo para a realização das medidas, incluindo os detalhes inerentes a espectroscopia *in vivo*. No quarto capítulo serão apresentados os resultados e discussões. Finalmente, apresentar-se-ão as conclusões e perspectivas deste trabalho.

Capítulo I

Princípios Básicos da Ressonância Magnética Nuclear

I.1.Propriedades Magnéticas do Núcleo Atômico

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é um fenômeno que ocorre para núcleos que possuem momentos magnéticos e angulares, $\vec{\mu}$ e $\vec{J}$, respectivamente. Os núcleos apresentam momentos magnéticos e angulares paralelos entre si, respeitando a expressão $\vec{\mu} = \gamma\vec{J}$, onde γ é o fator giromagnético. O momento angular $\vec{J}$ é definido, quanticamente, por $\vec{J} = \hbar\vec{I}$, onde $\vec{I}$ é um operador adimensional, também denominado de momento angular ou spin, cujos valores podem ser somente números inteiros ou semi-inteiros *0, 1/2, 1, 3/2, 2....* A Tabela I.I apresenta alguns exemplos de núcleos atômicos, onde se observa que nem todos apresentam momento angular diferente de zero.

Núcleos que têm número atômico (Z) e número de massa (A) pares, sempre apresentam momento angular de spin ($\vec{I}$) nulo e, por este motivo, não são mensuráveis em RMN, são exemplos o $^{12}C_6$, e o $^{16}O_8$, os isótopos mais abundantes do carbono e do oxigênio. Núcleos que possuem Z ímpar e A par, possuem momento angular de spin inteiro, por exemplo $^{14}N_7$, $^{2}H_1$. Núcleos que possuem A ímpar possuem momento angular de spin *I=1/2, I=3/2 ou I=5/2.* São exemplos ^{1}H, ^{13}C e o ^{31}P; ^{11}B, ^{23}Na e ^{35}Cl; ^{17}O e ^{27}Al, respectivamente.

Tabela I.I. Principais núcleos em RMN e respectivos spins.

Núcleo	*spin, I*
^{1}H	1/2
^{12}C	0
^{13}C	1/2
^{14}N	1
^{16}O	0
^{17}O	5/2

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO

I.2.Efeito Zeeman

Quando núcleos isolados estão sob a ação de um campo magnético, a energia de interação do momento magnético $\vec{\mu}$ com o campo magnético $\vec{B}$ é:

$$E = -\vec{\mu}.\vec{B} \tag{1}$$

Considerando o campo $\vec{B}$, com magnitude B_0 e alinhado ao longo da direção z, obtém-se que a hamiltoniana que governa esse fenômeno, é dada por:

$$H = -\gamma\hbar B_0 I_z \tag{2}$$

Como resultado desta hamiltoniana encontram-se os possíveis níveis de energia

$$E = -m\gamma\hbar B_0 = -m\hbar\omega_0 \tag{3}$$

onde m=-I,-I+1,...I-1,I e $\omega_0 = \gamma B_0$ é denominada *Freqüência de Larmor*. Tal desdobramento nos níveis de energia é denominado *Efeito Zeeman*.

A Figura I.1 ilustra os níveis de energia para o caso de um spin $I = 1/2$, onde pode-se observar que a diferença de energia entre os dois níveis é dada por $\Delta E = \hbar\gamma B_0 = \hbar\omega_0$. Para um campo magnético da ordem de 1 Tesla, a freqüência de Larmor é da ordem de dezenas de mega hertz (MHz), situando-se na faixa de radiofreqüência (RF). Ainda para este valor de campo magnético, a diferença de energia entre os dois níveis é da ordem de 10^{-26} Joules ou 10^{-7} eV.

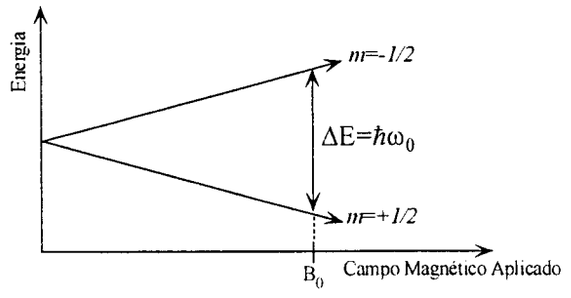


Figura I.1. Autovalores da energia de um núcleo com momento magnético $\vec{\mu}$ em um campo magnético $\vec{B}$.

Desta forma, a única componente estacionária do momento angular do núcleo atômico determinada quanticamente é a componente z, L_z, a qual assume diferentes valores dependentes do número quântico *m*. Já as componentes transversais do momento angular, L_x e L_y não são estacionárias podendo, porém, serem

determinadas em função do tempo a partir do valor esperado do momento angular total $\vec{L}$:

$$\frac{d}{dt}\langle\vec{L}\rangle = \frac{i}{\hbar}\langle[H,\vec{L}]\rangle = \vec{L}\times(\gamma\vec{B}_0) = \vec{L}\times\vec{\omega}_0 \tag{4}$$

Portanto, a mesma expressão pode ser obtida para o valor esperado do momento magnético do núcleo atômico:

$$\frac{d}{dt}\langle\vec{\mu}\rangle = \frac{i}{\hbar}\langle[H,\vec{\mu}]\rangle = \vec{\mu}\times(\gamma\vec{B}_0) = \vec{\mu}\times\vec{\omega}_0 \tag{5}$$

Estas duas últimas expressões indicam que, quando os núcleos atômicos estão sujeitos a campos magnéticos, seus momentos magnéticos ou angulares apresentam um movimento de precessão em torno do eixo z previsto pelo eletromagnetismo clássico, como está ilustrado na Figura I.2.

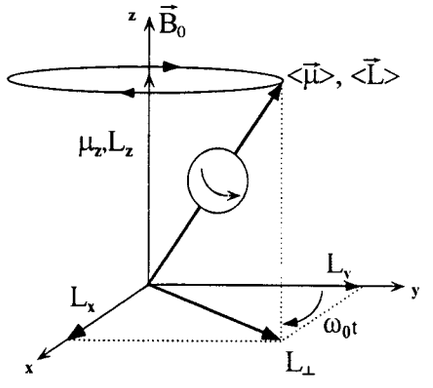


Figura I.2. Precessão do momento magnético $\vec{\mu}$ de um em torno de um campo magnético $\vec{B}_0$.

Na realidade, quando uma amostra é colocada na presença de um campo magnético estático $\vec{B}_0$, existirão da ordem de 10^{23} núcleos atômicos precessionando em torno dele. Considerando núcleos com spin 1/2. Os núcleos com *m=1/2*, possuem menor energia e precessionam em torno do campo magnético externo ($\vec{B}_0$), orientados a favor do campo, e outros núcleos com *m=-1/2*, possuem maior energia e precessionam na direção oposta ao campo magnético externo, sendo estas populações N^+ e N^-, respectivamente. Da mecânica estatística tem-se que a razão entre estas populações é dada pela distribuição de Boltzmann:

$$\frac{N^+}{N^-} = exp\left[\frac{\gamma\hbar B_0}{kT}\right] \tag{6}$$

Tomando a intensidade do campo magnético da ordem de 1 Tesla, a temperatura da amostra em torno da temperatura ambiente, T≈300K, e o fator giromagnético do núcleo do átomo de Hidrogênio, γ_H=42,394MHz.T^{-1}, da expressão acima obtem-se que N^-=1,000007N^+ para temperatura ambiente.

Como $N^-+N^+=6{,}02\times10^{23}$, consequentemente determina-se que a diferença de população é de $\Delta N=2{,}11\times10^{18}$ spins, implicando no fato de que $N^+=3{,}0099894\times10^{23}$ spins precessionam no sentido oposto ao campo magnético externo e $N^-=3{,}01001106\times10^{23}$ spins precessionam em torno do campo, Figura I.3. Desta forma, $\Delta N/N=3{,}5\times10^{-6}$, ou seja, a diferença de população entre os dois níveis é da ordem de partes por milhão (ppm) com relação ao número total de spins da amostra.

A partir da Figura I.3 pode-se observar que devido à precessão aleatória dos spins em torno da direção z, a magnetização transversal ao campo, é nula, M_{xy}=0, e a magnetização longitudinal, ao longo da direção do campo magnético aplicado, é dada por $\vec{M}_0 = \Delta N\vec{\mu}_i$. Logo, $\vec{M}_0$ é a magnetização resultante que surge na amostra quando a mesma é colocada sob a ação de um campo magnético, e é normalmente denominada por magnetização de equilíbrio.

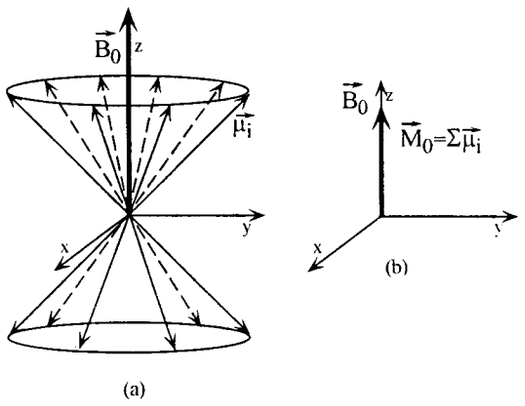


Figura I.3. Magnetização resultante ao longo do campo magnético $\vec{B}$ (a) momento magnético, $\vec{\mu}_i$ (b) magnetização resultante, $\vec{M}_0$.

I.3.Pulsos de RF

Para a realização de um experimento de RMN, torna-se necessário retirar a magnetização de seu estado de equilíbrio. Do ponto de vista da teoria de perturbação dependente do tempo, devemos aplicar uma perturbação $H_p(t)$ ao sistema de spins que satisfaça a Regra de Ouro de Fermi, a qual define a probabilidade de transição entre dois níveis de energia m e n $(m \neq n)$:

$$P_{mn} \propto \left|\langle m|H_p(t)|n\rangle\right|^2 \delta(\omega - \omega_o) \tag{7}$$

Para que a probabilidade de transição seja diferente de zero, a perturbação deve obedecer duas condições. A primeira, é que devemos aplicar um segundo campo magnético perpendicular ao campo magnético estático já aplicado, garantindo que o elemento de matriz do operador $H_p(t)$ seja diferente de zero. Ou seja, a hamiltoniana dependente do tempo deve conter as componentes transversais do operador momento de spin, I_x e I_y, as quais podem ser reescritas em termos dos operadores *levantamento* e *abaixamento*, I_+ e I_-. Desta forma, levando à regra de seleção $\Delta m = \pm 1$ para estas transições. A segunda, é que sua atuação forneça ao sistema uma energia igual a $E = \hbar\gamma B_0$, ou que este segundo campo magnético oscile no plano transversal com uma freqüência igual a freqüência de Larmor, $\omega = \gamma B_0$. Portanto, a hamiltoniana de interação dependente do tempo produzida por este segundo campo magnético pode ser dada por:

$$H_p = -\gamma\hbar B_1\left(I_x sen\omega t\hat{x} - I_y \cos\omega t\hat{y}\right) \tag{8}$$

onde B_1 é a intensidade deste segundo campo magnético e ω é a freqüência de oscilação de $\vec{B}_1$ no plano transversal. Para que ocorra a transição, ω deve ser igual ou muito próxima da freqüência de Larmor. Por esta razão, o segundo campo magnético aplicado, $\vec{B}_1$, é denominado campo de radiofreqüência (RF).

Do ponto de vista da evolução temporal do valor esperado do momento magnético de cada núcleo atômico, $\langle\vec{\mu}(t)\rangle$, podemos inferir que a evolução temporal do valor esperado da magnetização total, $\langle\vec{M}(t)\rangle$, será também dada pela equação de movimento:

$$\frac{d}{dt}\langle \vec{M} \rangle = \frac{i}{\hbar}\langle [H, \vec{M}] \rangle = \vec{M} \times (\gamma \vec{B}) \tag{9}$$

onde $\vec{B}$ agora é o campo magnético resultante da aplicação simultânea dos campos magnéticos estático e de RF.

Para entender melhor o efeito do campo de RF sobre a magnetização do sistema de spins, introduziremos o *sistema girante de coordenadas* cujo eixo z' coincide com o eixo z do sistema de laboratório. Agora o sistema gira em torno de z' com uma freqüência Ω. Neste novo sistema, dito girante, teremos:

$$B_{ef} = B_0 - \frac{\Omega}{\gamma} \tag{10}$$

Portanto, a equação de precessão neste novo sistema de coordenadas assume a forma:

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \gamma \vec{M} \times \left(\vec{B}_0 - \frac{\vec{\Omega}}{\gamma} \right) \tag{11}$$

Escolhendo um sistema girante cuja freqüência de rotação seja igual a freqüência de Larmor, a magnetização $\vec{M}$ não sofrerá a ação do campo magnético efetivo, visto que este se anula para a condição particular, permanecendo estacionária neste referencial.

Segue-se o que ocorre com a magnetização no sistema girante de coordenadas quando sujeita à ação simultânea dos campos magnéticos estático e de RF. Supondo-se que o campo de RF, $\vec{B}_1$, esteja girando com a freqüência de Larmor e alinhado ao longo da direção x' do sistema girante de coordenadas. Neste caso, o campo efetivo visto pela magnetização será dado por:

$$\vec{B}_{ef} = \left(B_0 - \frac{\Omega}{\gamma} \right) \hat{z}' + B_1 \hat{x}' \tag{12}$$

Escolhendo novamente $\Omega = \gamma B_0$, o campo efetivo visto pela magnetização será composto apenas pelo campo de RF, $\vec{B}_1$, o qual se encontra estático no sistema girante de coordenadas. Desta forma, a magnetização apresentará, neste referencial, um movimento de precessão dado pela expressão:

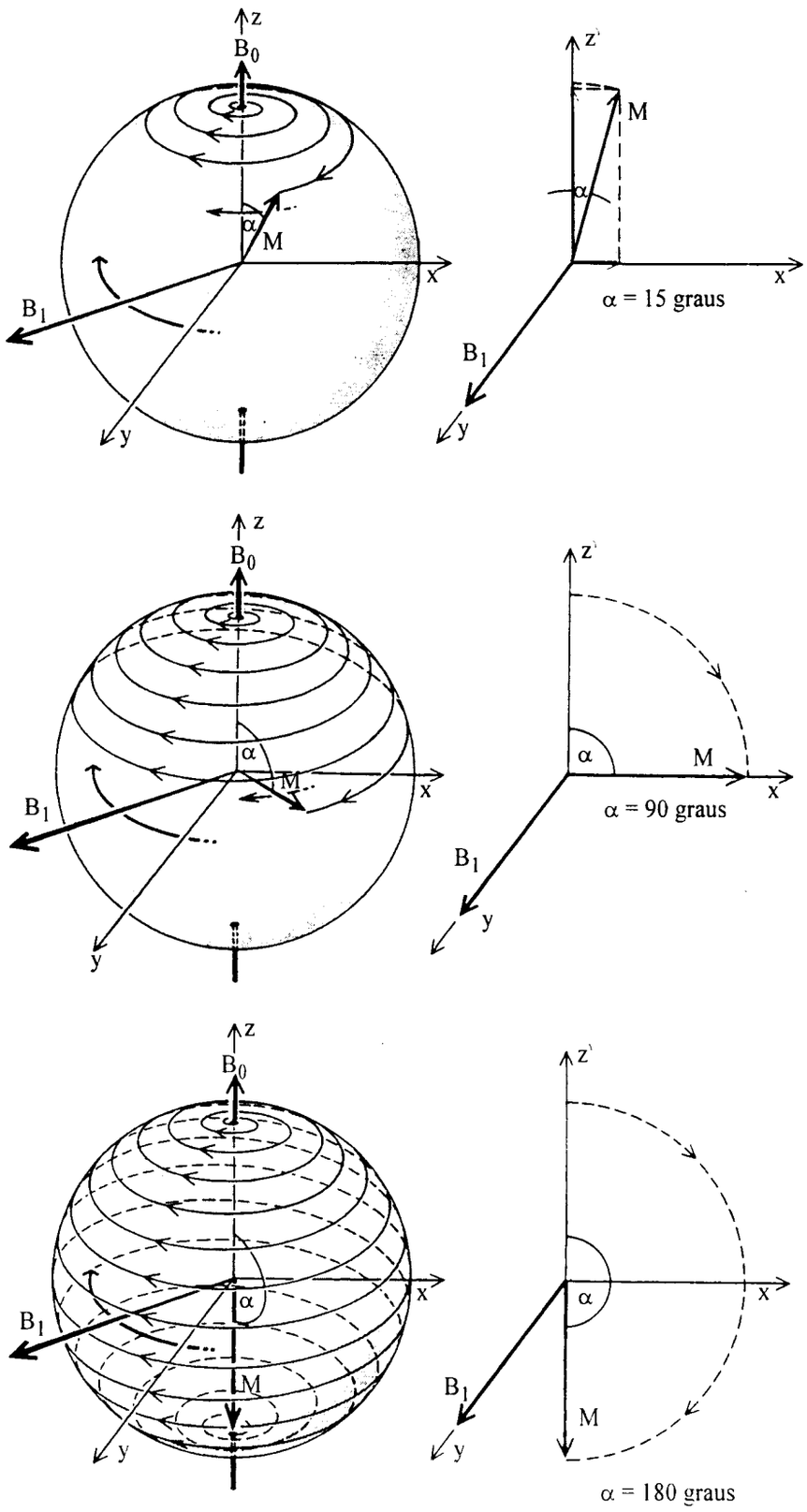


Figura 1.4. Evolução temporal da magnetização sob a ação de um campo magnético externo e de um campo de RF no sistema de laboratório (esquerda) e no sistema girante de coordenadas (direita), para pulsos de 15°, 90° e 180 ° (PIKKET, 1982)

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \gamma\vec{M} \times \left(B_1\hat{x}'\right) \tag{13}$$

a qual corresponde à precessão simples da magnetização $\vec{M}$ com freqüência $\omega_1 = \gamma B_1$ em torno apenas do campo de RF, Figura I.4.

Para retirar o sistema de spins do estado de equilíbrio, fato que envolve quanticamente alterar a população dos níveis de energia ou classicamente alterar a orientação da magnetização, deve-se aplicar o campo de RF durante um curto intervalo de tempo, o qual denomina-se pulso de RF. Para entender melhor este processo, utiliza-se novamente o conceito de sistema girante de coordenadas.

Ao aplicar um pulso de RF com duração T_p, a magnetização irá precessionar em torno de $\vec{B}_1$ através de um ângulo $\beta = \gamma B_1 T_p$, onde os ângulos β mais utilizados são $\pi/2$ ou π, levando a magnetização para o eixo y' ou invertendo sua orientação original, respectivamente, Figura I.4. Por esta razão, os pulsos de RF são, nestes casos, denominados por pulsos de RF de $\pi/2$ ou π.

Tipicamente o campo de RF tem intensidade da ordem de 1 Gauss. Então, a duração de um pulso de RF será normalmente da ordem de unidades a dezenas de microsegundos, dependendo do núcleo atômico.

I.4.O Sinal de RMN

Normalmente, em um espectrômetro de RMN, a bobina que é utilizada para aplicar os pulsos de RF é empregada também para a detecção do sinal.

Após a aplicação de um pulso de RF de $\pi/2$, a magnetização irá precessionar no plano xy apenas na presença de $\vec{B}_0$, com a freqüência de Larmor. Como a magnetização $\vec{M}$ nada mais é do que um pequeno ímã, ocorrerá uma variação de fluxo de campo magnético no interior da bobina de RF e, segundo a Lei de Faraday, surgirá uma força eletromotriz nos terminais da mesma na forma (Figura I.5):

$$V(t) = A\cos(\omega_0 t) \tag{14}$$

Tal como em um gerador de corrente alternada (14), onde A é uma constante diretamente proporcional ao valor da magnetização de equilíbrio do sistema de spins. Este sinal é universalmente denominado FID, proveniente do termo em inglês *Free*

Induction Decay, que significa a precessão livre dos spins após o pulso de RF. Logicamente, qualquer pulso de RF que produza uma magnetização transversal induzirá um sinal FID. Como o pulso de RF de $\pi/2$ produz a maior magnetização transversal possível, ele é quem produz o FID mais intenso. Como esta magnetização é muito pequena devido à baixíssima diferença de população entre os níveis de energia Zeeman, o sinal FID é extremamente pequeno, fato que torna o experimento de RMN intrinsecamente de baixa sensibilidade.

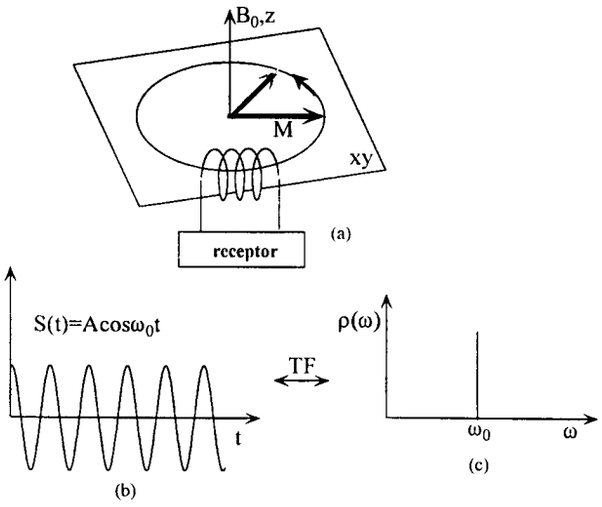


Figura I.5.(a) A precessão da magnetização nuclear induz uma voltagem oscilatória em uma bobina ao redor da amostra, (b) voltagem oscilatória e (c) respectiva Transformada de Fourier.

O sinal de RMN, FID, é usualmente representado através de sua Transformada de Fourier (TF), que corresponde, de uma forma simplificada, em graficar a intensidade do sinal, proporcional ao número de spins que formaram a magnetização resultante, em função da freqüência. Como será visto, existirão várias interações de spin nuclear que ocasionarão o aparecimento de diferentes grupos de magnetização precessionando em freqüências distintas, resultando na formação dos conhecidos espectros de RMN.

I.5.Relaxação

Após um pulso de RF de $\pi/2$ a magnetização encontra-se em um estado de não equilíbrio onde a componente longitudinal z é nula e a componente transversal é

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA

igual à magnetização de equilíbrio. Para o sistema de spins retornar ao equilíbrio devem ocorrer dois processos distintos e simultâneos de relaxação. Um que elimina a magnetização transversal, denominado processo de relaxação transversal, e outro que recupera a magnetização de equilíbrio ao longo da direção z, denominado relaxação longitudinal.

I.5.1.Relaxação Transversal

No caso de uma amostra contendo 10^{23} núcleos atômicos com spin diferente de zero, não existe somente uma freqüência de Larmor para spins de mesma espécie. Isto ocorre devido à variação de campo magnético ao longo da amostra, decorrente ou dos campos magnéticos produzidos pelos próprios momentos magnéticos dos núcleos atômicos, entre outras interações que serão discutidas posteriormente, ou porque o campo magnético estático aplicado não é homogêneo. Deste modo, o campo magnético na direção z varia ao longo da amostra induzindo variações nas freqüências de Larmor. Portanto, a magnetização transversal produzida imediatamente após um pulso de RF será constituída por várias magnetizações, $\vec{m}_i$, que irão precessionar com freqüências de Larmor diferentes no plano transversal. Conseqüentemente, a magnetização total tenderá a desaparecer ao longo do tempo devido ao espalhamento total dos spins no plano transversal, Figura I.6(a). Como o sinal de RMN corresponde à variação de fluxo de campo magnético produzido pela magnetização total, $\vec{M}$, composta pelos diferentes grupos de spins com freqüências de precessão diferentes, $\vec{m}_i$, o FID deverá tender à zero depois de um intervalo de tempo, denominado Tempo de Relaxação Transversal, T_2, Figura I.6(b). Tipicamente, em líquidos, este decaimento do sinal FID é da forma exponencial dada por

$$M_y(t) = M_{xy} \cos\omega_0 t \exp(-t/T_2) \qquad (15)$$

Logo, a existência de diferentes freqüências de Larmor resulta no alargamento de linha, ilustrado na Figura I.6(c). Logicamente, a intensidade e variabilidade destes campos adicionais ao longo da direção z vão depender de dois fatores. Um fator está associado ao estado físico da amostra, ou da mobilidade que os núcleos magnéticos apresentam no interior da mesma. No estado líquido, os spins

apresentam mobilidade suficiente para terem seus campos magnéticos promediados à zero durante o experimento de RMN, fazendo com que T_2 seja bastante longo e a linha espectral bem estreita. Já os líquidos viscosos apresentam T_2 menor e os sólidos apresentam T_2 bastante curtos. O segundo fator está associado à homogeneidade do campo magnético estático, a qual depende tanto da qualidade do magneto utilizado quanto da habilidade do operador do espectrômetro durante o procedimento de homogeneização do mesmo.

