



ESCOLA SUPERIOR DE  
TECNOLOGIA DA SAÚDE  
DE LISBOA



INSTITUTO  
POLITÉCNICO  
DE LISBOA

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

# **Estudo da Doença de *Machado Joseph* em modelo animal transgénico através de um equipamento de Ressonância Magnética de 9,4T**

---

**Caroline Cesário Jordão**

**Orientadora:** Ana Luísa Vieira, PhD

**Mestrado:** Radiações Aplicadas às Tecnologias da Saúde

**Lisboa, 2016**



**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA**

**ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA**

**Estudo da Doença de *Machado Joseph* em modelo animal transgénico através de um equipamento de Ressonância Magnética de 9,4T**

---

**Caroline Cesário Jordão**

**Orientadora:** Ana Luísa Vieira, PhD

**Júri:**

**Presidente** Dra. Maria Margarida Ribeiro

**Arguente** Dra. Sónia Isabel Gonçalves

**Mestrado:** Radiações Aplicadas às Tecnologias da Saúde

**Lisboa, 2016**

# **Estudo da Doença de *Machado Joseph* em modelo animal transgénico através de um equipamento de Ressonância Magnética de 9,4T**

© Copyright by Caroline Cesário Jordão, ESTeSL/IPL, IPL

*A Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor e que tal não viole nenhuma restrição imposta por artigos publicados que estejam incluídos neste trabalho.*

Documento escrito ao abrigo do novo acordo ortográfico da Língua Portuguesa (2009)

## Agradecimentos

A minha orientadora, Professora Ana Luísa Vieira por todo o apoio, orientação, e disponibilidade que teve durante toda a realização da dissertação.

Ao Professor Dr. Miguel Castelo Branco, Diretor do Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde pela disponibilização de recursos técnicos e humanos que permitiram a realização deste trabalho.

Agradeço igualmente a Lorena Petrella, João Castelhana e José Sereno por tudo o que ensinaram e por toda a paciência que tiveram durante esta jornada.

Ao Prof. João Figueiredo por toda a ajuda prestada na parte estatística ao som do *“The Piano Guys”*.

Aos meus pais e a minha irmã por me permitirem alcançar este objetivo e pelo carinho e apoio permanentes.

À Dr. Diana Fernandes e à Prof. Rosa Cação por todas as sugestões, dedicação e incentivo.

Ao Gonçalo Fernandes pela força que me deu nos momentos mais complicados, pelo companheirismo e pela admirável paciência que mantiveste durante esta longa jornada.

## **Resumo**

Estudos de neuroimagem com ressonância magnética (RM) têm sido muito valiosos na caracterização de lesões cerebrais na doença de Machado Joseph (MJD). A zona mais atingida por esta patologia é o cerebelo, contudo estudos recentes mostraram que outras estruturas cerebrais podem ser afetadas.

O objetivo deste estudo é investigar possíveis alterações estruturais ou bioquímicas no estriado, hipocampo e córtex pré-frontal (PFC) em ratinhos transgênicos com idade precoce, com MJD através de RM 9,4T (sequência T2 e espectroscopia).

Foram estudados 14 ratinhos saudáveis e 15 ratinhos com MJD. Foi efetuada medição volumétrica e espectroscopia protónica das três regiões de interesse. Pretende-se avaliar a possibilidade de haver alterações dos volumes cerebrais e variações dos valores de metabolitos neurotransmissores (GABA, glutamato e aspartato) e metabolitos relacionados com o metabolismo energético (tCr) nas 3 regiões de interesse entre os 2 grupos em estudo.

Obteve-se uma correlação positiva entre o volume do hipocampo, estriado e a idade dos animais transgênicos com MJD. O GABA e o Glu estão correlacionados positivamente com a idade nas 3 regiões no grupo de ratinhos com MJD. O aspartato tende a ter valores mais elevados com o aumento da idade dos ratinhos com MJD no PFC. A creatina total correlaciona-se positivamente com a idade nas 3 regiões no grupo MJD.

Concluiu-se que nesta fase precoce da doença ainda não são visíveis distúrbios neuronais nos animais portadores de MJD nas três regiões analisadas contudo são visíveis alterações do metabolismo energético através de espectroscopia protónica com a progressão da idade dos animais.

## **Palavras-chave**

Ressonância Magnética, Doença de Machado Joseph, Espectroscopia, Ratinho Transgênico.

## **Abstract**

Neuroimaging studies with magnetic resonance imaging (MRI) have been extremely valuable in the characterization of cerebral lesions in Machado Joseph disease (MJD). The most afflicted area by this pathology is the cerebellum, although recent studies showed other brain structures might be affected.

The goal of this study is the investigation of possible structural or biochemical alterations in the striate, hippocampus and pre-frontal cortex (PFC) in transgenic young mice with MJD, using a 9,4T MRI (T2 sequencing and spectroscopy).

14 healthy mice and 15 mice with MJD were studied. The 3 areas of interest were analyzed using volumetric measuring and <sup>1</sup>H spectroscopy single-voxel. The purpose was the evaluation of cerebral volume fluctuations, and variations of the neurotransmitter metabolites (GABA, glutamate and aspartate) and energetic metabolism-related metabolites (total creatine), within the 3 regions of interest in both groups.

A positive correlation between the hippocampus, the striate and transgenic MJD animals was obtained. GABA and Glu had a positive correlation with age in the 3 cerebral areas of mice with MJD. Within the PFC, Aspartate was increased with advancing age of the MJD mice. Total creatine correlates positively with age in the 3 studied areas on the MJD mice brains.

It was determined that in an early stage of the disease, there are no visible neuronal alterations in animals with MJD on the 3 analyzed cerebral areas. However, as age increases, energy metabolism variations are found using <sup>1</sup>H spectroscopy single-voxel on the 3 areas.

## **Keywords**

Magnetic Resonance, Machado Joseph Disease, Spectroscopy, Transgenic Mouse.

# Índice Geral

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
Índice geral.....	iv
Índice de Tabelas .....	vi
Índice de Figuras.....	vii
Índice de Gráficos.....	viii
Índice de Equações.....	viii
Lista de Abreviaturas.....	ix
<b>Capítulo 1 - Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 2 - Fundamentos teóricos .....</b>	<b>6</b>
2.1 Anatomia Cerebral Animal.....	6
2.2 Doenças do movimento .....	6
2.3 Doença de <i>Machado Joseph</i> .....	7
2.4 Ressonância Magnética.....	8
2.4.1 <i>Relaxação T1</i> .....	10
2.4.2 <i>Relaxação T2</i> .....	11
2.4.3 <i>Tempo de Repetição e Tempo de Eco</i> .....	12
2.4.4 <i>Sequências</i> .....	12
2.4.6 <i>Espectroscopia protónica</i> .....	16
2.4.7 <i>Metabolitos</i> .....	23
2.4.8 <i>Modelo Animal transgênico</i> .....	30
<b>Capítulo 3 - Metodologia .....</b>	<b>31</b>
3.1 Desenho do estudo.....	31
3.2 Caracterização da amostra.....	31
3.3 Recolha de dados .....	31
3.4 Equipamento utilizado.....	31
3.4.1 <i>Bruker Ressonância Magnética pré-clínica - BioSpec 94/20 USR</i> .....	31
3.5 Procedimento do exame:.....	34
3.5.1 <i>Anestesia</i> .....	34
3.5.2 <i>Posicionamento do animal</i> .....	35
3.5.3 <i>Preparação da sequência de pré-aquisição</i> .....	36
3.5.4 <i>Protocolos de sequências, aquisição T2</i> .....	38
3.5.5 <i>Protocolo Espectroscopia protónica</i> .....	39
3.6 Análise da imagem e pós-processamento.....	40
3.6.1 <i>Protocolo medição volumétrica</i> .....	40
3.6.2 <i>Pós-processamento espectroscopia</i> .....	41
3.7 Softwares utilizados .....	42
3.7.1 <i>Scalable Brain Atlas</i> .....	42
3.7.2 <i>RadiAnt DICOM Viewer 2.2.9</i> .....	42
3.7.3 <i>MATLAB (MATrix LABoratory) R2012b</i> .....	42
3.7.4 <i>LC Model</i> .....	45