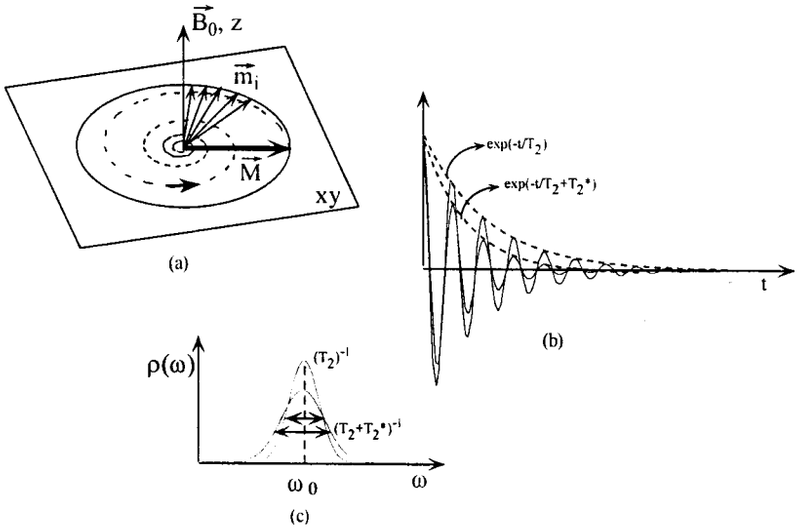


Figura I.6. (a)Relaxação transversal e Sinal de RMN sob efeito da relaxação transversal; (b) FID e (c) Trasnformada de Fourrier.

Os campos magnéticos gerados pelos magnetos não são perfeitamente homogêneos. Uma amostra dentro deste campo sentirá uma diferença de campo δB. Conseqüentemente ela terá uma dispersão na freqüência de Larmor $\delta\omega = \gamma\,\delta\,B$ sobre o domínio da amostra. Para distinguir este efeito do verdadeiro tempo de relaxação T_2, o tempo de decaimento $(\gamma\,\delta B)^{-1}$ é chamado T_2^*, muito freqüentemente, em líquidos $T_2^* < T_2$. O *shimming* (termo utilizado para o processo de homogeneização do campo magnético) nos magnetos, reduz δB, portanto, aumenta T_2^* (Figura I.6.c).

Escrevendo o campo magnético por uma expansão em harmônicos esféricos (HAEBERLEN, 1976), temos:

$$
\begin{aligned}
B_0(r) - B_0(0) &= \sum_{l=1}^{\infty}\left(\frac{4\pi}{2l+1}\right)^{\frac{1}{2}} \sum_{m=-l}^{l} a_{lm} r^l Y_{lm}(\Theta,\Phi) \\
&= \sum_{l=1}^{\infty}\left(\frac{4\pi}{2l+1}\right)^{\frac{1}{2}} r^l \left\{ a_{l0} Y_{l0}(\Theta,\Phi) + \sum_{m=1}^{l}\left(a_{lm} Y_{lm}(\Theta,\Phi) + a^*_{lm} Y^*_{lm}(\Theta,\Phi)\right)\right\} \\
&= a_{10} z - Re\, a_{11}\sqrt{2}x + Im\, a_{11}\sqrt{2}y \quad (l=1) \\
&+ a_{20}\frac{3z^2 - r^2}{2} + Re\, a_{22}\sqrt{\frac{3}{2}}\left(x^2 - y^2\right) + \sqrt{6}\left(Im\, a_{21} yz - Re\, a_{21} xz - Im\, a_{22} xy\right) \quad (l=2) \\
&+ \ldots = az - bx + cy + dz^2 + e(x^2 - y^2) + fyz - gxz - xy
\end{aligned}
\tag{16}
$$

onde $B_0(r)$ é o campo magnético na posição r e $B_0(0)$ é o campo magnético externo. O processo de homogeneização do campo magnético nada mais é que a alteração dos campos magnéticos gerados pelas bobinas de shimming, o que teoricamente consiste em alterar os coeficiente da expressão (16), *a, b, c,...*, fazendo com que a diferença entre estes dois campos seja menor possível.

I.5.2.Relaxação Longitudinal

O processo de relaxação longitudinal de um núcleo atômico está associado à recuperação da distribuição de população Boltzmann de equilíbrio após um pulso de RF, e ocorre exclusivamente devido aos campos magnéticos locais flutuantes produzidos pela sua vizinhança, denominada rede. Por esta razão, a relaxação longitudinal também é denominada por relaxação spin-rede. Visto que a probabilidade de transição espontânea é praticamente nula nestes sistemas. A rede produz campos magnéticos locais flutuantes, transversais ao campo externo aplicado, os quais, segundo a regra de Ouro de Fermi, produzirão transições entre os níveis de energia dos núcleos atômicos, dependendo da freqüência de flutuação do campo local e da intensidade do mesmo. A freqüência de flutuação do campo local dependerá novamente da mobilidade dos spins e do estado físico da amostra. Para que a probabilidade de transição seja máxima, a freqüência de flutuação do campo local deve ser da ordem da freqüência de Larmor. Sendo maior ou menor, a probabilidade diminuirá. A intensidade do campo local no núcleo dependerá da fonte de campo magnético e da sua geometria.

Logo, por exemplo, quando aplicamos um pulso de $\pi/2$ sobre os sistema de spins a magnetização z se anula, o que equivale a igualar a população dos dois níveis de energia Zeeman. Imediatamente após o excitação do spins, começa o processo de

relaxação longitudinal que recuperará a diferença de população entre os níveis de energia e, conseqüentemente, a magnetização de equilíbrio M_0, Figura I.3 (página 6). A evolução temporal da magnetização $M_z(t)$ até atingir seu estado de equilíbrio é da forma exponencial dada por:

$$M_z(t) = M_0\left(1 - exp\left(-t/T_1\right)\right) \tag{17}$$

onde o parâmetro T_1 é denominado tempo de relaxação longitudinal. Deve-se observar, no entanto, que o tempo necessário para que a magnetização retorne a 99% de seu valor de equilíbrio é da ordem de $5T_1$. Quando $t=T_1$ a magnetização atingiu apenas 63% de seu valor de equilíbrio. No caso de líquidos de baixa viscosidade, os tempos de relaxação transversal são tão longos que antes da magnetização se espalhar no plano transversal, ela já retornou à direção z. Neste caso particular, $T_1=T_2$. Portanto, a escolha adequada de líquidos para a realização do processo de homogeneização é de fundamental importância já que o processo de relaxação longitudinal pode introduzir um alargamento adicional na linha espectral.

Como este processo envolve apenas variação de fluxo de campo magnético perpendicular ao eixo da bobina de detecção do sinal de RMN, a recuperação da magnetização longitudinal não pode ser medida diretamente.

$M_z(t)=M_0(1-2exp(-t/T_1))$

$T_2 \leq T_1$

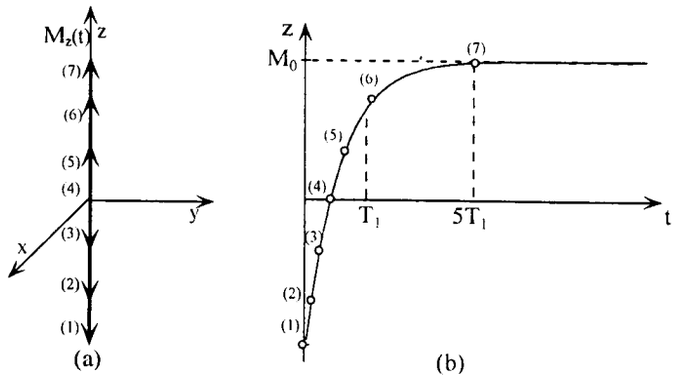


Figura I.7. Relaxação longitudinal e variação temporal de M_z após um pulso de π (a) vetor magnetização ao longo da direção z ; (b) evolução temporal da magnetização.

I.6.Método para medir T_1

Existem vários métodos para medir o tempo de relaxação longitudinal, T_1. O método mais utilizado é o da *inversão-recuperação*, o qual consiste em aplicar a seqüência de pulsos $\pi-\tau-\pi/2-T_R$ (Figura I.8). O pulso π inverte a magnetização

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

longitudinal e, durante o intervalo de tempo τ, a magnetização evolui segundo o processo de relaxação longitudinal. Como este processo ocorre no eixo perpendicular ao eixo de detecção da bobina, aplica-se um pulso de $\pi/2$ para levar a magnetização para o eixo transversal. Imediatamente após o pulso $\pi/2$, surge um FID cuja amplitude é diretamente proporcional ao valor da magnetização z no instante τ. Deste modo, variando-se o valor de τ, pode-se obter a evolução temporal da magnetização longitudinal e, conseqüentemente, o valor do tempo de relaxação longitudinal, T_1.

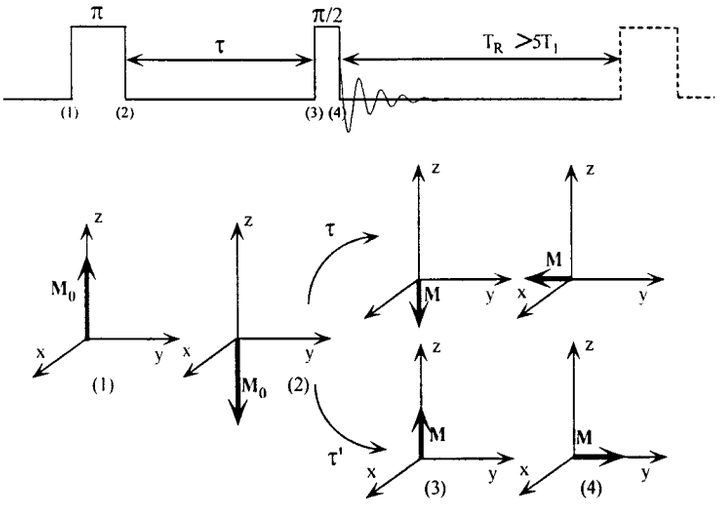


Figura I.8. Medida de T_1 e evolução do vetor magnetização, para dois tempos de espera: τ' e τ, sendo $\tau'>\tau$.

Para superar o problema de baixa sensibilidade do experimento de RMN, são aplicados inúmeros pulsos $\pi/2$ e os FIDs produzidos são utilizados no processo de promediação, melhorando significativamente a relação sinal/ruído. No entanto, a separação entre os consecutivos pulsos $\pi/2$ deve ser, como já discutido anteriormente, da ordem de $5T_1$ para a obtenção do máximo FID em cada uma das aquisições.

No caso da espectroscopia *in vivo*, onde os tempos de relaxação longitudinais são longos, da ordem de segundos, e o tempo de aquisição total do sinal de RMN é relativamente curto, da ordem de segundos a dezenas de minutos, a escolha de um tempo de repetição longo resultará em um número muito pequeno de médias. Neste caso, torna-se necessária a escolha de um tempo de repetição menor que 5 T_1, de tal modo que se possa adquirir um número maior de FIDs durante o mesmo intervalo de tempo de aquisição. Entretanto o conhecimento exato ou uma boa estimativa do valor

do tempo de relaxação longitudinal permitirá uma escoha adequada do tempo de repetição do experimento.

Após um certo número de pulsos de RF, a magnetização longitudinal atinge um estado estacionário, $\vec{m}_z(T_R)$, cuja amplitude é dada por:

$$M_z(T_R) = M_0 \frac{\left(1 - exp(-T_R / T_1)\right) sen\theta}{1 - cos\theta . exp(-T_R / T_1)} \tag{18}$$

onde θ é o ângulo de rotação da magnetização sob a ação do pulso de RF, T_R é o tempo de repetição do experimento.

Por exemplo, tomando uma amostra que apresenta um T_1=5s, onde o experimento foi realizado com pulsos $\pi/2$ e tempo de repetição de 3s, a magnetização em estado estacionário atingirá um valor de $0{,}45M_0$.

Para corrigir a diminuição de intensidades dos sinais de RMN de uma amostra, quando se utiliza T_R menor que $5T_1$, emprega-se o *fator de saturação* (FS) dado pela equação:

$$FS(T_R) = \frac{M_z(T_R)}{M_0} = \frac{\left(1 - exp(-T_R / T_1)\right) sen\theta}{1 - cos\theta\left(exp(-T_R / T_1)\right)} \tag{19}$$

Portanto, é fundamental conhecer a magnitude de T_1 em qualquer experimento de espectroscopia de RMN, onde se deseja quantificar algum grupo químico, utilizando o fator de saturação.

I.7.Deslocamento Químico

Em 1951, Arnold e colaboradores, ao substituirem uma amostra de água por etanol, registraram 3 linhas de ressonância no lugar de apenas uma, como obtido para a água. Este fenômeno foi atribuído corretamente a estrutura molecular da substância, e é denominado deslocamento químico ou, em inglês, *chemical shift*. Os sinais de diferentes freqüências observados para o etanol apresentavam também diferentes intensidades, correspondentes às diferentes quantidades de spins nucleares contidos nos grupos químicos existentes na molécula, com intensidades em proporção 3:2:1, que respectivamente correspondem aos grupos CH_3, CH_2 e OH, Figura I.9.

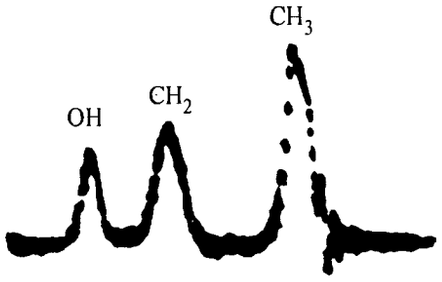


Figura I.9. Registro da experiência de Arnold, em 1951 (ARNOLD J.T.; DHARMATTI S.S.; PACKARD M.E., 1951), que mostra os sinais de ressonância magnética dos núcleos ^{1}H do álcool etílico. (GIL V.M.S.; GERALDES C.F.G.C., 1987)

O deslocamento químico tem sua origem na interação das nuvens eletrônicas com o campo externo aplicado. O campo externo aplicado induz uma circulação adicional dos elétrons nas nuvens eletrônicas, tal como a Lei de Lenz para espiras na presença de um campo magnético variável, as quais geram campos magnéticos locais secundários nos diferentes sítios dos núcleos atômicos. Estes novos campos magnéticos são proporcionais ao campo externo aplicado, $\sigma\vec{B}_0$, e podem se opor ou se somar a $\vec{B}_0$, alterando o campo magnético visto pelo núcleo atômico na forma:

$$\vec{B} = \vec{B}_0 - \sigma\vec{B}_0 = (1-\sigma)\vec{B}_0 \qquad (20)$$

onde σ é uma constante adimensional denominada por constante de blindagem, a qual depende da nuvem eletrônica e de sua densidade eletrônica, cujo valor pode variar de 10^{-6} para átomos leves e 10^{-2} para átomos pesados.

Consequentemente, a freqüência de ressonância de um núcleo atômico será dada por:

$$\omega = (1-\sigma)\gamma B_0 \qquad (21)$$

e deve variar em relação à freqüência Zeeman da ordem de unidades a milhares de Hertz, dependendo do núcleo atômico estudado. Podemos expressar a hamiltoniana de deslocamento químico pela seguinte expressão:

$$H = \vec{I}.\bar{\bar{\sigma}}.\vec{B}_0 \qquad (22)$$

onde $\bar{\bar{\sigma}}$ é o tensor deslocamento químico, o qual é uma constante para o caso de líquidos; $\vec{I}$ é o momento angular de spin do núcleo e $\vec{B}_0$ o campo magnético externo.

Para definir este deslocamento de freqüência de ressonância para os núcleos atômicos de mesma espécie presentes em diferentes grupos químicos, escolhe-se a freqüência de ressonância de um destes grupos como referência, ν_{ref}, e define-se o deslocamento relativamente a ele de forma normalizada com relação ao campo externo aplicado na forma:

$$\delta = \frac{\nu_{ref} - \nu_i}{\nu_0} = (\sigma_{ref} - \sigma_i) \approx 10^{-6} - 10^{-2} \approx ppm - 10^{4}\, ppm \qquad (23)$$

onde ν_i é a freqüência do núcleo em análise e ν_0 é a freqüência de ressonância de um núcleo isolado ($\upsilon_0 = 2\pi\gamma B_0$). A Figura I.10 é um exemplo ilustrativo de deslocamento químico do ^{13}C, entre um radical carbonado e o tetrametilsilano (TMS).

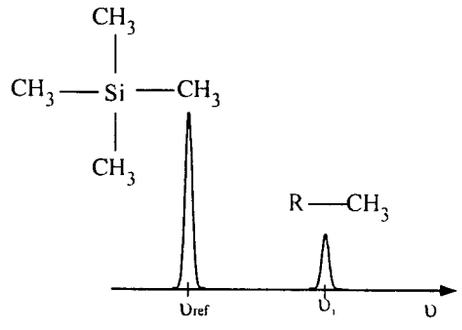


Figura I.10. Deslocamento químico de um radical carbonado e o tetrametilsilano (TMS).

Portanto, independente do valor do campo magnético utilizado, o deslocamento químico definido acima possuirá sempre o *mesmo valor*, entretanto para campos magnéticos mais altos, há uma melhor resolução dos espectros já que as freqüências estarão mais separadas entre si, Figura I.11.

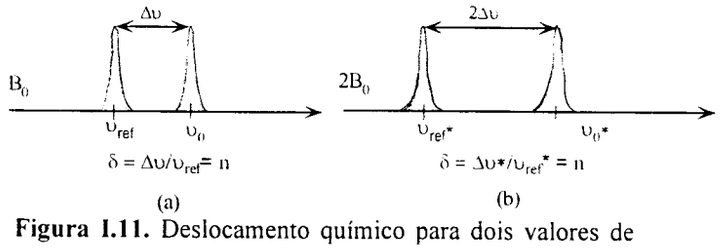


Figura I.11. Deslocamento químico para dois valores de campo magnético: (a) campo magnético de intensidade $\vec{B}_0$, (b) campo magnético de intensidade 2 $\vec{B}_0$.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA

As Tabelas I.II e I.III mostram os diferentes valores de deslocamento químico para os diversos grupos químicos do ^{13}C e ^{31}P, utilizando-se como referência o tetrametilsilano (TMS) e a fosfocreatina (PCr), respectivamente.

Tabela I.II. Deslocamento químico para carbonos em diferentes grupos funcionais com referência no TMS.

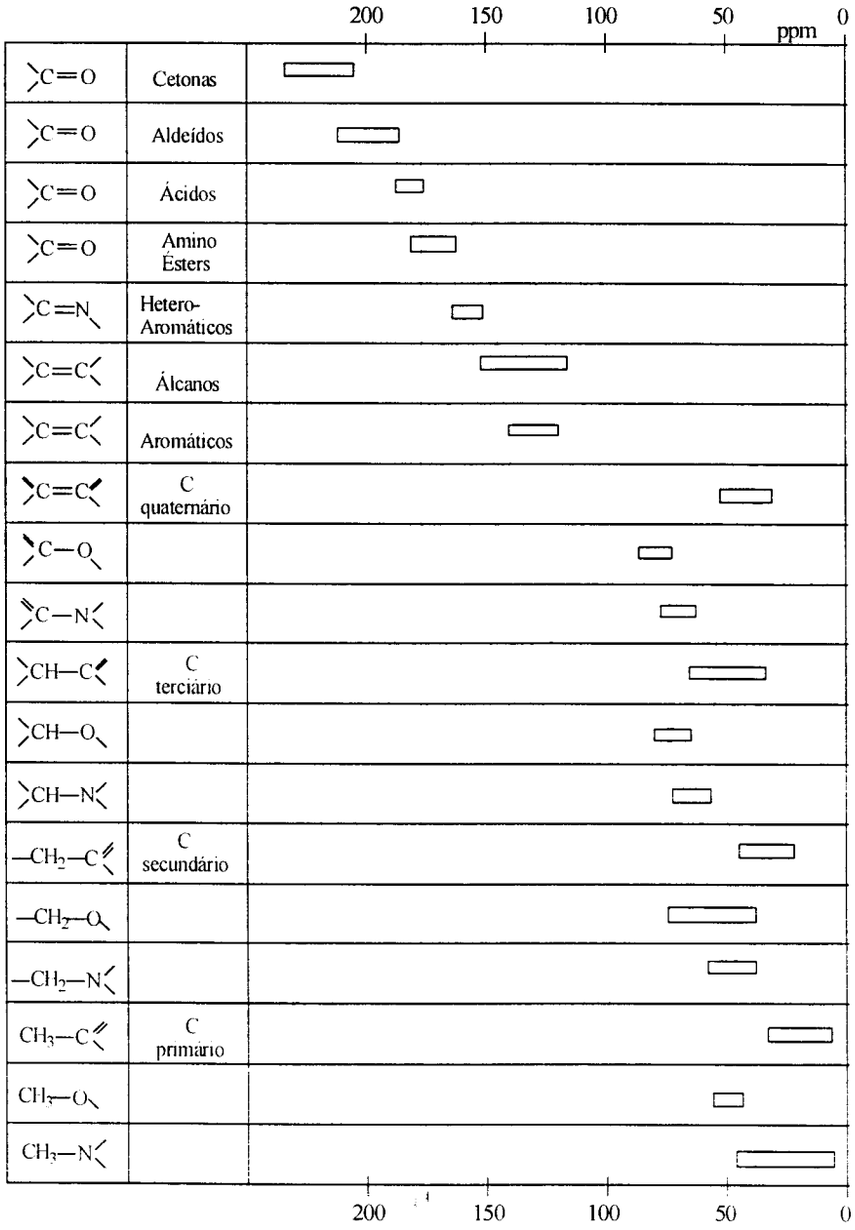
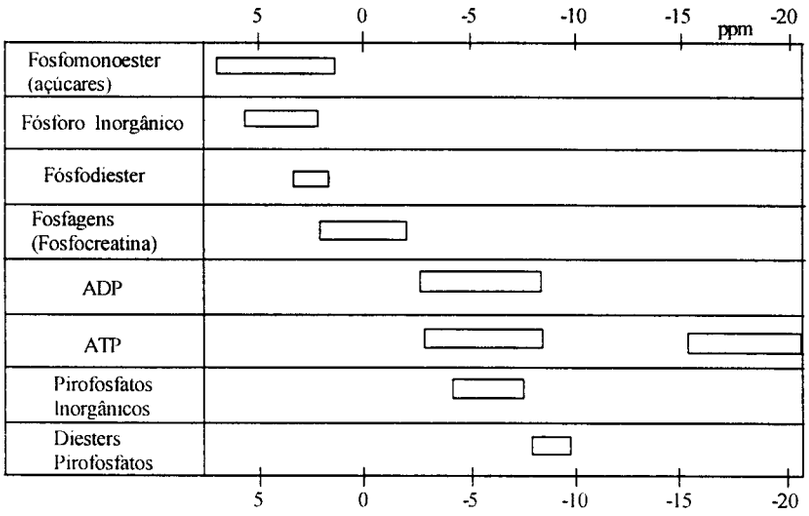


Tabela I.III. Deslocamento químico para compostos fosforados com referência zero na PCr.