3.8 Ferramentas de análise estatística .....	45
3.8.1 Software estatístico para as ciências sociais – SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) .....	45
<b>Capítulo 4 - Resultados .....</b>	<b>46</b>
4.1 Resultados da medição volumétrica .....	47
4.2 Resultados da espectroscopia .....	50
<b>Capítulo 5 - Discussão/Conclusão .....</b>	<b>66</b>
<b>Capítulo 6 - Referências Bibliográficas .....</b>	<b>74</b>
<b>Capítulo 7 - Anexo 1 .....</b>	<b>81</b>

## Índice de Tabelas

Tabela 3.1 - Especificações técnicas do equipamento RM linha <i>BioSpec 94/20</i> <i>USR</i> .....	32
Tabela 3.2 - Especificações técnicas da antena <i>T12054V3</i> .....	33
Tabela 3.3 - Especificações técnicas da antena de superfície <i>T20007V3</i> .....	34
Tabela 3.4 - Protocolo sequência <i>T2 RARE</i> .....	38
Tabela 3.5 - <i>VOI</i> Espectroscopia.....	39
Tabela 3.6 - Protocolo Espectroscopia <i>RARE</i> .....	39
Tabela 3.7 - Protocolo sequência <i>PRESS</i> .....	39
Tabela 3.8 - Protocolo aquisição sem supressão de água.....	40
Tabela 3.9 - Percentagem de animais transgênicos pertencentes a cada grupo do estudo.....	46
Tabela 3.10 - Percentagem de animais transgênicos pertencentes ao gênero feminino e masculino.....	46
Tabela 3.11 - Tabela relativa aos valores médios da medição dos volumes em 3 regiões cerebrais dos 2 grupos da amostra.....	48
Tabela 3.12 - Valores médios da medição dos volumes em 3 regiões cerebrais dos 2 grupos da amostra tendo em conta a idade (divisão em 2 classes: inferior a 75 dias e superior ou igual a 75 dias) .....	50
Tabela 3.13 - Valores médios de 2 metabolitos e seu rácio tendo em conta a região cerebral nos 2 grupos da amostra.....	51
Tabela 3.14 - Valores médios do aspartato nos 2 grupos da amostra na região do hipocampo e córtex pré-frontal.....	57
Tabela 3.15 - Valores médios de <i>Cr+PCr</i> nos 2 grupos da amostra na região do estriado, hipocampo e córtex pré-frontal.....	61
Tabela 3.16 – Resumo dos dados estatísticos .....	65

## Índice de Figuras

Figura 2.1 - Representação esquemática de uma secção sagital do cérebro de rato. Representação esquemática do hipocampo e fórnix cerebral.....	6
Figura 2.2 - Imagem representativa da forma como o protão alinha paralela e antiparalelamente e precessa em torno do eixo do campo magnético.....	9
Figura 2.3 – Esquema representativo do sinal detetado pela antena recetora. Decaimento do sinal.....	10
Figura 2.4 – Esquema representativo da aquisição rápida multicorte com melhoramento do relaxamento. ....	14
Figura 2.5 - Esquema representativo da codificação de fase <i>center-out</i> .....	15
Figura 2.6 – Esquema representativo da seleção do volume de interesse utilizando a sequência <i>PRESS</i> com a aplicação de 3 pulsos de RF simultaneamente.....	20
Figura 3.1 - Equipamento RM animal 9,4T <i>BioSpec 94/20 USR</i> .....	32
Figura 3.2 - Antena transmissora <i>Bruker</i> e cama para ratinho.....	33
Figura 3.3 - Antena de superfície <i>T20007V3</i> .....	34
Figura 3.4 - Sistema de anestesia <i>EZ-SA800</i> .....	35
Figura 3.5 - Equipamento de monitorização de temperatura <i>Haake SC100</i> e de respiração <i>SAI Inc.</i> ....	35
Figura 3.6 - Animal anestesiado posicionado na cama com cobertor de aquecimento.....	36
Figura 3.7- Imagens de RM ponderadas em T2 cortes axiais utilizadas para efetuar a medição volumétrica.....	41
Figura 3.8 - Pixel mais superior no plano sagital.....	43
Figura 3.9 - Número de cortes.....	43
Figura 3.10 - Ajuste do contraste da imagem.....	43
Figura 3.11 - Ajuste de intensidades.....	44
Figura 3.12 – Resultado final após medição volumétrica.....	44
Figura 3.13 - Espectro médio de animais transgénicos com a doença de Machado Joseph e do Grupo de Controlo para a região do estriado. ....	45

## Índice de Gráficos

Gráfico 4.1 – Gráfico que demonstra a predominância do gênero feminino na amostra geral comparativamente ao gênero masculino.....	46
Gráfico 4.2 – Diagrama de dispersão do volume para a região do hipocampo no grupo de ratinhos com MJD consoante a idade.....	49
Gráfico 4.3 – Diagrama de dispersão do <i>GABA</i> e <i>Glu</i> tendo em conta as idades dos ratinhos.....	53
Gráfico 4.4 – Diagrama de dispersão do <i>GABA</i> tendo em conta as idades dos ratinhos em ambos os grupos de estudo.....	54
Gráfico 4.5 – Diagrama de dispersão do <i>Glu</i> tendo em conta as idades dos ratinhos em ambos os grupos de estudo.....	54
Gráfico 4.6 – Diagramas de extremos e quadris referente ao metabolitos <i>GABA</i> e <i>Glu</i> para as três regiões de interesse nos animais com <i>MJD</i> .....	55
Gráfico 4.7 - Diagrama de dispersão referente ao metabolito aspartato para a região do Hipocampo e <i>PFC</i> no grupo <i>MJD</i> .....	58
Gráfico 4.8 - Diagramas de extremos e quadris referente ao metabolito Aspartato presente no hipocampo e <i>PFC</i> nos animais com <i>MJD</i> .....	59
Gráfico 4.9 - Diagrama de dispersão da Creatina mais Fosfocreatina para as três regiões de interesse no grupo de <i>MJD</i> .....	62
Gráfico 4.10 – Diagrama de extremos e quadris referente ao metabolito Creatina total presente nas três regiões de interesse nos animais com <i>MJD</i> tendo em conta a idade (2 classes) .....	63

## Índice de Equações

Equação 2.1 - Frequência de <i>Larmor</i> .....	9
Equação 2.2 – Equação exponencial sobre o processo de relaxação.....	11
Equação 2.3 – Equação para o cálculo do desvio químico em ppm.....	17

## Lista de Abreviaturas

<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>Ala</b>	Alanina
<b>Asp</b>	Aspartato
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>BBB</b>	Barreira cérebro-sangue
<b>B0</b>	Campo Magnético Externo
<b>Beff</b>	Campo magnético efetivo
<b>C</b>	Carbono
<b>CAG</b>	Citosina-Adenina-Guanina
<b>CHESS</b>	Deslocamento químico seletivo
<b>Cho</b>	Colina
<b>CNC</b>	Centro de Neurociências e Biologia Celular
<b>CPMG</b>	Condição <i>Carr-Purcell-Meiboom-Gill</i>
<b>Cr</b>	Creatina
<b>CRLB</b>	Critério de limite inferior <i>Cramer-Rao</i>
<b>DAC</b>	Unidades de <i>shim</i>
<b>DICOM</b>	Imagem digital e comunicações em Medicina
<b>DRESS</b>	<i>Depth-Resolved Surface-coil</i>
<b>DRPLA</b>	Atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana
<b>ESP</b>	Espaçamento entre os ecos
<b>ETL</b>	Comprimento do conjunto de ecos
<b>FAISE</b>	Aquisição rápida com ecos intercalados
<b>FID</b>	Decaimento livre
<b>FLASH</b>	<i>Fast Low-Angle Shot</i>
<b>FMUC</b>	Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
<b>FOV</b>	Campo de visão
<b>FSE</b>	<i>Fast spin echo</i>
<b>GABA</b>	Ácido gama-aminobutírico
<b>Glc</b>	Glicose
<b>GSH</b>	Glutationa
<b>Gln</b>	Glutamina
<b>Glu</b>	Glutamato