Um espectro típico apresentando o deslocamento químico do ^{31}P, *in vivo* do músculo esquelético de rato, obtido no laboratório de RMN do IFSC-USP, está ilustrado na Figura I.12. Neste espectro observam-se as linhas associadas aos diferentes metabólitos fosforados presentes no músculo: a adenosina trifosfato (ATP), α, β e γ; a fosfocreatina (PCr), e o fósforo inorgânico (Pi).

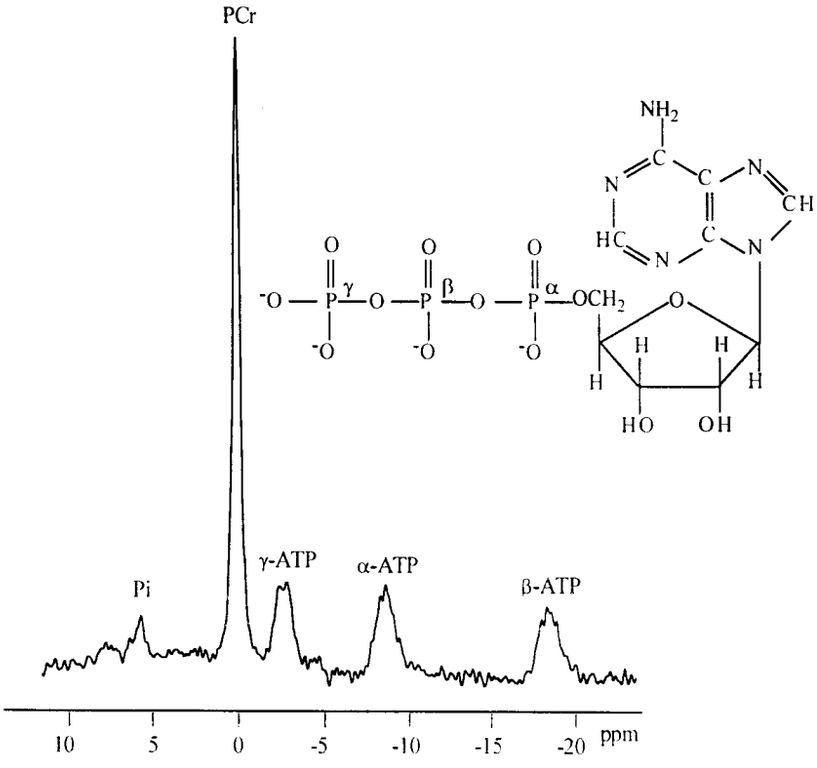


Figura I.12. Molécula de ATP e espectro de músculo de rato, obtido em nosso laboratório, em 34 MHz.

I.8.Acoplamento J

Além do deslocamento químico temos outro tipo de estrutura fina presente no espectro. Tomando como exemplo o etanol, ilustrado na Figura I.13, observamos que duas de suas linhas desdobram-se em outras, cujas separações *não dependem* do valor do campo magnético.

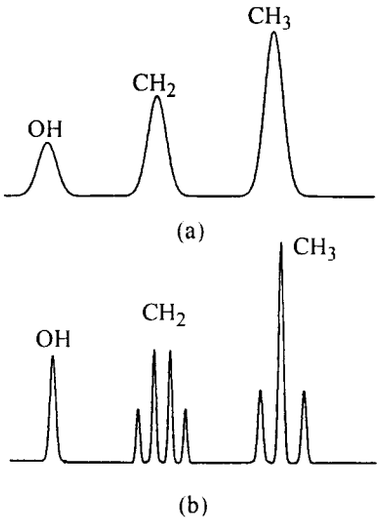


Figura I.13. Espectro de próton do álcool etílico (a) para moderada resolução e (b) em alta resolução mostrando os multipletos dos grupos CH_2 e CH_3.

Neste caso, estes multipletos têm origem no acoplamento entre os prótons de um grupo molecular e os outros prótons em grupos moleculares vizinhos. Este acomplamento é realizado pelas nuvens eletrônicas e é chamado *acoplamento spin-spin, acoplamento escalar* ou simplesmente *acoplamento J*. Podemos expressar esta interação através da seguinte hamiltoniana:

$$H = \vec{I}.\vec{\vec{J}}.\vec{S} \tag{24}$$

onde $\vec{\vec{J}}$ é o tensor acoplamento entre os spins $\vec{S}$ e $\vec{I}$.

Os níveis de energia para um sistema de dois núcleos com I=1/2 estão ilustrados a seguir na Figura I.14.

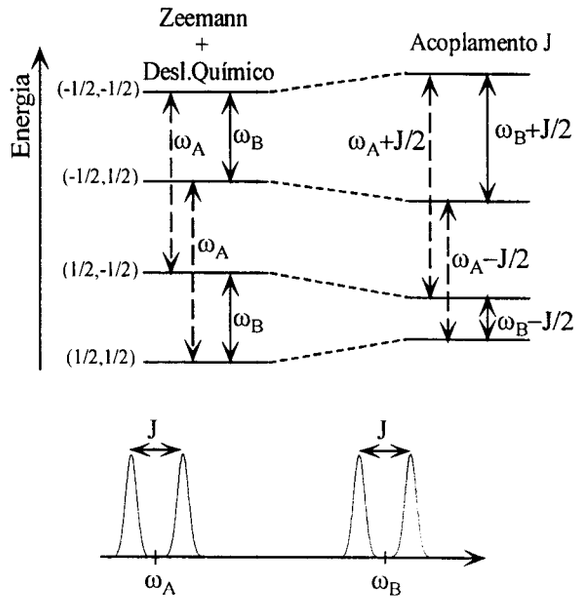


Figura I.14. Níveis de energia e espectros de dois núcleos com I=1/2, interagindo por acoplamento J.

Neste exemplo considera-se que os dois núcleos A e B são *distintos*, podendo ser de mesma espécie, bastando apresentarem diferentes valores de deslocamento químico. Portanto, os espectros resultantes quando os núcleos sentem a presença um do outro, ou seja, quando estão acoplados, apresentam desdobramentos em suas linhas. A separação é a mesma em ambos grupos vizinhos e é dada pela *constante de acomplamento J*, expressa em Hz.

No exemplo ilustrado na Figura I.13, o grupo CH_2 apresenta 4 linhas devido ao acoplamento J entre os ^1H deste grupo com os do grupo CH_3. O núcleos do grupo CH_3 agem como se constituíssem apenas um núcleo de spin 3/2 cujas orientações possíveis da componente z do momento magnético são: 3/2, 1/2, -1/2 e -3/2. Desta forma, os núcleos de ^1H do grupo CH_3 produzem 4 componentes de campo magnético adicionais sobre cada spin do grupo CH_2, induzindo a aparecimento das quatro linhas. De forma similar, o CH_3 apresenta 3 linhas devido ao acoplamento J entre os ^1H deste grupo com os do grupo CH_2. Os núcleos do grupo CH_2 agem com spin 1, cujas orientações são 1, 0 e -1, e o que justifica as 3 linhas observadas. Já o OH, devido à troca química muito rápida não apresenta desdobramento, ou acoplamento J.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

O espectro do ^{31}P do ATP, ilustrado na Figura I.15 contém os três grupos das linhas espectrais correspondendo aos grupos fosfatos α, β, e γ do ATP, os quais são quimicamente diferentes. Cada grupo possui um multipleto de linhas resultante da interação entre os fósforos vizinhos, através do *acomplamento spin-spin*, transmitida através da nuvem eletrônica. Observamos nesta figura, que a linha do fósforo γ do ATP desdobra-se em duas devido à sua interação com o ^{31}P do grupo β. Por sua vez, o sinal do fósforo β desdobra-se em um tripleto de linhas com intensidade 1:2:1 devido à interação com os fósforos dos grupos α e γ, desde que o acomplamento com estes núcleos é o mesmo. A linha do fósforo α é desdobrada em um dubleto pela interação com o ^{31}P do grupo β.

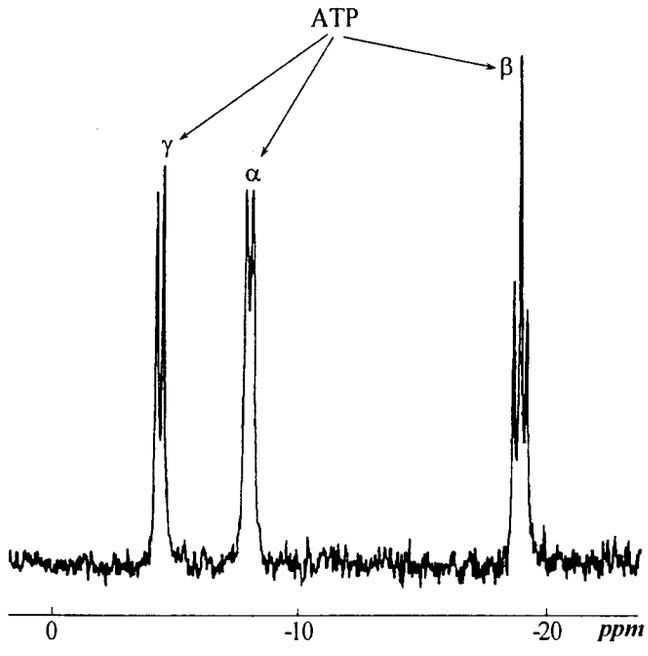


Figura I.15. Espectro ^{31}P obtido em 73.8MHz de uma solução de ATP em pH 7.0. (GADIAN D., 1982)

Existe também a contribuição dipolar direta entre os spins, no entanto, ela é promediada a zero no caso de líquidos devido ao rápido movimento das moléculas.

Capítulo II

Espectroscopia In Vivo

II.1.Introdução

O primeiro espectro de RMN *in vivo* de ^{31}P, em músculo, foi obtido em 1974 (HOULT D.I. et al., 1974). Este estudo, usando músculo esquelético de ratos, foi particularmente interessante pois à partir dele descobriu-se o potencial da espectroscopia *in vivo*.

Em 1981, espectros de ^{31}P em músculo humano mostraram mudanças metabólicas induzidas por doenças (ROSS D.B. et al., 1981). Estes espectros foram obtidos utilizando-se uma bobina de superfície sobre o antebraço, posicionado em um magneto de 20 cm de diâmetro. Estudos de metabolismo muscular em adultos (RADDA G.K. et al., 1983) foram as primeiras áreas de estudo clínico da espectroscopia *in vivo* por RMN.

Com o advento dos magnetos supercondutores, foi possível obter informações mais detalhadas de vários tecidos e órgãos, inclusive o cérebro, fígado e coração. O primeiro espectro de fósforo de um cérebro, foi realizado em 1983 (BOTTOMLEY P.A. et al., 1983).

Atualmente, a espectroscopia de RMN *in vivo* tem sido utilizada para o estudo do metabolismo de regiões bem definidas em tecidos e órgãos humanos. Esta técnica une a tomografia no diagnóstico, e a espectroscopia na análise química, e é denominada espectroscopia localizada *in vivo*. Através da tomografia podemos diferenciar anomalias anatômicas como tumores, edemas e processos inflamatórios, dos tecidos normais, baseando-se nas diferenças de densidade de hidrogênio e seus tempos de relaxação. A espectroscopia pode dar informações bioquímicas adicionais, que permitem uma melhor compreensão destes processos. Uma vez que os metabolismos biológicos são bastante variáveis, é importante limitar a observação a um volume ou região bem determinada, podendo desta forma selecionar um tecido homogêneo. Uma excitação seletiva pode ser realizada de duas maneiras: utilizando pulsos seletivos e gradientes, ou simplesmente utilizando bobinas de superfície. Nos experimentos realizados utilizou-se uma bobina de superfície solenoidal, e pulsos não

seletivos para obter informações do músculo *soleus* da pata traseira de ratos e camundongos.

II.1.1.Técnicas Seletivas

Entre as técnicas utilizadas, a mais simples é a utilização do perfil de sensibilidade de bobinas de superfície, para definir o volume a ser estudado. (ACKEMANN J.K. *et. al.*, 1980). Esta técnica é muito útil em estudos de tecidos superficiais ou para examinar músculos e tumores superficiais. Para obter um espectro de regiões mais profundas com bobinas de superfície existem técnicas que utilizam a inomogeneidade de B_1 e múltiplas aquisições com ângulos de excitação distintos para suprimir sinais fortes perto da bobina. Estas técnicas têm a vantagem de apresentar excelente relação sinal-ruído, no entanto, o perfil de sensibilidade não é bem definido.

Quando há a necessidade de uma definição precisa de volume, utilizam-se técnicas diretamente relacionadas com as seqüências de tomografia que utilizam pulsos seletivos e codificação de fase, chaveando gradientes de campo magnético. A vantagem da possibilidade de definir um volume a partir de uma imagem é a flexibilidade na posição e tamanho do volume selecionado. Uma técnica bastante utilizada para espectroscopia em ^{31}P, é chamada *Image Selected in Vivo Spectroscopy* (ISIS) (ORDIDGE R.J. et.al,1986). Nesta técnica a magnetização de equilíbrio é preparada com pulso seletivos de inversão nas três direções principais antes de excitar toda magnetização com um pulso não seletivo de 90° e realizar a aquisição do FID. Para cancelar o sinal fora do volume localizado, é necessário aplicar um esquema de subtração e adição com oito combinações de pulsos, onde o sinal de dentro do volume se soma coerentemente.

II.2.Núcleos Importantes em Espectroscopia In Vivo

Na Tabela II.I, apresenta-se algumas características dos núcleos atômicos mais utilizados em espectroscopia por RMN *in vivo*. Os núcleos mais comuns no corpo humano e em outros sistemas vivos são: hidrogênio, carbono e o oxigênio. O principal isótopo do núcleo de hidrogênio é o ^{1}H, um próton. Devido à sua grande abundância natural, intenso momento magnético, spin 1/2 e alta concentração

fisiológica em seres vivos, ele é um excelente núcleo para a espectroscopia *in vivo* por RMN. No entanto, apresenta uma faixa muito estreita de deslocamentos químicos isotrópicos, aproximadamente 10 ppm.

Tabela II.I. Principais núcleos estudados em RMN *in vivo*

Núcleo	Spin	Momento Magnético	Sensibilidade Relativa em campo constante	Abundância Natural (%)	Freqüência de RMN em MHz por Tesla
^{1}H	1/2	2,79	100	99,98	42,57
^{2}D	1	0,86	$1,5 \cdot 10^{-4}$	0,015	6,54
^{13}C	1/2	0,70	$1,6 \cdot 10^{-2}$	1,11	10,70
^{14}N	1	0,40	$1,0 \cdot 10^{-1}$	99,6	3,07
^{15}N	1/2	-2,83	$3,7 \cdot 10^{-4}$	0,4	4,31
^{17}O	5/2	-1,89	-	0,04	5,77
^{19}F	1/2	2,63	83,0	100	40,06
^{31}P	1/2	1,13	6,6	100	17,24

Outro núcleo interessante em RMN *in vivo* é o ^{31}P. Ele tem spin 1/2, um grande momento magnético, alta abundância natural, e apresenta um maior intervalo de deslocamentos químicos isotrópicos, aproximadamente 30 ppm, na área de interese da espectroscopia *in vivo*. No entanto possui uma menor concentração fisiológica em relação ao ^{1}H.

O isótopo ^{13}C tem spin 1/2, possui um excelente deslocamento químico, aproximadamente 250 ppm, e está presente em todas as moléculas orgânicas. Entretanto possui baixíssima abundância natural (1,1%), e pequeno momento magnético.

Outros núcleos citados na Tabela II.I, são também utilizados em RMN. Entretanto, estes núcleos possuem momento magnético $\vec{\mu}$ pequeno e/ou baixa abundância natural. Além disso, núcleos com spins (I) diferente de 1/2 possuem momento de quadrupolo elétrico, o que na presença de possíveis gradientes de campo elétrico podem ocasionar um alargamento da linha de ressonância e, conseqüentemente, uma perda de sensibilidade no sinal de RMN.

Outra dificuldade do estudo de RMN *in vivo,* está associado com o longo valor do tempo de relaxação longitudinal dos metabólitos analisados *in vivo*, o que torna mais longo o tempo de medida. Estes fatores limitam de forma considerável o estudo de RMN, mas a importância das informações que podem ser obtidas através deste estudo, para um melhor conhecimento de sistemas vivos, tem levado a muitas tentativas de uso destes núcleos.

Devido as suas propriedades o ^{31}P é um dos núcleos mais utilizados em RMN *in vivo* e, partir de agora, será discutida apenas suas características.

II.3.O ^{31}P

O ^{31}P está presente nos metabólitos energéticos e é bastante abundante no corpo humano, aproximadamente 1% do peso (FOSTER M.A., 1984). Ele está presente também em açúcar-fosfatos, nos ácidos nucléicos e forma uma parte do grupo polar dos fosfolipídios de várias membranas celulares. Em geral, o fósforo do DNA e da maioria dos fosfolipídeos não são observados no espectro de ^{31}P em tecidos vivos. Isto acontece em parte porque estão presentes em concentração relativamente baixa e especialmente devido a falta de movimento molecular, que ocasiona um alargamento da linha e conseqüente perda de sensibilidade do sinal de RMN. Em alta resolução, pode-se observar o sinal somente de moléculas pequenas e móveis, que ocorrem em concentrações maiores que 1 mM em sistemas vivos.

Nestes limites, o estudo ^{31}P restringe-se aos grupos fosfatos de alta energia, como a adenosina trifosfato (ATP), a fosfocreatina (PCr), e o fostato inorgânico (Pi). Um espectro de RMN de ^{31}P *in vivo* mostra um pequeno números de linhas espectrais, com um razoável deslocamento químico entre estas (Figura I.12, pag. 21).

A natureza não destrutiva da investigação por RMN torna possível o estudo de um tecido, como um músculo, em vários estados metabólicos (em repouso, durante o exercício e recuperação). As intensidades relativas das linhas espectrais de diferentes metabólitos fosforados fornecem informações sobre o metabolismo energético de tecidos, além da possibilidade de medir o pH intracelular através da observação do deslocamento químico destes metabólitos.

II.4.Metabolismo Energético do Fósforo

Nas inter-relações dinâmicas existentes entre células, tecidos, órgãos e sistemas fisiológicos ocorre a manutenção de um relativo estado de equilíbrio do meio interno (homeostasia). Este equilíbrio é mantido através de diversos processos regulatórios com a participação dos diferentes sistemas fisiológicos.

Toda atividade biológica, desde a atividade celular, até a atividade do organismo como um todo, requer energia. O exercício, ou a atividade contrátil do músculo promovem alterações metabólicas importantes a nível bioenergético sobre as vias preferenciais de utilização dos nutrientes para a formação do substrato energético: a adenosina trifosfato (ATP).

Quando o ATP reage com a água num processo denominado hidrólise, a ligação de fosfato mais externa é desfeita e forma-se um novo composto, o ADP. Nesta reação são liberadas cerca de 7,3 Kcal por mol de ATP.

$$ATP + H_2O \Leftrightarrow ADP + P + 7{,}3 \text{ kcal/mol}$$

A energia liberada durante a decomposição do ATP é usada diretamente pelos processos fisiológicos que exigem energia. Por exemplo, no músculo, essa energia é utilizada pelos elementos contráteis, induzindo a contração e relaxação das fibras musculares.

No músculo humano em repouso as concentrações típicas dos substratos energéticos são ATP = 8.2mM; ADP=6±3μM; PCr=38±2mM (TAYLOR D.J. et al, 1986). As linhas de ressonância do α-ATP e α-ADP coincidem devido ao ambiente químico semelhante, destes grupos fosfatos. Igualmente acontece para o γ-ATP e β-ADP. Entretanto, devido a ligação do ADP com uma proteína (VEECH R.L. et al., 1979), o ADP permanece praticamente invisível para a análise de RMN do ^{31}P.

A biossíntese de ATP na célula pode ocorrer por três processos distintos: o primeiro deve-se a hidrólise das moléculas de fosfocreatina, um processo anaeróbico aláctico.

A quantidade total de ATP dentro do organismo tende a permanecer em equilíbrio (homeostasia), fornecendo energia suficiente apenas para realizar um exercício máximo por alguns segundos. Como o ATP não pode ser fornecido através do sangue nem à partir de outros tecidos, ele é ser continuamente reciclado dentro de cada célula. Parte dessa energia para a ressíntese do ATP é fornecida rapidamente e

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

sem oxigênio pela transferência da energia química de outro composto fosfato de alta energia denominado fosfocreatina, ou PCr. A concentração de PCr na célula é aproximadamente três a cinco vezes maior que a de ATP. Por esta razão o PCr é considerado o *reservatório* de fosfato de alta energia.

A molécula de PCr é semelhante à molécula de ATP, pelo fato de uma grande quantidade de energia livre ser liberada quando é desfeita a ligação entre as moléculas de creatina e de fosfato. Levando-se em conta que o PCr possui uma energia livre de hidrólise mais alta que o ATP, seu fosfato é doado diretamente ao ADP para formar novamente o ATP.

$$PCr \Leftrightarrow C + Pi + Energia$$

Durante o repouso, a diminuição da demanda metabólica ou a maior disponibilidade de energia, permite a ressíntese da PCr. A abundância de fosfocreatina e seu alto potencial de transferência de fosforila em relação ao ATP são fatores que a tornam um tampão de fosfato muito eficaz. A fosfocreatina mantém uma alta concentração de ATP durante os períodos de exercício muscular, sendo a principal fonte de energia imediata para exercício de curtíssima duração e grande intensidade.

O segundo processo refere-se à hidrólise da molécula de glicose até o produto final, denominado piruvato, com a formação de pequena quantidade de ATP. Quando o suprimento de oxigênio é insuficiente para a conversão do piruvato o grupo acetil-CoA, ocorre a formação do ácido lático. Este processo (anaeróbico lático) ocorre durante exercícios extenuantes, onde os fosfatos de alta energia devem ser ressintetizados continua e muito rapidamente, para que o exercício extenuante possa continuar além de um curto período de tempo. De certa forma esse mecanismo de formação do ácido láctico poupa tempo, e torna possível a formação rápida de ATP pela fosforilação do substrato, mesmo quando o fornecimento de oxigênio é insuficiente ou quando as demandas energéticas ultrapassam a capacidade para ressíntese aeróbica de ATP.

O terceiro e último processo de biossíntese é o processo oxidativo que, por utilizar o oxigênio (aeróbico), acarreta uma grande produção de ATP. Este mecanismo, difere dos demais, pois utiliza como substrato a glicose (ou outros carboidratos), os aminoácidos e além de diversos lipídeos, que por apresentarem uma

cadeia carbônica longa, são capazes de formar muitas moléculas de acetil-CoA e consequentemente muitos moles de ATP. Na glicólise, até a formação de piruvato, são formados 4 moles de ATP com um saldo de 2 moles de ATP por mol de glicose, enquanto 36 moles de ATP são formados quando a glicose é oxidada totalmente até CO_2 e H_2O (fosforilação oxidativa) que requer suprimento contínuo de oxigênio.

Resumindo, exercício do tipo aeróbico se refere àquele que requer a utilização de vias preferencialmente oxidativas na mitocôndria, para a biossíntese do ATP. As reações aeróbicas proporcionam o importante estágio final para a transferência de energia, especialmente se o exercício vigoroso prossegue por mais alguns minutos. Por outro lado, quando a via de produção de ATP for insuficiente para manter um exercício crescente inicia-se a predominância da via anaeróbica (glicólise) com conseqüente acúmulo de ácido láctico intracelular. A energia liberada na glicólise é rápida e não requer oxigênio, porém relativamente pouco ATP é ressintetizado por este mecanismo.

II.5.Bioquímica do músculo estudada através de RMN do ^{31}P

A principal contribuição da RMN do ^{31}P para o estudo da fisiologia e fisiopatologia do músculo é a habilidade de medir seqüencialmente as variações das concentrações dos metabólitos fosforados e o pH intracelular, em situações de respouso, durante o exercício e recuperação. As reações bioquímicas são diretamente refletidas em uma perturbação do espectro de RMN e podem ser diretamente correlacionadas. Durante a contração muscular (Figura II.1), a energia livre do ATP é convertida em energia mecânica via a interação de duas proteínas musculares, a actina e a miosina.

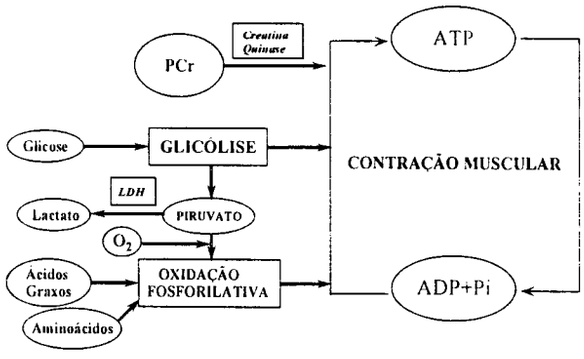


Figura II.1. Ciclo energético do fósforo.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

O trabalho muscular está relacionado com a hidrólise do ATP. Sempre que submetido a exercício de baixa intensidade a concentração de ATP permanece em equilíbrio, existindo um balanço adequado entre a demanda e o suprimento de energia. Quando a glicólise anaeróbica é incializada, a acidose intracelular é rapidamente refletida no espectro de RMN por um deslocamento e aumento do sinal do fósforo inorgânico (Pi). A informação contida em um espectro de ^{31}P de músculo humano é sem dúvida muito rica, e através da RMN esta reação de transição do repouso para o exercício pode ser bem documentada.

Diferentes protocolos têm sido desenvolvidos para o estudo da bioenergética por RMN do ^{31}P em humanos. Estes protocolos são escolhidos levando em consideração o tipo de músculo e a intensidade do exercício incluindo a estabilidade da condição de estado estacionário e fadiga.

II.6.Medida do pH intracelular através de RMN in vivo do ^{31}P

A medida do pH intracelular através da RMN do ^{31}P (MOON R.B.; RICHARDS J.H.,1973), tem a vantagem de ser não invasiva, além de poder ser realizada continuamente. Esta medida fornece uma importante contribuição para a compreensão do metabolismo *in vivo*. O pH de muitos tecidos e órgãos são excelentes guias do estado metabólico, isto é porque o declínio do pH reflete-se na produção de ácido lático que só é acumulado sob de condições isquêmicas (ausência de oxigenação) ou de *stress*.

Com a alteração do pH intracelular, ocorre uma considerável modificação nos deslocamentos químicos, apresentados pelos diferentes metabólitos fosforados. Entretanto, a linha espectral mais afetada pela alteração do pH é aquela associada ao fósforo inorgânico (Pi). Outras linhas espectrais do ^{31}P também podem ser utilizadas para a avaliação do pH intracelular. Porém as alterações do deslocamento químico apresentada por estas linhas são muito pequenas, principalmente para a PCr. Por essa razão ela é utilizada como referência para a avaliação do deslocamento químico do Pi.

O fósforo inorgânico existe principalmente como HPO_4^{2-} e $H_2PO_4^-$ em torno do pH neutro. Quando não existem trocas químicas essas duas espécies deveriam

aparecer em duas ressonâncias separadas uma da outra de 2.4 ppm. Em solução, entretanto as duas espécies *trocam* uma com a outra muito rapidamente, e o resultado observado consiste em uma simples freqüência de ressonância, a qual é determinada pela quantidade relativa das duas espécies. A freqüência do sinal medido como função do pH produz um tipo usual de curva de pH (Figura II.2). Portanto é possível determinar o deslocamento químico da ressonância do fósforo inorgânico *in vivo* e consequentemente determinar o pH atráves da curva de comparação.

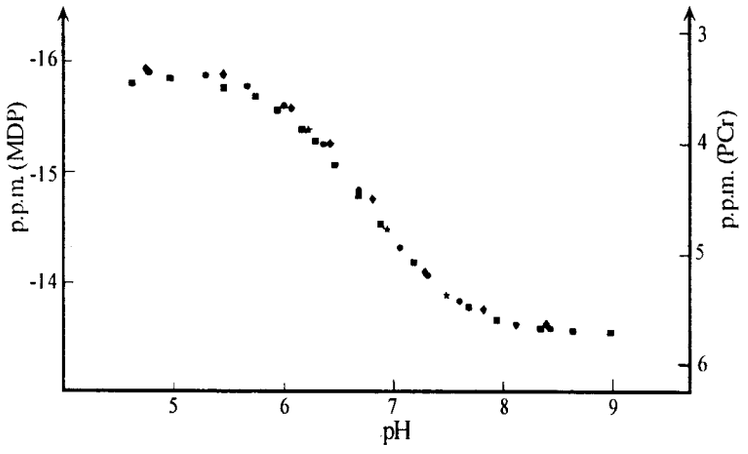


Figura II.2. Variação do deslocamento químico do fósforo inorgânico relativamente a PCr e ao (PDM) difosfato de metileno. A solução contém 10mM de Pi e 10 mM de PCr e foi ajustada em várias forças iônicas (GARLICK P.B.; RADDA G.K.; SEELEY P.J., 1979.)

A ligação do Pi com macromoléculas, com íons metálicos, ou a mudança de temperatura afetam este deslocamento químico. No entanto, há uma considerável quantidade de evidências experimentais confirmando que a RMN do ^{31}P é uma técnica aceitável de medição do pH intracelular. Vários experimentos mais específicos foram realizados para a verificação do método, como por exemplo a comparação da medida do pH através da utilização de microeletrodos (NUCCITELLI R.et al., 1981). A curva de calibração utilizada para o cálculo do pH é:

$$pH = 6{,}75 + log\frac{(\sigma - 3{,}27)}{(5{,}69 - \sigma)} \qquad (25)$$

onde σ é o deslocamento químico em partes por milhão entre o sinal do Pi e PCr, e um erro estimado de 0,1 unidades de pH (GADIAN et al., 1979).

II.7.Exemplos de Estudos Realizados Através da Espectroscopia do ^{31}P

Como exemplo da aplicação da espectroscopia *in vivo* no estudo da fisiologia humana e da sua patologia, ilustra-se na Figura II.3, espectros de ^{31}P, obtidos com uma bobina de superfície num braço de um paciente saudável (a), e de um paciente com síndrome de McArdle (b), ao longo de alguns ciclos de exercício muscular isquémico. No primeiro caso nota-se um decréscimo na concentração de PCr, um aumento de Pi e uma diminuição no pH. No segundo caso, as características espectrais são semelhantes, mas não se observa a diminuição de pH esperada. Neste caso, não se acumula ácido láctico após o exercício muscular, e isto ocorre devido à ausência de atividade da fosforilase do glicogênio.

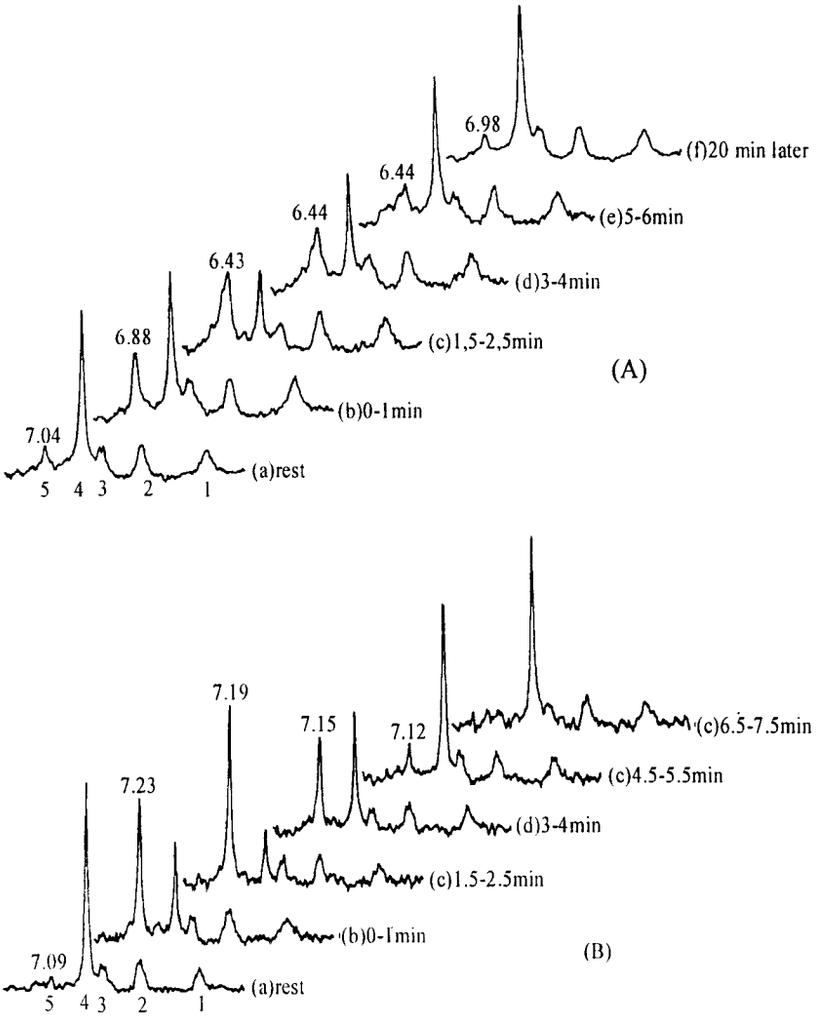


Figura II.3. Espectro de ^{31}P do antebraço em exercício isquémico de um paciente saudável (A) e sofrendo sindrome de McArdle (B) (ROSS et al., 1981).

A Figura II.4 ilustra o resultado de um experimento destinado a localizar o fígado de um rato anestesiado (GORDON R.E. et al., 1980). Para avaliar a seletividade do método, procurou-se neste experimento obter espectro similar ao obtido de um fígado perfundido (e). Inicialmente foi utilizada uma bobina que produzia um campo de RF homogêneo em torno da região do fígado. Desta forma, acabava-se excitando outras regiões, indesejáveis (de músculo, diafragma, etc.), devido ao processo não seletivo empregado na excitação dos núcleos atômicos (a). Já com a utilização de bobinas de superfície, onde o campo de RF apresenta uma grande variação em função da distância axial, a seletividade desejada foi parcialmente obtidas (b), (c) e (d) tornando o resultado mais próximo do esperado (e).

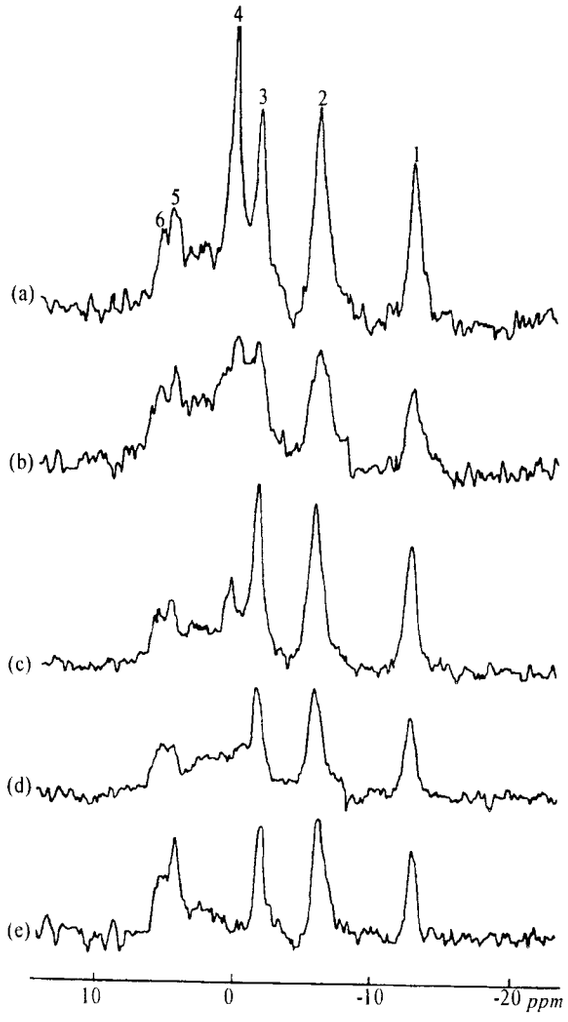


Figura II.4. Espectro de ^{31}P do fígado de um rato intacto. a)Normal (1,2,3 ATP; 4-PCr: 5-Pi; 6-AMP; IMP) b)-d): espectros com localização espacial - Onde observa-se a diminuição do sinal de PCr, que em a) não provinha, na sua maior parte do fígado (GORDON R.E. et al., 1980)

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

A seguir será ilustrado um exemplo da aplicação da espectroscopia seletiva ISIS (ORDIDGE R.J, 1986). A Figura II.5, ilustra espectros de próton: em (A) refere-se ao espectro de próton sem utilização de técnicas seletivas, em (B) utilizando-se ISIS com a seleção do músculo *soleus* e em (C) utilizando-se ISIS com a seleção da tíbia. Neste exemplo podemos perceber as diferenças entre estes os espectros dos diferentes tecidos, e portanto a importância das técnicas seletivas para a análise bioquímica de certas regiões específicas.

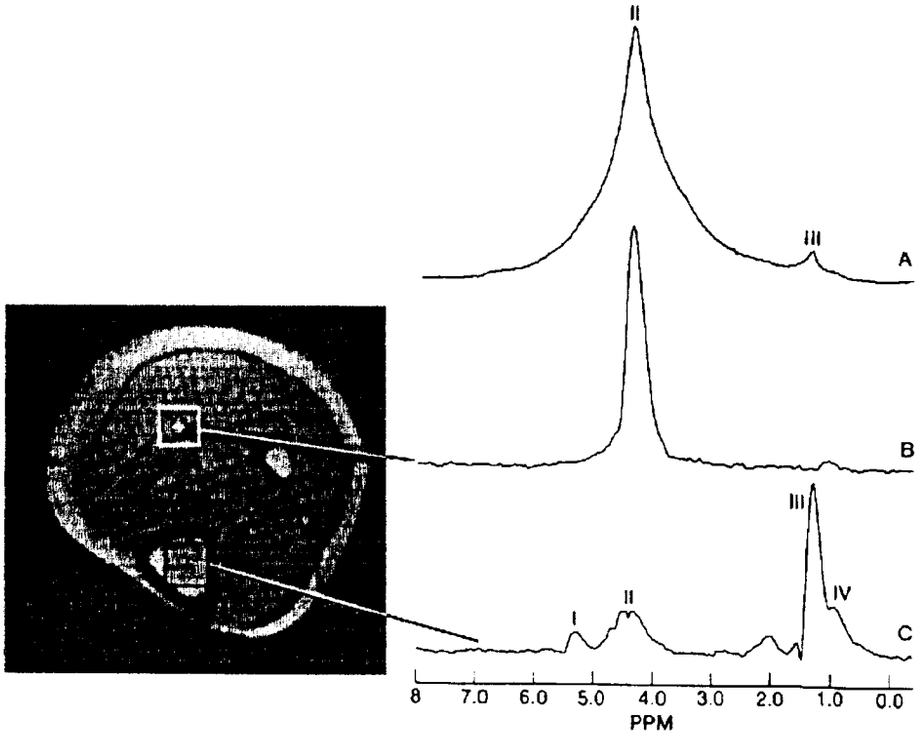


Figura II.5. Imagem de uma fatia da seção transversal de uma perna entre o joelho e o pé, (A) espectro de próton em 80 MHz, (B) espectro do musculo *soleus*, selecionado por ISIS e (C) espectro da tíbia, também selecionada por ISIS. Observam-se as linhas da água (II),dos ácidos graxos (-HC=CH-) (I), $(-CH_2-)_n$(III), e $(-CH_3-)$ (IV).

Capítulo III

Materiais e Métodos

III.1.Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear

Os principais componentes do espectrômetro de RMN utilizado, estão ilustrados no diagrama de blocos a seguir:

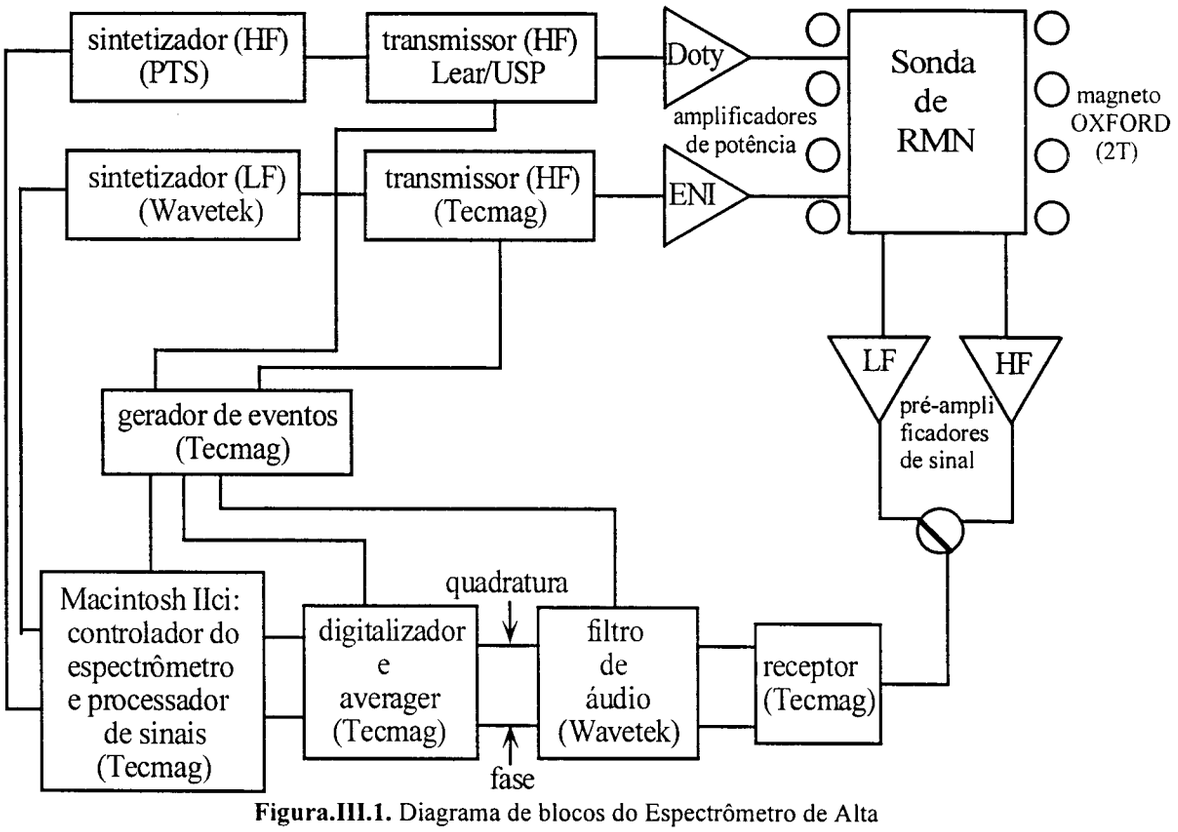


Figura.III.1. Diagrama de blocos do Espectrômetro de Alta Resolução

A geração de pulsos de RF, com ajuste de duração, fase e amplitude, fica a cargo dos 2 transmissores que são controlados pelo gerador de eventos. Uma vez produzidos os pulsos de RF em baixo nível, eles são intensificados por amplificadores de alta potência e encaminhados à sonda.

Após a excitação do sistema de spin, o sinal de RMN é pré-amplificado e levado ao receptor, o qual fornece ao digitalizador o sinal com suas componentes em fase e quadratura. Estes sinais digitalizados e adequadamente promediados pelo *averager* são enviados ao computador para seu processamento. O gerador de eventos estabelece toda a temporização do experimento e é programado pelo computador, o qual gerencia todo o espectrômetro via interfaces seriais.

O campo magnético externo é produzido por um magneto supercondutor de 2T da Oxford Instruments. Com esse campo, a freqüências de ressonância do ^{1}H, fica em torno de 85 MHz, enquanto que as freqüência do núcleo de ^{31}P, por exemplo, fica por volta de 34 MHz. Esse magneto possui uma estabilidade de 0,1 ppm/hora e uma homogeneidade de campo de 25 ppm numa esfera de 20mm de diâmetro. A homogeneidade do campo é garantida através de 7 bobinas de *shimming* supercondutoras e 15 bobinas à temperatura ambiente.

III.2. Sondas de RMN

Com visto no capítulo I, para excitarmos os núcleos atômicos de uma amostra é necessário aplicarmos um campo de RF, perpendicular à sua orientação de equilíbrio. Para isso aplicamos uma corrente alternada de freqüência igual à freqüência de Larmor. Esta corrente deve percorrer a bobina gerando um campo de RF de intensidade suficientemente grande de modo que consiga retirar a magnetização de sua posição de equilíbrio. Normalmente, a potência necessária é de algumas dezenas de Watts, o que torna as condições de casamento de impedâncias muito importantes, pois uma elevada onda estacionária pode causar danos aos equipamentos. Assim, a sonda deve apresentar uma impedância de 50Ω, para que a potência não seja refletida. A bobina de detecção de sinal é a mesma de excitação. Quanto mais alto é o valor do campo de RF (B_1), mais sensível será a bobina para detectar as variações de fluxo magnético, gerado pelos momentos magnéticos nucleares (Princípio da Reciprocidade). O circuito de RF está ilustrado na Figura III.2.

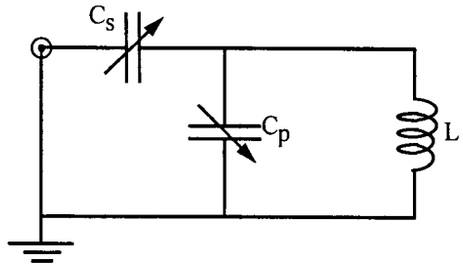


Figura III.2. Sonda simples, circuito básico de RF

Os capacitores Cs e Cp são responsáveis, respectivamente, pelo ajuste da impedância e pela sintonia do circuito. Conhecendo-se a indutância (L), o fator de qualidade (Q) da bobina, a impedância de entrada (R_0) que deverá ser obtida e a freqüência do circuito (ω), a qual deve ser igual à freqüência de ressonância dos núcleos, podemos determinar os valores das capacitâncias a serem utilizadas pelas seguintes expressões:

$$C_s = \left[\left(Q\omega L - R_0\right)R_0\omega^2\right]^{-\frac{1}{2}} \tag{26}$$

$$C_p = \frac{QR_0\omega c_s - 1}{QR_0\omega^3 c_s L} \tag{27}$$

Os valores de Q e L são determinados experimentalmente via um medidor de fator de qualidade e ω é dado pela equação de Larmor ($\omega = \gamma B_0$).

O circuito de sintonia é importante, pois é o intermediário entre o detector é o primeiro estágio de amplificação do sinal. Portanto deve ser projetado tal que minimize as perdas de sinal e também igualar a impedância do circuito com a impedância ótima para a entrada do pré amplificador (50Ω).

Outros tipos de circuitos de sintonia são os balançeados. Um circuito balanceado indutivo, Figura III.3, possui a vantagem do acoplamento indutivo sempre poder alterar-se em função de uma eventual modificação na distribuição das capacitâncias parasitas, por exemplo, em amostras assimétricas (VIDOTO E.L.G., 1995). Portanto, sofre um menor desvio na freqüência de operação, sendo assim menos sensível a mudanças, além disto as perdas por condutividade são menores.

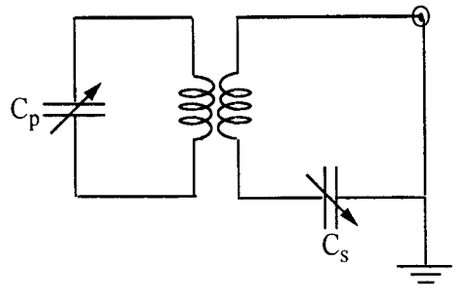


Figura III.3. Circuito balanceado indutivo.

III.2.1.Susceptibidade Magnética da Amostra

Observou-se também que ocorrem efeitos de susceptibilidade magnética devido à própria assimetria do animal em relação ao campo magnético. Através de alguns testes, verificou-se que a susceptibilidade magnética é minimizada quando a simetria do corpo é respeitada. A contribuição para o "desvio" do deslocamento químico (σ_m) resulta das circulações eletrônicas induzidas pelo campo aplicado nas moléculas distantes. Estas circulações são responsáveis pela susceptibilidade magnética macroscópica da amostra. Estas correntes criam um campo magnético secundário na posição do núcleo em estudo, cuja intensidade é proporcional à susceptibilidade de volume χ_v, da amostra. σ_m depende também da forma desta, sendo nula para uma amostra esférica, e $2\pi\chi_v/3$ para uma amostra cilíndrica transversal ao campo aplicado (GIL V.M.S.; GERALDES C.F.G.C., 1987).

Quando os deslocamentos químicos são determinados em relação a uma referência interna, isto é, adicionada à própria amostra, o efeito σ_m, pode ser ignorado uma vez que todos os núcleos de uma mesma amostra são igualmente afetados. No caso de uma referência externa isto não ocorre e a diferença entre estes deslocamentos é:

$$\delta_i = (\sigma_R - \sigma).10^{-6} = \delta_E - \frac{2}{3}\pi(\chi_R - \chi).10^{-6} \qquad (28)$$

onde: δ_I é o deslocamento químico da referência interna e δ_E é o deslocamento químico da referência externa. Desta forma, o método escolhido para estabelecer uma referência para as medidas dos deslocamentos químicos do ^{31}P, é utilizando uma das linhas com posição mais estável do próprio espectro adquirido, a linha da PCr, que por convenção foi escolhida como zero ppm. Além disso, o efeito da susceptibilidade magnética é

minimizado pela utilização do processo de homogeneização do campo magnético através das bobinas de *shimming*.

III.3.Adaptações do Espectrômetro para as medidas de RMN in vivo

A primeira alteração no espectrômetro foi o revestimento interno com uma blindagem de cobre, com a intensão de eliminar os ruídos captados pela sonda.

A principal dificuldade foi em homogeneizar do campo magnético. Para tal, as sondas foram montadas com o mínimo de metal (cobre e alumínio), sendo substituídos por acrílico. Para o procedimento de homogeneização manual do campo magnético (*shimming*), utilizou-se o sinal do próton devido a sua vasta quantidade *in vivo* e pequeno deslocamento químico, praticamente o sinal observado é o da água.

A idéia inicial foi de utilizar uma sonda de dupla ressonância para realizar o procedimento de *shimming*. Neste procedimento há uma queda na qualidade da sonda em relação a sonda simples. Uma segunda tentativa foi a utilização de um circuito com capacitores (série e paralelo), adicionados na entrada da sonda, para a realização da sintonia do ^{1}H, na própria sonda para o ^{31}P. No entanto estas duas idéias foram abandonadas quando notou-se que não havia necessidade da sintonia em ^{1}H para a realização do procedimento de *shimming,* devido a grande intensidade do sinal. Também verificou-se a existência de proteção suficiente contra o potência refletida, para a realização deste experimento no sistema utilizado.

Para o sistema de estimulação, ao invés de fio comuns, utilizou-se cabos coaxiais protegidos por um filtro de RF, novamente evitando a captação de ruídos indesejáveis durante o processo de medida.

Para as medidas em camundongos utilizou-se uma bobina solenoidal cônica, com 1,0cm de diâmetro superior e 9 voltas, em um circuito convencional. Para as medidas em ratos utilizou-se uma bobina solenoidal cônica, de 2.5cm de diâmetro superior e 5 voltas, em um circuito balanceando. O ajuste da bobina solenoidal cônica a perna do animal, Figura III.4, aumenta a sensibilidade da mesma, ocasionando uma melhora significativa na relação sinal/ruído.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA

A sintonia do ^{1}H e ^{31}P foram realizadas em 85 MHz e 34 MHz, respectivamente. Utilizamos um tempo de repetição de 3 segundos e banda espectral de 4 KHz. A duração do pulso de rádio freqüência utilizado foi de 15 μs para o circuito balanceado e 4 μs para o circuito convencional, correspondendo a um pulso de 90°. Para as medidas realizadas com os camundongos foram colecionados 1000 FIDs. Para as medidas com os ratos estimulados, os espectros foram adquiridos com 20 FIDs, correspondendo a 1 min de medida.

Os espectros foram processados, fazendo-se primeiramente a correção da linha de base, e posteriormente multiplicação exponencial de 5Hz cuja expressão é dada a seguir:

$$f(t) = exp-[t * \pi * (lb)] \qquad (29)$$

onde *lb* é largura de linha em Hz. Esta multiplicação foi seguida por uma correção de fase.

III.4.Metodologia na preparação dos animais antes e durante as medidas por RMN

A lesão foi induzida pelo intenso exercício de esteira. Os animais correram durante seis horas em uma esteira rolante com um intervalo de descanso de meia hora após as três primeiras horas de exercício. Os animais foram analisados em RMN nos 1º, 3º, 5º, 8º e 15º dias após a lesão, ou exercício intenso. Foram utilizados aproximadamente 50 animais, para cada sub grupo foram analisados de 5 a 8 animais.

No grupo estimulado foram utilizados 14 ratos fêmeas, da espécie wistar, com peso corporal de 300gr em média. Os animais foram obtidos no biotério central da UFSCar e mantidos no biotério do laboratório de neurociências com ciclo claro-escuro 10-14h, ração e água "ad libitum". Os animais foram divididos aleatoriamente em 07 grupos contendo dois animais por grupo. Os grupos estudados foram: *Grupo Hipotireóideo Castrado, Grupo Hipotireóideo, Grupo Hipertireóideo Castrado, Grupo Hipertireóideo, Grupo Castrado, Grupo ACL* e *Grupo Controle.* O hipotiroidismo foi induzido através de tireoidectomia total e os animais permaneceram 06 semanas em repouso, previamente à realização do experimento. O hipertireoidismo foi induzido por

injeções de T4 (hormônio da tireóide), por via sub-cutânea à dose de 25 μg/kg. As aplicações foram realizadas 6 vezes por semana durante 4 semanas. A castração foi obtida através da ovariectomia bilateral dos animais. A ACL foi injetada por via subcutânea na região lateral do tendão de *Achilles*. A dosagem utilizada foi de 5mg/kg com uma concentração de 15 mg/ml realizadas 3 dias após a injeção. A miotoxina ACL é uma proteína do tipo PLA_2 que corresponde a um fragmento do veneno total da cobra (*Agkistrodon contortrix laticinctus*). Esta miotoxina vem sendo utilizada como um modelo de lesão muito eficiente tendo em vista que estudos mostraram o efeito miotóxico da ACL 5 minutos após a injeção, (JOHNSON E.K.; OWNBY C.L., 1993) efeito este caracterizado por necrose muscular.

Os animais foram anestesiados com administração intraperitonial de "Thiophental" à dose de 5mg/kg permanecendo anestesiados por aproximadamente 01 hora. E então, a pata traseira (direita) do animal era tricotomizada permitindo a fixação dos eletrodos. Estes eletrodos eram auto adesivos, de cobre, e foram posicionados proximal e distalmente à região posterior da perna do animal promovendo a estimulação da musculatura extensora do tornozelo. Para auxiliar na fixação dos eletrodos durante a contração foi utilizado um enfaixamento da região com fita *teflon*. Posteriormente a perna foi posicionada no interior da bobina e realizou-se uma estimulação prévia, com intensidade crescente para a determinação do valor ideal para a estimulação. A intensidade de estimulação utilizada no experimento foi determinada como sendo o valor suficiente para o aparecimento dos abalos musculares. O animal foi posicionado na sonda de modo que a pata traseira encaixava-se dentro de uma bobina solenoidal cônica.

As medidas de RMN *in vivo* foram realizadas utilizando uma sonda convencional e outra balanceada. Entretanto *in vivo* é mais interessante trabalhar com um circuito balanceado, pois ao se trabalhar com animais anestesiados, muitas vezes as doses de anestésico aplicada não são suficientes para manter o animal em absoluto repouso durante todo o tempo de experimento. E a utilização deste tipo de circuito garante um bom resultado, mesmo existindo alguma movimentação da perna do animal na bobina.

O protocolo de estimulação utilizado no presente trabalho apresentam um período inicial de repouso com duração de 01 minuto, duas séries constituídas por 03 minutos de contração seguidas por 05 minutos de repouso. As medidas foram realizadas a cada minuto, totalizando 17 espectros para cada animal analisado. No processo de estimulação foi utilizado um aparelho "Kinesis" que gerava uma corrente elétrica bifásica assimétrica balanceada (Figura III.4). Foi utilizado um padrão de estimulação com trens de pulsos onde o tempo de passagem da corrente era de 9 segundos intervalado por 01 segundo de repouso. O tempo de subida do pulso foi de 0,1 segundo e a freqüência utilizada foi de 13 Hz e aproximadamente 30V. Tais parâmetros de contração promoviam abalos musculares.

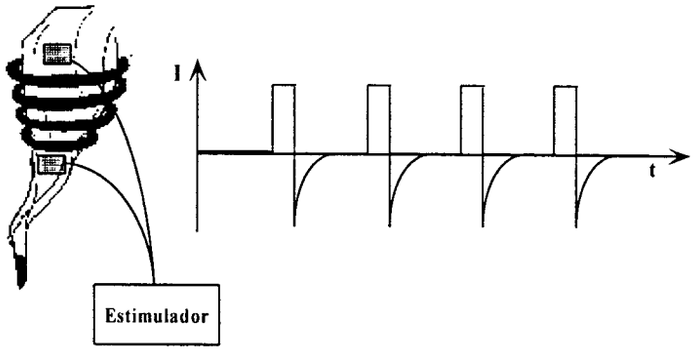


Figura III.4. Ilustração da perna do animal posicionada em uma bobina solenoidal cônica com a colocação dos eletrodos e representação esquemática da corrente bifásica.

Foram realizadas análise histológicas em alguns animais, com a contagem das células lesadas após o sacrifício do animal.

Capítulo IV

Resultados e Discussões

Neste capítulo serão apresentados os resultados, divididos em dois grupos. O primeiro grupo, refere-se às medidas realizadas em músculos de camundongos lesados através de exercício intenso. Testes preliminares realizados no laboratório indicavam significativas alterações nos espectros de ^{31}P nestes músculos. O segundo grupo refere-se às medidas realizadas em músculos de ratos estimulados eletricamente. É de grande importância ressaltar que, inicialmente, as medidas em músculos de camundongos necessitavam de uma promediação de 1000 aquisições, afim de obter uma razoável relação sinal/ruído. No entanto, a partir do aprimoramento na técnica, estas medidas foram realizadas com a promediação de apenas 20 aquisições.

Entretanto, anteriormente aos resultados serão apresentadas algumas medidas básicas iniciais.

IV.1.Medidas Básicas

A Figura IV.1 apresenta espectros típicos de ^{1}H e de ^{31}P obtidos em grande parte do músculo *soleus* de um camundongo, após um processo de promediação com 1000 aquisições.

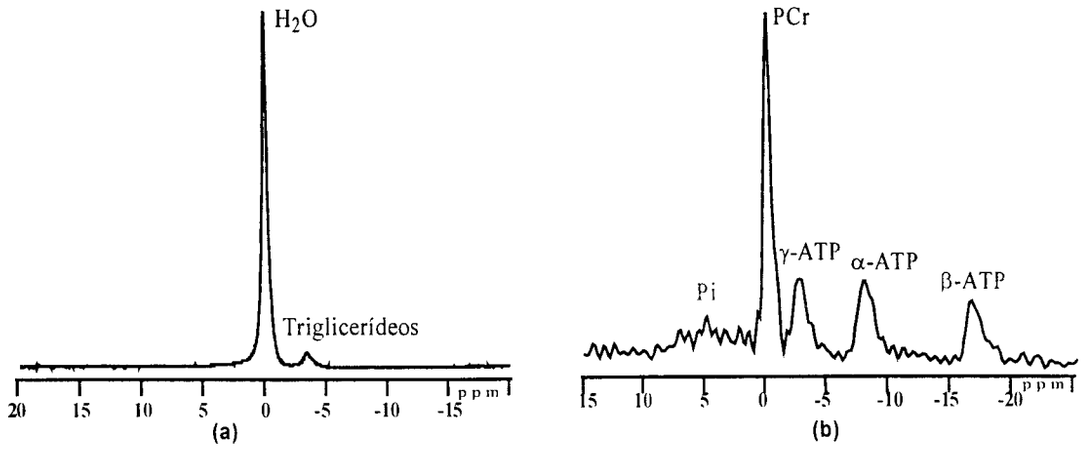


Figura IV.1. Espectros de músculo de camundongo em repouso, (a) de ^{1}H, ilustrando as linhas da H_2O e triglicerídeos, e (b) de ^{31}P, ilustrando as linhas do Pi, da PCr, e as três linhas do ATP.

IV.1.1. Medidas de T_1 e Fator de Saturação

As medidas de T_1 foram realizadas para os diferentes metabólitos fosforados. É importante ressaltar que existem vários trabalhos destinados à determinação destes valores de T_1 na literatura, vide Apêndice A. No entanto, os valores encontrados são muito discrepantes, o que justifica a necessidade de realizá-la novamente. Nestas medidas utilizou-se o método de inversão-recuperação. Devido ao limitado tempo para se fazer a medida, durante o qual o animal permanece sob o efeito do anestésico, otimizou-se o tempo de medida para fazer 40 médias, com o seguintes valores de tempos de espera (τ): 0.3s, 0.5s, 1s, 2s, 4s, 6s, 10s e 15s. Para esses valores não foi possível a recuperação total da magnetização z. Por exemplo, para a fosfocreatina, com $T_1 \approx 5$s, é necessário escolher um tempo de espera de no mínimo 25 segundos, para o retorno total de M_Z. Foram realizadas 3 medidas de T_1, as quais apresentavam valores bastante similares. A Figura IV.2 ilustra um dos conjuntos de espectros adquiridos para a medida de T_1, para os diferentes metabólitos fosforados.

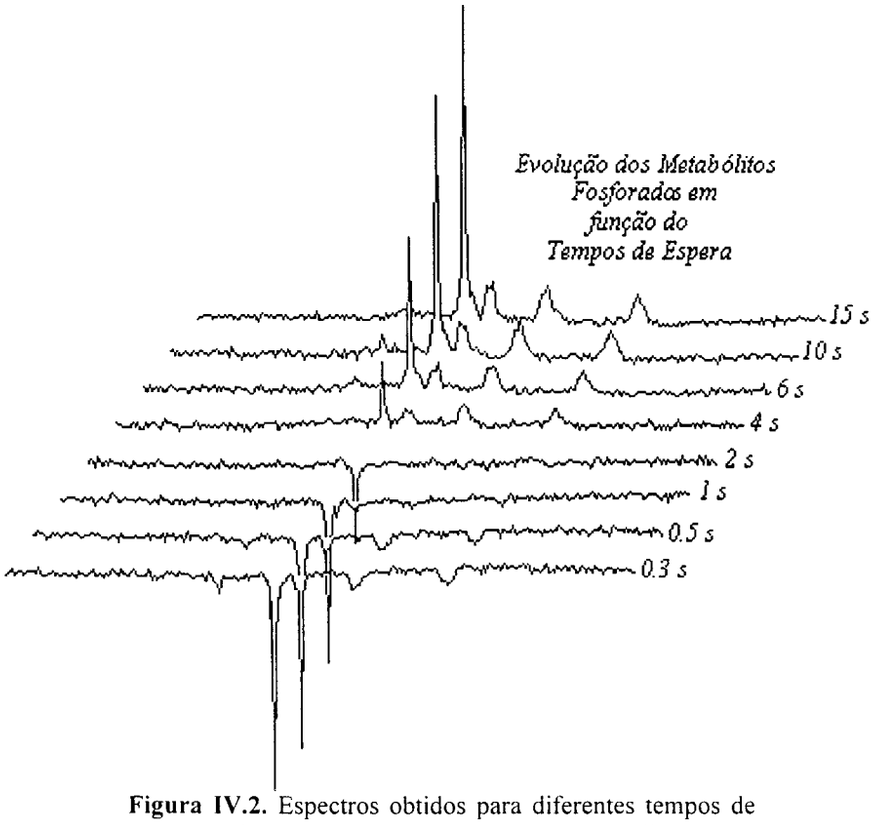


Figura IV.2. Espectros obtidos para diferentes tempos de espera, τ, durante o processo de medida de T_1, utilizando-se o método de inversão-recuperação.

A partir dos dados da Figura IV.2, obtém-se a evolução temporal da magnetização z para os diferente metabólitos fosforados, Figura IV.3.

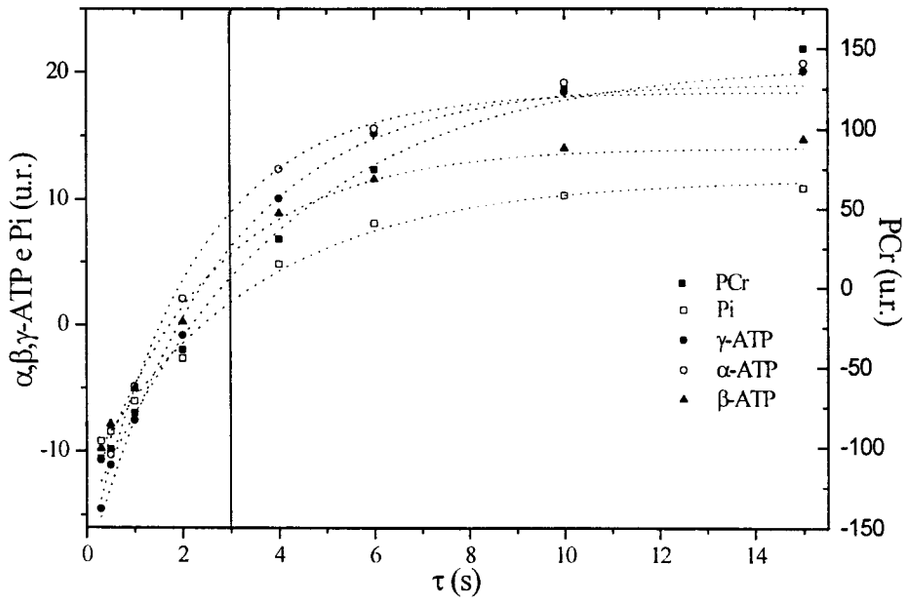


Figura IV.3. Evolução da magnetização longitudinal em função de τ.

A partir destes gráficos obtêve-se os valores de T_1 para cada uma das linhas espectrais. Conhecidos os valores de T_1 para cada metabólito fosforado, definiu-se tempo de repetição T_R do experimento, sendo possível realizar um número maior de médias sem introduzir um fator de saturação muito grande.

O tempo de repetição utilizado em todos os nossos experimentos foi T_R=3s. Os fatores de correção para estes metabólitos fosforados foram calculados à partir dos valores de T_1, obtidos experimentalmente, e pela expressão (19), levando em conta que $\theta = \pi/2$:

$$FS = \frac{M}{M_0} = 1 - \exp(-T_R / T_1)$$

Na tabela IV.I estão apresentados os valores de T_1 medidos experimentalmente, bem como o valor médio de T_1 ($\overline{T}_1$), provenientes da literatura (vide Apêndice A), o Fator de Saturação (FS), e deslocamento químico para cada um dos metabólitos fosforados.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

Tabela IV.I. Valor de T_1, determinado experimentalmente; médio obtido da literatura, $\overline{T}_1$; Fator de Saturação (FS) e deslocamento químico dos principais metabólitos fosforados observáveis *in vivo*.

	PCr	*Pi*	*ATP-α*	*ATP-β*	*ATP-γ*
$\overline{T}_1$ (s)	4,9 ± 1,3	4,040 ± 0,005	3,4 ± 0,6	2,9 ± 1.3	3,1 ± 1,5
T_1 (s)	5,3 ± 0,2	3,2 ± 0,4	3,0 ± 0,2	2,9 ± 0.2	3,3 ± 0,2
Fator de Saturação	0,43	0,61	0,63	0,64	0,6
Deslocamento Químico *(ppm)*	0	4,83	-7,62	-16,3	-2,57

IV.1.2.Determinação do pH Intracelular

Como descrito no Capítulo II, o pH intracelular pode ser determinado à partir da diferença dos deslocamentos químicos entre o PCr e o Pi (GADIAN D. et al., 1979; HOULT D.I. et al., 1974). A Figura IV.4 ilustra a região de uma seqüência de espectros, evidenciando as linhas da fosfocreatina (PCr) e do fósforo inorgânico (Pi). Nesta figura pode-se observar os desvios do deslocamento químico entre o Pi e a PCr. A partir deste desvio, e pela expressão (25), foram calculados os valores de pH, os quais estão mostrados na Figura IV.4.

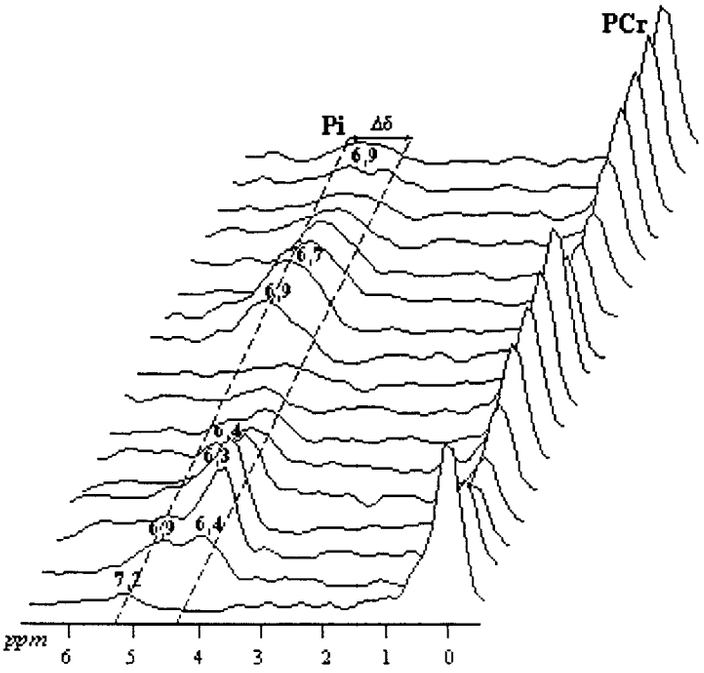


Figura IV.4. Seqüência de espectros evidenciando o desvio do deslocamento químico entre a PCr e o Pi, e valores de pH.

IV.2. Estudo de músculos esqueléticos de camundongos com lesão muscular provocada por exercício físico intenso

Lesões agudas ocorrem em músculos esqueléticos de camundongos após intenso exercício físico. Estas lesões são comumente avaliadas em função do estudo histológico do número de fibras lesadas, Figura IV.5. Para acompanhar a recuperação do músculo após a indução da lesão, a contagem de fibras lesadas é feita ao longo do tempo, Tabela IV.II, onde pode-se observar que existe uma maior incidência de fibras lesadas em torno do 3º e 5º dias após o exercício intenso. Conjuntamente, foram realizadas medidas de RMN para avaliar a evolução os metabólitos fosforados nestes dias. A análise histológica foi realizada imediatamente após a obtenção dos espectros de RMN *in vivo*.

Tabela IV.II: Contagem de fibras lesadas no músculo *soleus* de camundongos controle e de camundongos exercitados após 0,5, 3º, 5º, 8º e 15º dias

Animais	Grupos	Número total de fibras	Número total de fibras lesadas	% de fibras lesadas	% ± desvio padrão
1		600	0	0,0	
2	controle	646	2	0,3	0,2±0.2
3		643	2	0,3	
4		634	34	5,3	
5	0.5 dia	589	53	8,9	6±2
6		575	27	4,6	
7		652	125	19.1	
8	3º dia	534	106	19.8	19±1
9		738	137	18.5	
10		676	43	6,3	
11	5º dia	564	64	11.3	10±3
12		642	77	11.9	
13		710	38	5.3	
14	8º dia	778	29	3.7	4±1
15		803	24	2.9	
16		636	15	2,3	
17	15º dia	562	23	4,0	3±1
18		640	14	2.1	

A motivação deste trabalho surgiu após um estudo prévio [SALVINI T.F., et al., 1996] que indicava a existência de uma substancial alteração nos espectros de ^{31}P

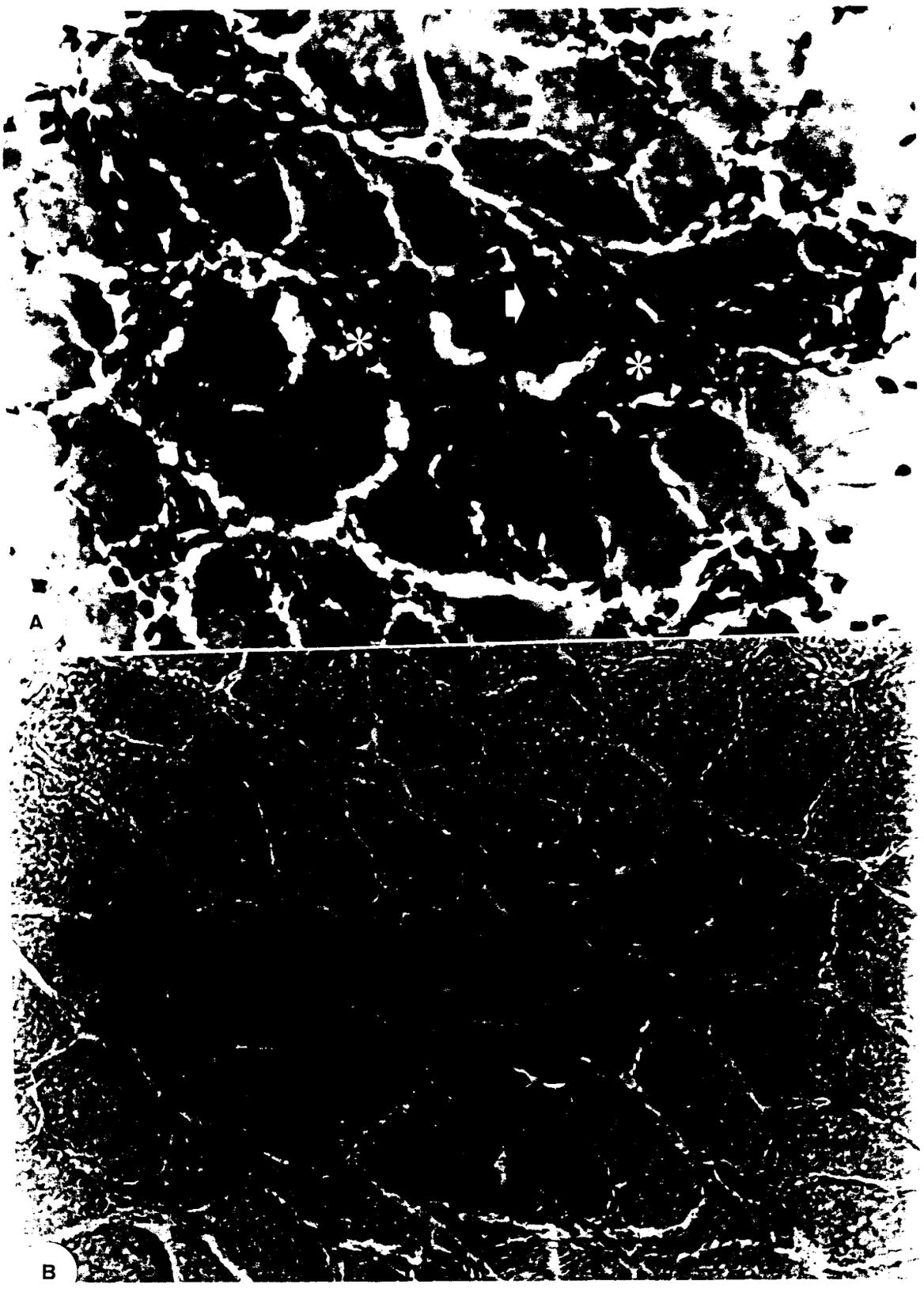


Figura IV.5. Ilustração de uma secção transversal do músculo *soleus* de um camundongo (A) Coloração azul de toluidina e (B) Reação fosfatase ácida. ★ fibra normal. ➧basofilia difusa, em processo de regeneração ✳ infiltração celular.

in vivo, Figura IV.6(a), principalmente nas linhas referentes à fosfocreatina e ao fósforo inorgânico, as quais apresentavam grande correlação com estudos histológicos, ou contagem de fibras lesadas, Figura IV.7.

No entanto, este trabalho não apresentava um conteúdo estatístico satisfatório, visto que foram medidos apenas um camundongo por grupo. Para confirmar estes resultados, iniciou-se uma segunda série de medidas, contendo em torno de 5 a 8 animais por grupo e, além disso, efetuou-se uma melhora sensível na qualidade e reprodutibilidade das medidas por RMN. Os resultados obtidos nesta nova etapa de medidas estão apresentados na Figura IV.6(b). Os novos resultados indicaram que não existem alterações nas concentrações dos metabólitos fosforados em função do número de dias após a realização do exercício intenso, Figura IV.7.

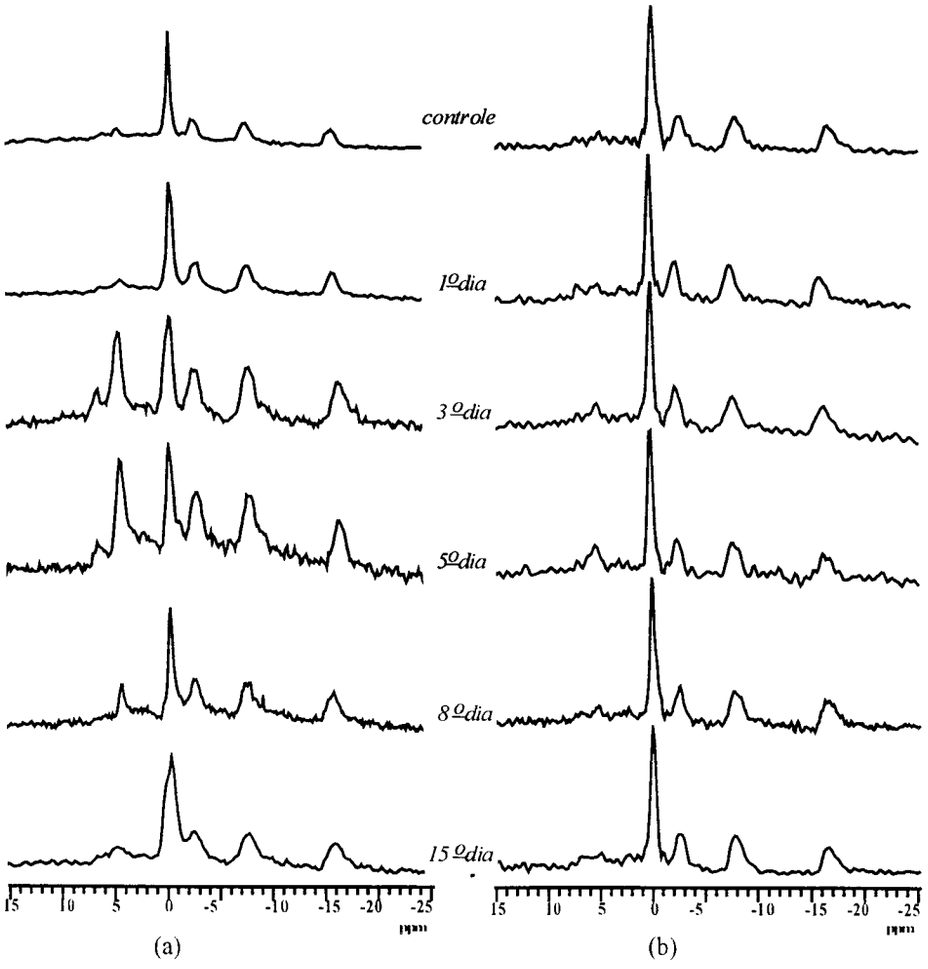


Figura IV.6. (a) Medidas anteriores (SALVINI T.S., et al, 1996) e (b) novas medidas de músculo de camundongos, lesados através de exercício intenso.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA

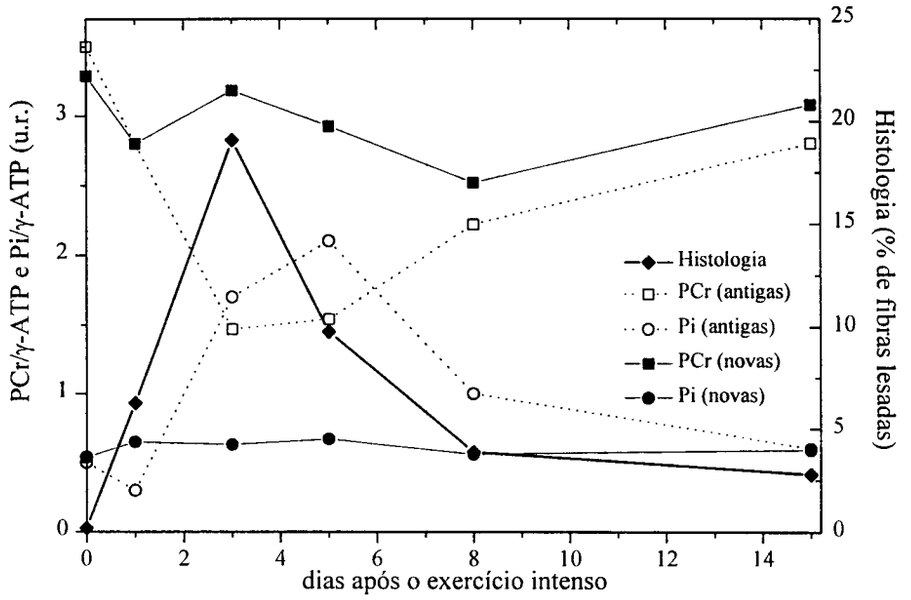


Figura IV.7. Pi /γ-ATP e PC/γ-ATP, medidas novas e antigas em unidades relativas e histologia, porcentagem de fibras lesadas em relação a contagem total.

Como pode-se observar na Figura IV.7, a correlação das medidas anteriores com a histologia, não passou de uma coincidência. Já que as novas medidas, com um conteúdo estatístico satisfatório, 5 a 8 animais por grupo, confirmaram a não existência desta correlação.

Além da lesão por exercício intenso, foi analisado por RMN uma lesão causada pela aplicação da miotoxina ACL. A Figura IV.8(a) ilustra um espectro do músculo lesado (pela miotoxina), que apresenta um padrão de lesão similar ao da

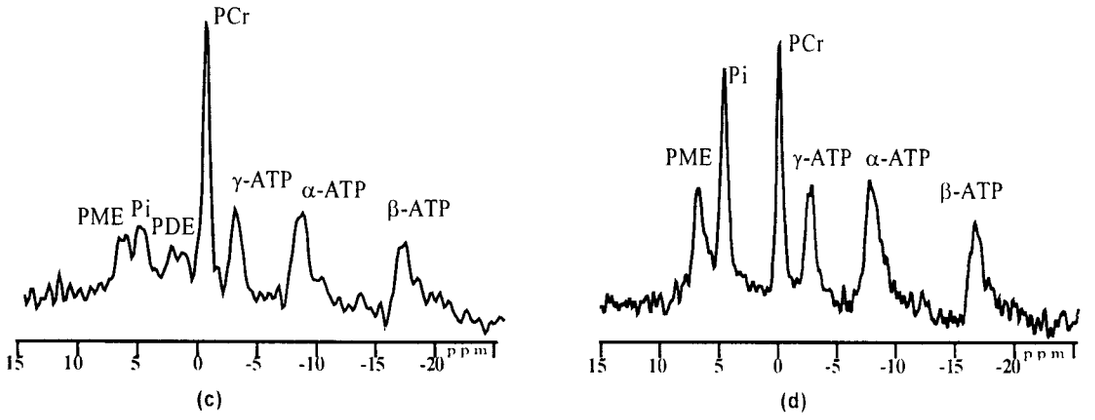


Figura IV.8. Espectros de camundongo, (a) músculo lesado induzido por veneno de cobra (ACL) (b) músculo de um animal imediatamente após a morte.

Figura IV.5. Pode-se observar, além das linhas normais, o aparecimento das linhas relativas aos metabólitos: fosfomonoester (PME) e fosfodiester (PDE), associados com o estado de necrose, de várias fibras deste músculo. A Figura IV.8(b) ilustra o espectro de ^{31}P, de um animal morto, onde o estágio de morte é evidenciado pelo aumento do Pi, aparecimento do PME, e diminuição das linha do ATP e PCr, durante o processo de promediação.

III.3.Estudo de músculos de ratos estimulados eletricamente

III.3.1.Introdução

Neste experimento utilizou-se o procedimento de estimulação elétrica conforme descrito no capítulo III.

A Figura IV.9 ilustra uma seqüência de espectros, obtidos com 20 médias e T_R=3 segundos, portanto em um intervalo de aquisição de 1 minuto. O primeiro espectro refere-se a medida no repouso e os três seguintes são medidas durante a estimulação, onde podemos observar um aumento da intensidade da linha referente ao Pi. Nos 5 minutos seguintes, na ausência de estímulo elétrico, observamos a recuperação da intensidade da linha da PCr e uma diminuição da intensidade da linha Pi. Na segunda etapa de estimulação elétrica observou-se novamente um aumento da intensidade do Pi, porém, com uma variação de menor magnitude. Durante a segunda recuperação, a intensidade do Pi volta a diminuir e a da PCr é novamente ressintetizada. Este padrão observado, foi semelhante para quase todos os animais analisados.

Ainda na Figura IV.9, observa-se que, durante o primeiro minuto de estimulo, ocorre uma variação relativa entre os deslocamentos químico do Pi e da PCr, com uma leve separação entre dois picos. A Figura IV.4 (página 48), ilustra a mesma seqüência de espectros, porém ampliada na região de interesse, onde pode-se observar uma diminuição no valor do pH logo nos minutos iniciais de estimulação, seguido de uma rápida recuperação, mantendo-se praticamente constante durante a segunda estimulação.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

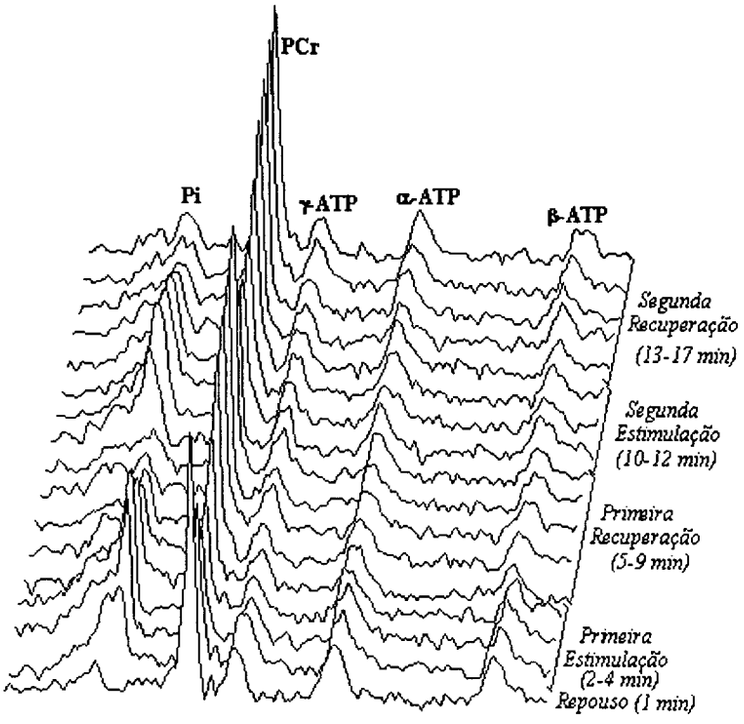


Figura IV.9. Seqüência de espectros, onde podemos observar a cinética dos metabólitos fosforados Pi e PCr durante o repouso, estimulação e recuperação.

A seguir serão ilustrados algumas seqüências típicas de espectros, para os diferentes grupos analisados, utilizando-se o mesmo padrão de estimulação discutido anteriormente. As Figuras IV.10 (a) e (b), ilustram seqüências de espectros de dois animais do *Grupo Controle*, nas quais observam-se diferentes respostas de estimulação entre estes animais. Na Figura IV.10(b) observa-se uma maior intensidade do Pi, do que em IV.10(a). Esta mesma figura ilustra seqüências de espectros de um animal do *Grupo* (c) *ACL* e (d) *Castrado*. Na Figura IV.11 estão mostradas as seqüências de espectros dos grupos: (a) *Hipertireóideo Castrado,* (b) *Hipertireóideo,* (c) *Hipotireóideo Castrado* e (d) *Hipotireóideo.*

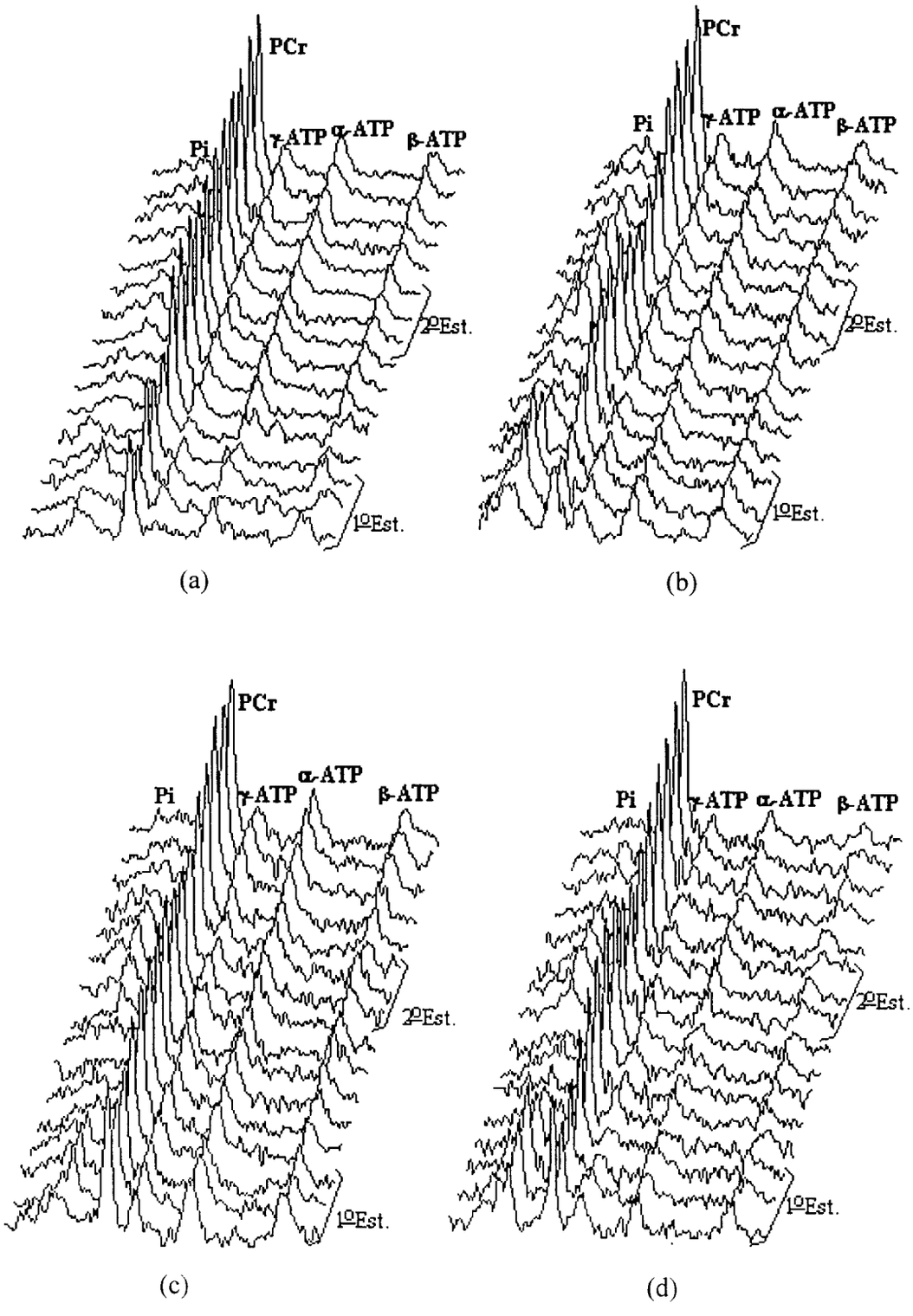


Figura IV.10. Seqüência de espectros, onde pode-se observar a cinética dos metabólitos fosforados Pi e PCr durante estimulação e recuperação (a) e (b) são animais controles, (c) animal com lesão muscular (ACL) e (d) castrado.

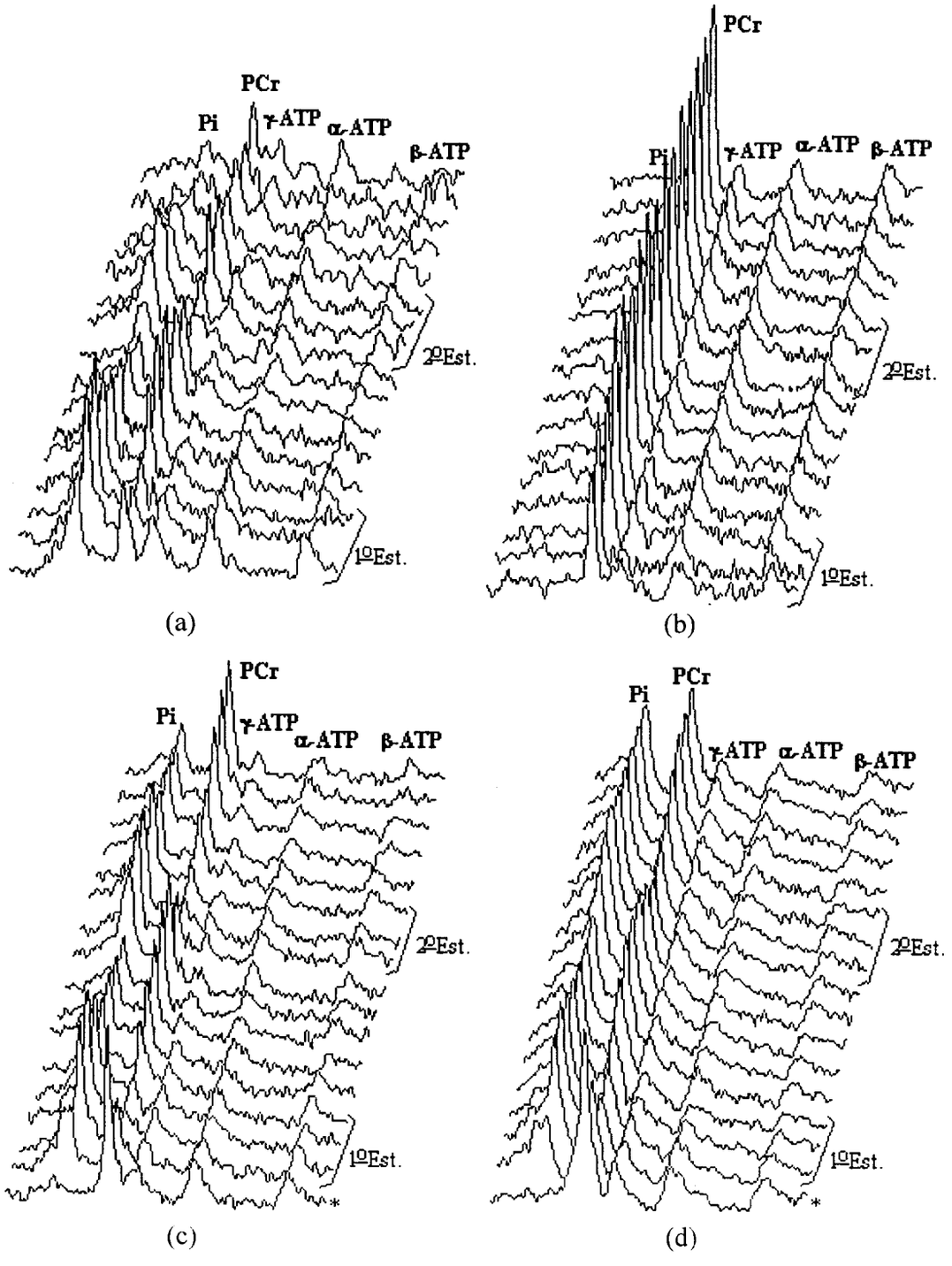


Figura IV.11. Seqüência de espectros, onde pode-se observar a cinética dos metabólitos fosforados Pi e PCr durante repouso (*), estimulação e recuperação (a) animal hipertireóideo castrado (b) hipertireóideo (c) hipotireóideo castrado e (d) hipotireóideo.

Para uma melhor visualização dos resultados, da cinética do Pi e da PCr, optou-se por representar as intensidades das linhas em forma de gráficos de barras. Estas intensidades foram obtidas através do cálculo da área de cada espectro das sequências medidas, ajustando-se curvas lorentzianas. Estas áreas foram corrigidas com o fator de saturação, e estão representadas em unidades arbitrárias (u.a). Devido às dificuldades experimentais, associados com a baixa relação sinal/ruído dos espectros, estima-se um erro de aproximadamente 15 % para estas medidas, sendo menor nos períodos de estimulação quando a linha do Pi é bastante evidenciada. Na Figura IV.12 ilustra-se as intensidade relativa do Pi e da PCr na musculatura do animal no repouso (1), durante os dois períodos de estimulação (2-4 e 10-12 minutos) e recuperação (5-9 e 13-17 minutos).

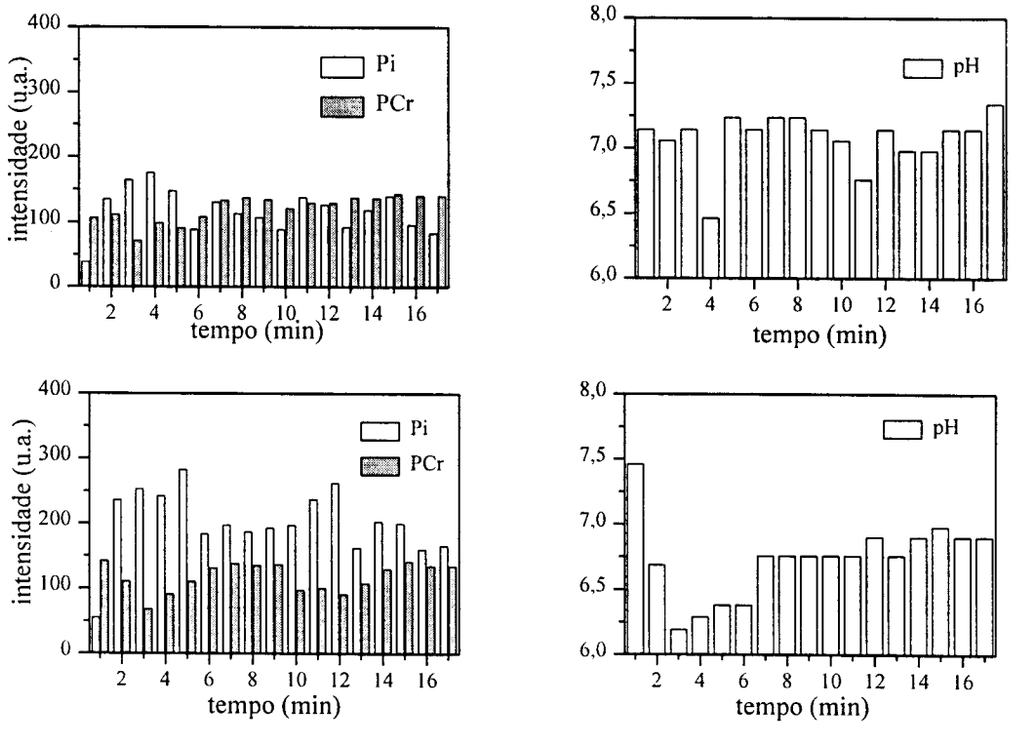


Figura IV.12. Gráficos de intensidade de Pi e PCr e pH de dois animais do *Grupo Controle*, durante o repouso (1 min) estimulação (2-4 e10-12 min.) e recuperação (5-9 e 13-17 min.). Acima *Controle 1* e abaixo *Controle 2*

Estes gráficos, Figura IV.12, apresentam diferenças de intensidades, mas mantêm o mesmo padrão (aumento e diminuição dos metabólitos Pi e PCr). Este padrão observado, tem uma boa correlação com o comportamento a fisiologia muscular.

Os gráficos à direita referem-se ao cálculo do pH, outra variável importante para a análise fisiológica muscular. Observa-se um padrão característico para o pH em todos os grupo analisados, apresentando uma queda brusca do valor do pH durante a primeira estimulação, seguindo de uma recuperação parcial e em geral não alterando-se durante a segunda estimulação.

IV.3.2.Análise dos Grupos Experimentais

Para os diferentes grupos de animais analisados, os resultados estão ilustrados na forma de gráficos de barras, da intensidade (Pi e PCr) e pH, nas figuras que se seguem. A Figura IV.13 refere-se as sequências de espectros medidos do *Grupo ACL*, a Figura IV.14 ao *Grupo Castrado*, a Figura IV.15 ao *Grupo Hipotireóideo*, a Figura IV.16 ao *Grupo Hipotireóideo Castrado*, a Figura IV.17 ao *Grupo Hipertireóideo Castrado* e a Figura IV.18 refere-se ao *Grupo Hipertireóideo*.

Os padrões observados nas medidas referentes ao *Grupo ACL*, Figura IV.13, são bastante semelhantes entre si e em relação ao *Grupo Controle*, porém com menor variação dos níveis de PCr e Pi. Isto ocorre, provavelmente, porque para um músculo lesado, menos fibras contraem-se durante a estimulação.

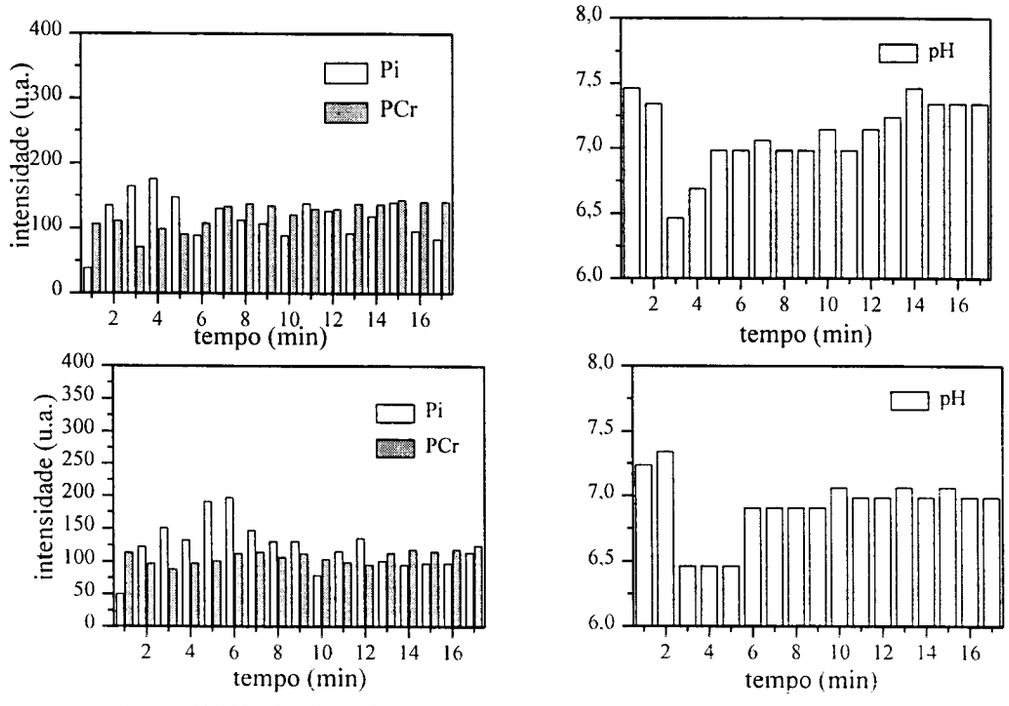


Figura IV.13. Gráficos de intensidade e pH de dois animais do *Grupo ACL*. Acima *ACL 1* e abaixo *ACL 2*

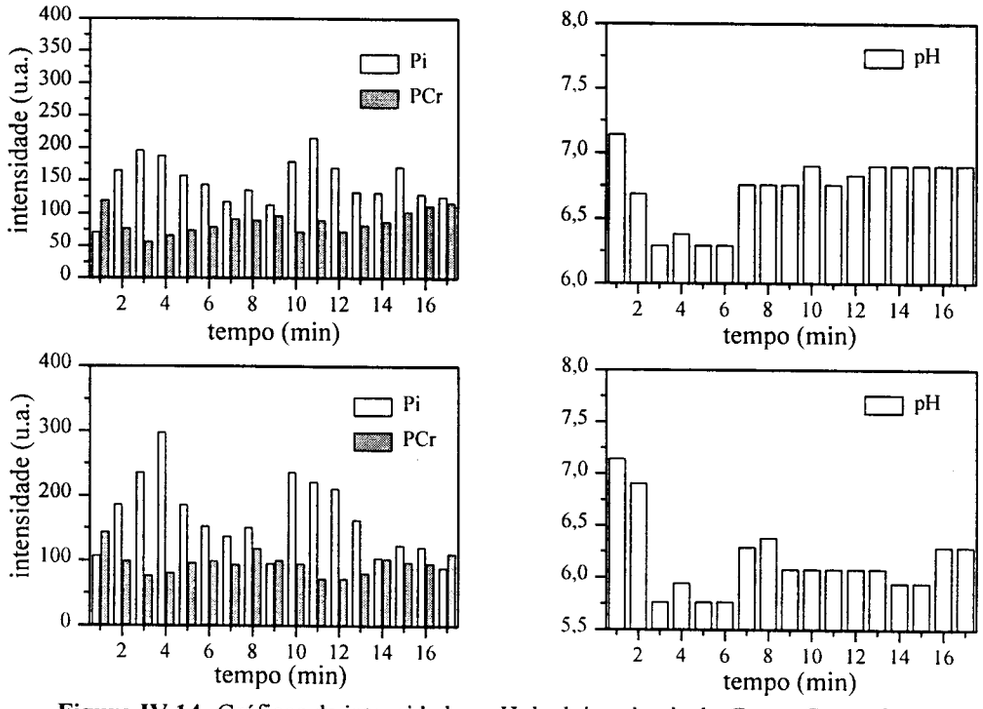


Figura IV.14. Gráficos de intensidade e pH de dois animais do *Grupo Castrado.* Acima *Castrado 1* e abaixo *Castrado 2*

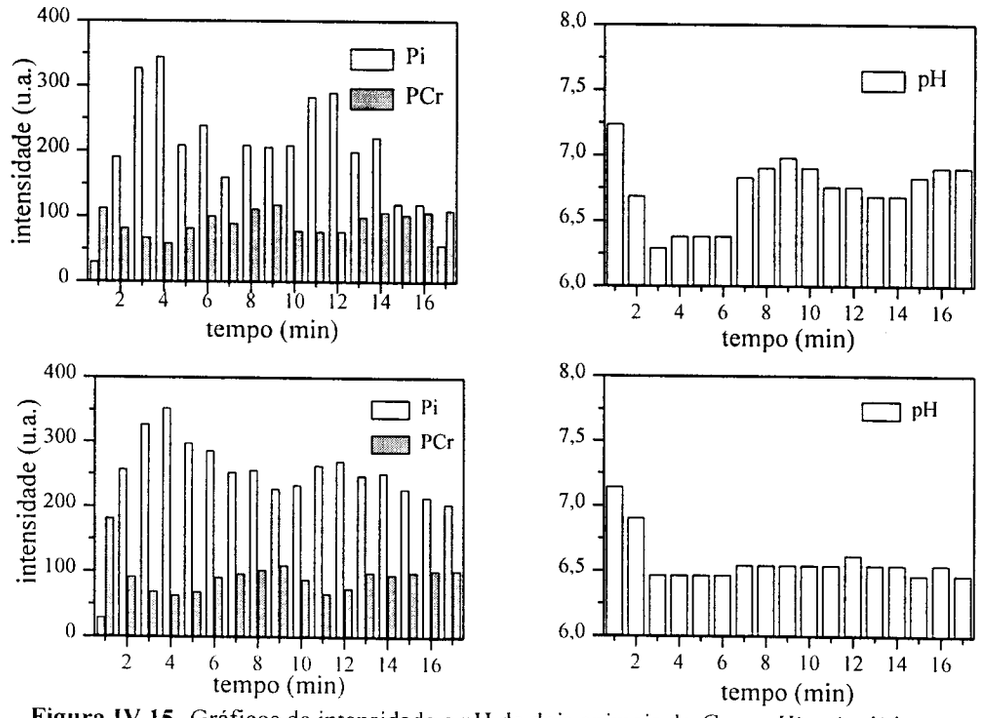


Figura IV.15. Gráficos de intensidade e pH de dois animais do *Grupo Hipotireóideo.* Acima *Hipo 1* e abaixo *Hipo 2.*

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

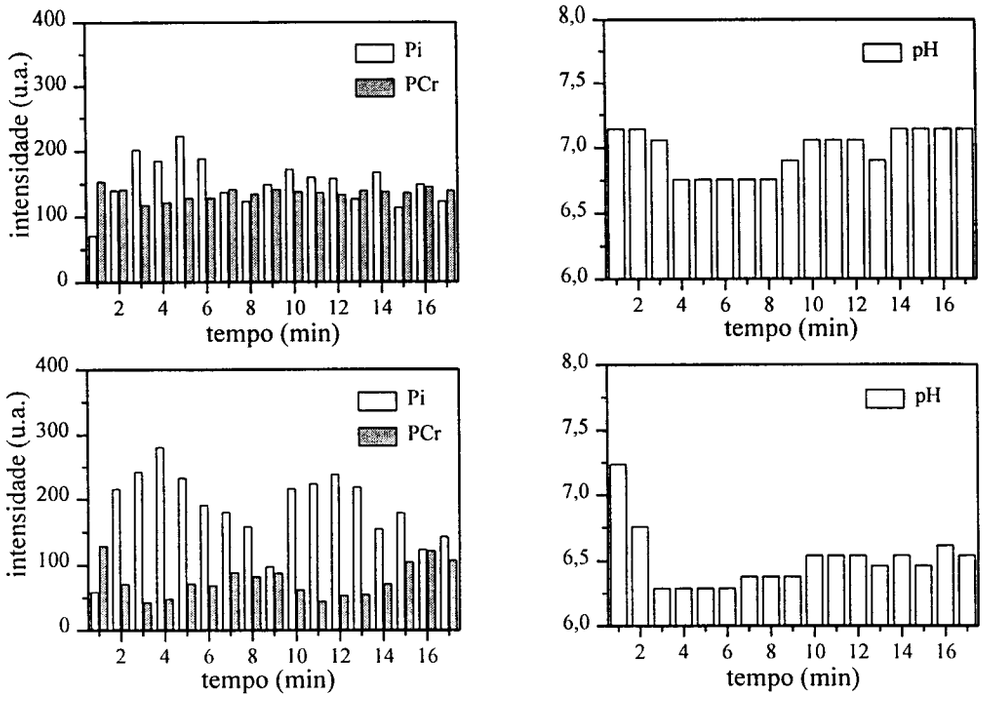


Figura IV.16. Gráficos de intensidade e pH de dois animais do *Grupo Hipotireóideo Castrado.* Acima *Hipo Castrado 1* e abaixo *Hipo Castrado 2*

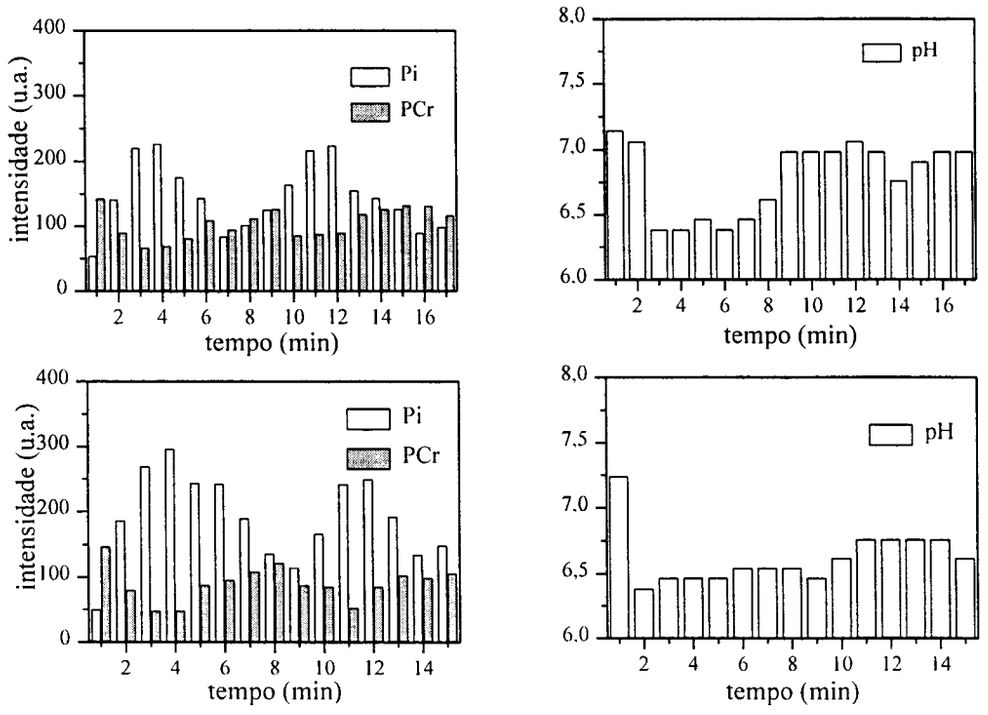


Figura IV.17. Gráficos de intensidade e pH de dois animais do *Grupo Hipertireóideo.* Acima *Hiper Castrado 1* e abaixo *Hiper Castrado 2.*

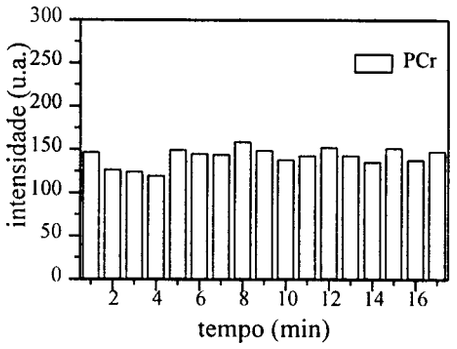


Figura IV.18. Gráfico de intensidade relativa de PCr, durante a estimulação e repouso para um animal *Hipertireóideo.*

Observa-se uma semelhança no padrão de resposta entre os *Grupos: Controle, Castrado, Hipotireóideo, Hiporiteóideo Castrado e Hipertireóideo Castrado.* Já para os animais *Hipertireóideos* não observou-se qualquer intensidade do Pi durante as estimulações. Provavelmente, a ação dos hormônios esteróides ovarianos e tireoídeanos estão exercendo uma função no metabolismo muscular destes animais.

Através do protocolo *estimulação-recuperação* pode-se inferir sobre a energética muscular do ^{31}P, através da comparação entre o *Grupo Controle* e os grupos com alterações metabólicas via hormônios tireoidianos, esteróides ovarianos, e castração. Observamos que a castração não modifica o metabolismo dos animais hipotireóideos e controles. Já no caso dos animais hipertireóideos a castração provavelmente alterou o metabolismo destes animais. Para os animais do *Grupo ACL,* como esperado pouca musculatura foi estimulada, devido ao estado de lesão muscular em que estes animais se encontravam.

Uma discussão mais detalhada e conclusiva da fisiolgia destes grupos não foi realizada, pois a colocação dos eletrodos não permitiu excitar todo grupo muscular, o que pode ser realizado através de uma estimulação via nervo.

Conclusões e perspectivas

O objetivo principal deste trabalho foi a implementação da técnica de Espectroscopia *in vivo*, a qual estava muito mais associada aos problemas de adaptação do espectrômetro já existêntes no grupo, bem como à metodologia de RMN empregada. Durante esta fase de implementação da técnica de espectroscopia *in vivo* no grupo de RMN do IFSC-USP, ocorreu uma grande evolução no conhecimento dos problemas teóricos e técnicos encontrados durante a realização destes difíceis experimentos. Todas as adaptações realizadas no espectrômetro foram vitais para a grande melhora na resolução, sensibilidade e reprodutibilidade dos espectros de ^{31}P atualmente obtidos.

Esta etapa de implementação da técnica de espectroscopia *in vivo* faz parte de um projeto de maior abrangência dentro do grupo de RMN, que envolve o trabalho de outros pesquisadores, os quais estão desenvolvendo métodos de excitação seletiva de volumes, mais adequados para a análise de regiões específicas de pequenos animais ou humanos. Deste modo, a próxima fase de desenvolvimento da Espectroscopia *in vivo* contará com a união de todas estas linhas de pesquisa, transformando este projeto em fase embrionária em uma linha de pesquisa definida dentro do grupo.

Logicamente, algumas destas técnicas já se encontram à disposição ou podem ser implementadas em equipamentos de Ressonância Magnética para imagens e espectroscopia instalados em hospitais de primeira qualidade no Brasil, fato que permitirá colaborações muito frutíferas nesta área de pesquisa multidisciplinar.

Apêndice

Na tabela a seguir, estão citados os valores dos tempos de relaxação longitudinal encontrados na literatura, para os metabólitos fosforados.

Referência	*PCr*	*Pi*	*ATP-α*	*ATP-β*	*ATP-γ*	*Origem*	*Campo Magnético(T)*
BROOKS W.M. et al.(1986)	5100		2700	2700	2700	músculo de rato	4.7
THOMSER C.; JENSEN K.E.; HENRIKSEN O. (1989)	5517	4017	3603	4310	4755	músculo humano	1.5
YABE T. et al. (1995)				1700		miocárdio humano	1.5
van DOBBERBURGH J.O.; LEKKERKERK C.; van ECHTELD C.J.A.(1994)	6820			3390		músculo da parede do pulmao	1.5
MENON R.S. et al.(1992)	5300				2700	miocárdio humano	4.0
SAKUMA H. et al.(1993)	3980			1860		miocárdio humano	1.5
SAKUMA H. et al.(1993)	3810			1880		músculo esqu.	1.5
LUYTEN P.R. et al.(1989)	6870			4050		miocárdio humano	1.5
ROTH K. et al.(1989)	6600			3000		–	1.5
BUCHTHAL S.D. et al (1989)	6500			4100		fígado humano	1.5
YONGBI N.M. et al.(1992)	6500			4100		–	1.5
OKADA M. et al (1992)	4200			1700		miocárdio humano	1.5
NEUBAUER S.et al. (1992)	6100			5800	5400	miocárdio humano	1.5
van DOBBERBURGH J.O.; LEKKERKERK C.; van ECHTELD C.J.A.(1994)	4100			2700		miocárdio humano	1.5
SAKUMA H. et al.(1993)	4000			1900		miocárdio humano	1.5
Den HOLLANDER J.A. et al.(1993)	4400			2700	2600	miocárdio humano	1.5
OUWERDED R.; BOTTOMLEY P.A.	4200			2500	2200	miocardio humano	2.0
RATH D.P.; ABDULJALIL A. M.; ROSBITAILLE M. L.	4000					miocárdio de cão	4.7
KANTOR H.L. et al (1986)	4400					miocardio de cão	1.9
VESTERGAARD-POULSEN P. et al.(1994)	5550					miocárdio humano	1.5
BUCHLI R.; BOESIGER P.(1993)	5140	4000				músculo humano	1.5
MATHEWS P.M. et al.(1991)	2400				1500	miocárdio isolado de rato	4.2
BITTL J.A.; INGWALL J.S. (1985)	2000				700	miocárdio isolado de rato	8.4
NUNALLY R.L.; HOLLIS D.P.(1979)	1800				1200	miocárdio isolado de coelho	4.2
PERRY S.B. et al.(1988)	2100					miocardio de coellho	8.4
NEUBAUER S. et al.(1988)	2700					miocardio	8.4
BITTL J.A.; BALSCHI J.A.; INGWALL J.S (1987)	2900					miocardio de rato	8.4
KANTOR H.L. et al.(1986)	4400		1700		1800	miocardio de sapo	1.9
MARTIN J.F. et al.(1986)	4800		3100		3000	miocardio de cão	4.7
MARTIN J.F. et al.(1986)	6300				2200	miocardio de cão	2.0
KANTOR H.L. et al.(1986)	4400			1600	1800	miocardio de cão	1.9
MARTIN J.F. et al.(1989)	4800			2600	3000	miocardio de porco	4.7
MARTIN J.F. et al.(1989)	6300			2200	2200	miocardio de porco	2.0
MENON R.S. et al.(1992)	5300				2700	miocárdio humano	4.0
SAKUMA H. et al.(1992)	4000			1800		miocardio humano	1.5
NEUBAUER S. et al.(1992)	6100			5800	5400	miocárdio humano	1.5

Referências

ABRAGAM A., *Principles of Nuclear Magnetic*, England, Oxford University Press *(1986)*

ACKERMAN J.H.; GROOVE T.H.; WONG G.;GADIAN D.G.; RADDA G.K. Mapping of metabolites in whole animals by ^{31}P NMR using surface coil. *Nature 283, 167-170 (1980)*

ARGOV Z.; BANK W.J.; MARRIS J.; PETERSON P.; CHANCE B. Bioenergetic heterogeneity of human mitochondrial myopathies: Phosphorus magnetic resonance spectroscopy study. *Neurology 37, 257-262 (1987)*

ARGOV Z.; RENSHAW P.F.; BODEN B. WINOKUR A.; BANK J. Effects of thyroid hormones on skeletal muscle bioenergetics: In vivo phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy study of human an rats. *J. Clin. Invest. 81, 1695-1701 (1988)*

ARNOLD D.L.; BORE P.J.; RADDA G.K.; STYLES P.; TAYLOR D.J. Excessive intracellular acidosis of skeletal muscle on exercise in a patiente with a post-viral exhaustion/fatigue sindrome. *Lancet 23, 1367-1369 (1984a).*

ARNOLD L.D.; MATTHEWS P.M.; RADDA G.K. Metabolic Recovery after Exercise and the Assessment of Mitochondrial Function in Vivo in Human Skeletal Muscle by Means of ^{31}P NMR. *Magn Reson Med 1, 307-315 (1984b)*

ARNOLD J.T.; DHARMATTI S.S.; PACKARD M.E. *J Chem Phys, 19, 507 (1991)*

BITTL J.A.; INGWALL J.S.*J. Biol. Chem. 260(6), 3521 (1985)*

BITTL J.A.; BALSCHI J.A.; INGWALL J.S.*J. Clin Invest. 79, 1852 (1987)*

BLOCH F.; HANSEN W.W.; PACKARD H.E. Nuclear Induction. *Phys. Rev. 69, 127 (1946)*

BONAGAMBA, Tito José, *Selecão de Planos em Tomografia por Ressonância Magnética*, dissertação de mestrado, DFCM-IFQSC-USP, *1986.*

BONAGAMBA, Tito José, *Espectroscopia de Alta Resolução em Sólidos por Ressonância Magnética Nuclear*, tese de doutorado, DFCM-IFQSC-USP, 1991.

BOTTOMLEY P.A.; HART H.R.; EDELSTEIN W.A. SCHENCK J.F.; SMITH L.S.; LEUE W.M.; MUELLER O.M.; REDINGTON R.W. NMR Imaging/Spectroscopy System to Study Both Anatomy and Metabolism. *Lancet ii, 273 (1983)*

BOTTMOLEY P.A.; MATHEWS P.M.; RADDA G. Metabolic recovery after exercise and the assessment of mitochondrial function in vivo in human skeletal muscle by means of ^{31}P NMR. *Magn Reson Med 1, 307-315 (1984)*

BOTTOMLEY P.A.; HARDY C.J.; WEISS R.G. Correcting human heart ^{31}P NMR spectra for partial saturation: evidence thar saturation factors for PCr/ATP are homogeneous in normal and disease states. *J Magn Reson 95:341-355 (1991)*

BOTTMOLEY P.A. The true T_1 values of myocardial high-energy phosphates. *Mag Reson Med. 29, 145-146 (1993)*

BOTTOMLEY P.A. MR Spectrosocopy of the Human Heart: The Status and the Challenges. *Radiology: 191: 593-612 (1994)*

IFSC USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

BROOKS W.M.; FIELD J.; IRVING M.G.; DODDRELL D.M. *In vivo* Determination of ^{31}P Spin Relaxation Times (T_1, T_2, $T_{1\rho}$) in Rat Leg Muscle Use of and off-axis Solenoid Coil. *Magn Reson Imag vol 4, 245-250 (1986).*

BUCHTHAL S.D.; THOMA W.J.; TAYLOR J.S.; NELSON S.J.; BROWN T.R. In vivo T_1 valours of phosphorus metabolites in human liver and muscle determined at 1.4 T by chemical shift imaging. *NMR Biomed. 2, 298-304 (1989)*

BURT C.T.; GLONECK T.; BAVANY M. Analysis of phosphates metabolites the intracelular pH and the states of adenosine triphosphate in intact muscle by nuclear mag. Resonance. *J. Biol Chem 251, 2584-2591* (1976).

BUCHLI R.; BOESIGER P. Comparasion of Methodos for the determination of absolute metabolite concentration in human muscle by ^{31}P *MRS. Mag Reson Med 30 (5), 552-8 Nov (1993)*

CADY E.B; COSTELLO A.M.; DAWSON J.M.; DELPY J.M.; HOPE D.T.; REYNOLDS E.O.; TOLFTS P.S.; WILKIE D.R. Non-invasive investigation of cerebral metabolism in newborn infants by phosphorus nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Lancet 8333, 1059 (1983)*

CHANCE B.; ELEFF S.; LEIGH JS.; SOKOLOW D.P.; SAPEGA A.A. Mitochondrial regulation of phosphoceratine/inorganic phosphate ratios in exercising humam muscle: A gated ^{31}P NMR study. *Proc. Natl. Acad.Sci. U.S.A. 78,6714-6718 (1981)*

CHANCE B.; LEIGH J.S.; SMITH D.; NIOKA S.; CLARK B.J. Phosphorus magnetic resonsnce spectroscopy of the role of mitochondrial in tehe disease process. *Amn. N.Y. Acad. Sci. 488, 140-153 (1986)*

CONSTABLE S.H.; FAVIER R.J.; MCLANE J.A.; FELL R.D.; CHEN M.; HOLLOSZY J.O. Energy metabolism in contracting rat skeletal muscle;: adaptation to exercise training. *Am J Physiol 253: C316-C322,* (1987)

DAWSON M.J.; GADIAN D.G.; WILKIE D.R. Contraction and recovery of living muscle studied by ^{31}P nuclear magnetic resonance. *J. Physiol 267, 703-735 (1977)*

Den HOLLANDER J.A.; EVANOCHKO W.T.; DELL'ITALIA L.; POHOST G.M. ^{31}P NMR T_1 inversion recovery measurements of human heart (abstr). In: Proceedings of the Society of Magnetic Resonance in Medicine. *Berkeley, Calif: Socity of Magnetic Resonance in Medicine, 1098 (1993)*

FOSTER, Bernd. *Técnicas de Aquisição rápida em Tomografia por Ressonância Magnética Nuclear*, dissertação de mestrado, DFCM-IFQSC-USP, 1994.

FOSTER M.A.*Magnetic Resonance in Medicine and Biology*. Pergamon Press. (1984)

FREITAS, Jair Checon, *Espectroscopia de Alta Resolução por Ressonância Magnética Multinuclear Aplicada no Estudo de Zeólitas*, dissertação de mestrado, DFCM-IFQSC-USP, 1994.

FUKUSHIMA E.; ROEDER S.B.W. *Experimental Pulse NMR: a nuts and bolts approach*, USA, Addison-Wesley (1981)

GADIAN D.G., RADDA G.K.; RICHARDS R.E.; SEELEY P.J. In Biological Applications of Magnetic Resonance, (R. G. Shulman, *ed.), Academic Press, New York, pp. 463-533* (1979)

GADIAN D. G. *Nuclear magnetic resonance and its applications to living systems.* Oxford University Press - New York (1982)

GARLICK P.B.; RADDA G.K.; SEELY P.J.(1979). *Biochem. J. 184, 487.*

GIL V.M.S.; GERALDES C.F.G.C. *Ressonância Magnética Nuclear: Fundamentos, Métodos e Aplicações.* Portugal, Fundação Calouste Gulbenkian, 1987.

GILLIES R.J. *NMR in Physiology and Biomedicine.* Academic Press (1994)

GORDON R.E.; HANLEY P.E.; SHAW D.; GADIAN D.G.; RADDA G.K.; STYLES P.; BORE P.L.; CHAN L. *Nature (Lond.) 287, 3987 (1980)*

HAGSPIEL K.D.; von WEYMARN C.; McKINNON g.; HALDEMANN R.; MARINCEK B.; von SCHULTHESS G.K. Effect of hypothyroidism on phosphorus metabolism in muscle and liver: in vivo P-31 MR spectroscopy study. *J. Magn Reson Imaging 2(5):527-32 (1992)*

Haeberlen, High Resolution NMR in Solids, USA, Academic Press, Inc *1976.*

HAUSSER H.K.; KALBITZER H.R. *NMR in Medicine and Biology.*Structure Determination, *Tomography, In Vivo Spectroscopy.* Springer-Verlag

HOULT D.I.; BUSBY S.J.W., GADIAN D.G.; RADDA G.K.; RICHARDS R.E. SEELEY P.J. Observation of tissue metabolites using ^{31}P nuclear magnetic resonance. *Nature 252, 22 (1974)*

JOHNSON E.K.; OWNBY C.L. Isolation of a myotoxin from the venom of Agkistrodom Contortrix Laticinctus (broad-banded copperhead) and pathogenesis of myonecrosis induced by it in mice. *Toxicon, 31, 3, 243-255 (1992)*

KAMINSKY P.; KLEIN M.; ROBIN-LHERBIER B.; WALKER P.; ESCANYE J.M.; BRUNOTTE F.; KLEIN M.; ROBERT J.; DUC M. ^{31}P-NMR study of different hypothyroid states in rat leg muscle. *Am J Physiol 261: E706-E712 (1991)*

KAMINSKY P.; ROBIN-LHERBIER B.; BRUNOTTE F.; ESCANYE J.M.; WALKER P.; KLEIN M.; ROBERT J.; DUC M. Energetic Metabolism in Hypothyroid Skeletal Muscel, as Studied by Phosphorus Magnetic Resonance Spectroscopy. *J Clin Endocrinol Metab, 74: 124-129 (1992)*

KANTOR H.L.; BRIGGS R.W.; METZ K.R.; BALABAN R.S. *Am. J. Physiol. 251, H 171(1986)*

KEMP G.J.; TAYLOR D.J.; RADDA G.K. (1993). Control of phosphocreatina resynthesis during recovery from exercise in human skeletal muscle. *NMR Biomed 6, 66-72.*

KUNO S.; AKISADA M.; MITSUMORI F. Phosphorus-31 nuclear magnetic study on the effects of endurance training in rat skeletal muscle.*Eur J Appl Physiol 65: 197-201 (1992)*

KUSHMERICK M.J.; MEYER R.A.; Chemical changes in rat leg muscle by phosphorus nuclear magnetic resonance. *Am J Physiol 248, C542-C549 (1985)*

KUSHMERICK M.J.; MOERLAND T.S.; WISEMAN R.W. Mammalian Skeletal Muscle Fibers distinguished by Contents of Phosphocreatina, ATP, and Pi.*Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 7521-7525 (1992)*

LUYTEN P.R.; GROEN J.P.; VERMEULEN J.W.A.H.; Den HOLLANDER J.A. Experimental aprroaches to image localized human ^{31}P NMR spectroscopy. *Magn. Reson. Med. 11, 1-21 (1989)*

MANSFIELD, P.; MORRIS, P.G. NMR *Imaging in Biomedicine*. Ed. Advances in Magnetic Resonance New York, Academic Press. (1982).

MATHEWS P.M.; BLAND J.I.; GADIAN D.G.; RADDA G.K. *Biochem. Biophys. Acta 721, 312 (1982)*

MATHEWS P.M.; ALLAIRE C.; SHOUBRIDGE E.A.; KARPATI G.; CARPENER S.P.; ARNOLD D.A. In vivo muscle magnetic resonance spectroscopy in tehe clinical investigation of mitocondrial diseases. *Neurology 41, 114-120* (1991)

MARTIN J.F.; GUTH B.D.; GRIFFEY R.H.; HOEKENGA D.E. *Magn Reson Med 11:64 (1989)*

McARCLE, W.D.; KATCH F.I.; KATCH V.L. *Fisiologia do Exercício Energia, Nutrição e Desempenho Humano. 3a edição.* Editora Guanabara Koogan *(1991)*

McCULLY K.; ARGOV Z.; BODEN Z.; BROWN B.P.; BANK W.J.; CHANCE B. Detection of muscle injury in human a with ^{31}P magnetic resonance spectroscopy. *Muscle Nerve 11, 212-216 (1988)*

McCULLY K.; SHELLOCK F.G.; BAND W.J.; POSNER J.D. The use of nuclear magnetic resonance to evaluate muscle injury. *Med Scien Sport Exerc 24,5, 537-542 (1992)*

MENON R.S.; HENDRICH K.; HU X.; UGURBIL K. ^{31}P NMR spectroscopy of the human heart at 4 T: detection of substantilly uncontaminated cardiac spectra and differentiation of subpicardium and subendocardium. *Magn Resson. Med. 26, 368-376 (1992)*

MOON R.B.; RICHARDS J.H.; Determinação of Intracellular pH by ^{31}P Magnetic Resonance. *J Biol Chem 25, 7276-7278 (1973)*

MORINI C.C.; PEREIRA E.C.L.; ARAUJO H.S.; OWNBY C., SALVINI T.R. ACL myotoxin (from agkistrodon contortrix laticintus) on the fast and slow muscle fibras of mice analyses of injury and muscle recovery. *Toxicon (in Press)*

NEUBAUER S.; HAMMAN B.L.; PERRY S.B.; BITTL J.A.; INGWALL J.S. *Cir Res. 63, 1 (1988)*

NEUBAUER S.; KRANE T.; SCHINDLER R.; HILLENBRAND H.; ENTZEROTH C.; HORN M.; BAUER W.R.; STEPHAN T.; LACKNER K.; HAASE A.; ERTL G. Direct Measurement of Spin-Lattice Relaxation Times of Phosphorus Metabolites in Human Myocardium. *Mag Reson Med. 26, 300-307(1992)*

NUCCITELLI R.; WEBB D.J.; LAGIER S.T., MATSON G.B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. In Press.(1981)*

NUNALLY R.L.; HOLLIS D.P. *Biochemistry 18(6), 3642 (1979)*

OKADA M. MITSUNAMI K.; YABE T.; KINOSHITA M.; MORIKAWA S.; INUBUSHI T. *Book of Abstracts Society of Magnetic Resonance in Medicine*, vol 2, 22305, Society of Magnetic Resonance in Medicine, Berkeley (1992)

ORDIDGE R.J.; CONNELLY A.; LOHMAN A.B. Image-Selected in Vivo Spectroscopy (ISIS). A New Technique for Spatially Selective NMR Spectroscopy. *J Magn Reson 66, 283-294 (1986)*

OUWERDED R.; BOTTOMLEY P.A. Optimum flip angles for exciting NMR with uncertain T_1 values. *Magn Reson Med (in press)*

PYKETT I.L. *Scientific American 246, 5, 54-64 (1982)*

RADDA G.K.; BORE P.J.; RAJAGOPALAN B. Clinical aspects of ^{31}P NMR spectroscopy. *Br. Med Bull. 40, 155 (1983)*

RADDA G.K. The Use of NMR Spectroscopy for the Understanding of Disease. *Science, 133, 640-645 (1986)*

RATH D.P.; ABDULJALIL A. M.; ROSBITAILLE M. L. Spatially Localized ^{31}P NMR Measurements of Longitudinal Relaxation Rates in The Canine Myocardium *Magn Reson Med 29: 822-825 (1993)*

RADDA G.K.; RAJA B; TAYLOR D.J. Biochemistry in vivo; An appraisal of clinical magn. reson. Spectroscopy. *Magn. Reson. Q5, 122-151(1989)*

RESS D.; SMITH M.B.; HARLEY J.; RADDA G.K. *In vivo* functioning of creatina phosphokinase in human foream muscle, studied by ^{31}P NMR saturation tranfer. Magn Reson Med. 9, 39-52 *(1989)*

ROSS D.B.; RADDA G.K.; GADIAN D.G.; ROCKER G.; ESIRI M.; FALCONER-SMITH J. Examination of a case of suspected McArdle's syndrome by ^{31}P nuclear magnetic resonance. *New Eng. J. Med. 304, 1338 (1981)*

ROTH K.; HUBESCH D.J.; MEYERHOFF D.J.; NARUSE S.; GOBER J.R.; LAWRY T.J.; BOSKA M.D.; MATSON G.B.; WEINER M.W. Noinvasive quantification of phosphorus metabolites in human tissue to NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson. 81, 299-311 (1989)*

SAKUMA H.; NELSON S.J.; VIGNERON J.H.; HARTIALA J.; HIGGINS C.B. Book of Abstracts Society of Magnetic Resonance in Medicine, vol 2, p 2306, *Society of Magnetic Resonance in Medicine, Berkeley (1992)*

SAKUMA H.; NELSON S.J.; VIGNERON J.H.; HIGGINS C.B. Measurement of T_1 relaxation times of caridiac phosphate metabolites using BIR-4 adiabatic pulses and a variable nutation method. *Magn. Reson. Med. 29, 688-691 (1993)*

SALVINI T.F.; BONAGAMBA T.J.; PANEPUCCI H.C.; VIDOTO E.L.G.; TANNÚS A.; MORINI C.C.; ZERI A.C.M. A comparative study of the mouse muscle recovery by *in vivo* ^{31}P NMR and histological investigation. *Rev Bras. Fisio. 1, 9-11 (1996)*

SILVA, Eduardo Gomes. *Desenvolvimento da Técnica de Desacoplamento Heteronuclear em Banda Larga para Espctroscopia de Alta Resolução por RMN* , dissertação de mestrado - FFI-IFSC-USP, 1994.

STRAYER, Lubert. *Biochemistry.* 3 ed. New York, W.H. Freeman, 1988

SLICHTER C.P.*Principles of Magnetic Resonance*, Springer Verlag. New York (1978)

SMITH C.D.; AIN K.B. Brain metabolism in hypothyroidism studied whit ^{31}P magnetic-resonance spectroscopy. *Lancet, 345: 619-620 (1995)*

TAKAHIRO Yabe T. et al. Quantitative Measurements of Cardiac Phosphorus Metabolites in Coronay Artery Disease by ^{31}P Magnetic Resonance Spectroscopy.*Clinical Investigation an Reports. Circulation Vol 92, No 1 July 15-23 1995*

TAYLOR D.J.; BORE P.J.; STYLES P.; GADIAN D.G.; RADDA G.K.. Bioenergetics of Intact Human Muscle, a ^{31}P Nuclear Magnetic Resonance Study. *Mol. Biol. Med. 1, 77-94 (1983).*

TAYLOR D.J.; STYLES P.; MATTHEWS P.M.; ARNOLD D.A.; GADIAN D.G.; BORE P.; RADDA G.K. Energetics of Human Muscle: Exercise-Induced ATP Depletion. *Magn Reson Med 3, 44-54 (1986)*

THOMSER C.; JENSEN K.E.; HENRIKSEN O. - In vivo Measurents of T_1 Relaxation Times of ^{31}P-metabolites in Human Skeletal Muscle. *Magn Reson Imag vol 7, 2,231-4 (1989)*

YABE T.; MITSUNAMI K.; INUBUSHI T.; KINOSHITA M. Quantitative Measurements of Cardiac Phosphorus Metabolites in Coronary Artery Disease by ^{31}P Magnetic Resonance Spectroscopy. Clinical Investigation and Reports.*Circulation. 92: 15-23 (1995)*

YONGBI N.M.; LEACH M. O.; PAYNE G. S.; COLLINS D. J. Two-point volume localized T_1 meansurement sequence for in vivo spectroscopy using a suface coil. *NMR Biomed. 5, 5,95-100 (1992)*

Van DOBBERBURGH J.O.; LEKKERKERK C.; van ECHTELD C.J.A. Saturation effects in human heart and chest wall muscle measurement by ^{31}P 1D spectroscopy imaging *(abstr). In Book of abstracts: Society of Magnetic Resonance in Medicine, 988 (1991)*

Van DOBBERBURGH J.O.; LEKKERKERK C.; van ECHTELD C.J.A.. Saturation Correction in Human Cardiac ^{31}P MR Spectroscopy at 1.5 T. *NMR in Biomedicine, vol. 7,218-224 (1994)*

VEECH R.L.; LAWSON J.W.R.; CORNELL N.W.; KREBS H.A. Cytosolic Phosphorylation Potencial *J.Biol Chem 254, 14, 6538-6547 (1979)*

VESTERGAARD-POULSEN P.; THOMSEN C.; SINKJAER T. HENRIKSEN O. Simultaneous ^{31}P NMR Spectroscopy and EMG in Exersing and Recovering Human Skeletal Muscle: Technical Aspects. *Magn Reson Med 31: 93-102 (1994)*

VIDOTO, Ednalva Aparecida, dissertação de mestrado, DFCM-IFQSC-USP, 1995, *Supressão de Bandas Laterais Através daTécnica de Rotação da Amostra em Torno do Ângulo Mágico com Frequência Variável*, IFSC-USP

VIDOTO, Edson Luiz Géa, dissertação de mestrado, DFCM-IFQSC-USP, 1995, *Projeto de Transdutores de Otimização do Sistema de Recepção do Tomógrafo de RMN de Campo Magnético Ultra Baixo.* IFSC-USP