<b>Glx</b>	Conjunto glutamato e glutamina
<b>GPC</b>	Glicerofosforilcolina
<b>H</b>	Hidrogénio
<b>HD</b>	<i>Huntington's disease</i>
<b>Ins</b>	Inositol
<b>Lac</b>	Lactato
<b>m-Ins</b>	Mio-inositol
<b>M0</b>	Magnetização longitudinal
<b>MATLAB</b>	<i>MATrix LABoratory</i>
<b>MJD</b>	<i>Machado Joseph's disease</i>
<b>MRS</b>	Espectroscopia por Ressonância Magnética
<b>MRSI</b>	Técnica multi-voxel
<b>Na</b>	Sódio
<b>NAA</b>	N-acetil aspartato
<b>NAAG</b>	N-acetil-aspartato e ácido glutâmico
<b>O</b>	Oxigénio
<b>ORBEA</b>	Organização Responsável pelo Bem-Estar dos Animais
<b>P</b>	Fósforo
<b>PCH</b>	Fosforilcolina
<b>PCr</b>	Fosfocreatina
<b>PFC</b>	Córtex pré-frontal
<b>Pi</b>	Fosfato inorgânico
<b>PoliQ</b>	Doenças de poliglutamina
<b>ppm</b>	Partes por milhão
<b>PRESS</b>	<i>Point-RESolved Spectroscopy</i>
<b>RARE</b>	Aquisição rápida multicorte com melhoramento do relaxamento
<b>RF</b>	Radiofrequência
<b>RM</b>	Ressonância Magnética
<b>ROI</b>	Região de interesse
<b>SARA</b>	Avaliação e classificação da Ataxia
<b>SBMA</b>	Atrofia muscular bulbo-espinhal
<b>SCA</b>	Ataxias Espinhocerebelares
<b>SCA3</b>	Ataxia Espinhocerebelar do tipo 3
<b>SMAX1</b>	Doença de <i>Kennedy</i>

<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SPM</b>	Mapeamento estatístico paramétrico
<b>SPSS</b>	Pacote estatístico para as ciências sociais
<b>SVS</b>	Voxel único
<b>t</b>	Tempo
<b>T1</b>	Tempo de relaxação spin-rede
<b>T2</b>	Tempo de relaxação spin-spin
<b>T</b>	Binário
<b>Tau</b>	Taurina
<b>TCho</b>	Colina total
<b>TCr</b>	Creatina total
<b>TE</b>	Tempo de eco
<b>TEeff</b>	Tempo de eco efetivo
<b>TMS</b>	Tetrametilsilano
<b>TNAA</b>	NAA total
<b>TR</b>	Tempo de repetição
<b>TSE</b>	<i>Turbo spin echo</i>
<b>v</b>	Frequência de ressonância do composto sob investigação
<b>VAPOR</b>	Potência variável e atrasos de relaxamento otimizados
<b>vref</b>	Frequência de ressonância de referência
<b>WEFT</b>	Técnica de eliminação da água Transformada de Fourier
<b>WT</b>	Grupo de controlo
<b><math>\gamma</math></b>	Razão giromagnética
<b><math>\mu</math></b>	Momento magnético
<b><math>\delta</math></b>	Desvio químico

## Capítulo 1 - Introdução

A doença de *Machado Joseph* (MJD), também conhecida como Ataxia Espinhocerebelar do tipo 3 (SCA3), é uma patologia autossômica dominante causada por uma expansão da repetição CAG do gene ATXN3 no cromossoma 14q32.1.<sup>97,98,99</sup> As ataxias espinhocerebelares (SCA) autossômicas dominantes são consideradas doenças raras. Neste grupo, a MJD é a mais prevalente a nível mundial e em Portugal apresenta uma frequência relativamente alta (58 a 74%);<sup>16,17</sup> Porém, não se verifica neste país uma distribuição geográfica homogênea constatando-se na Região Autónoma dos Açores a maior prevalência nacional (1:2492) e na ilha das Flores a maior prevalência mundial (1:239).<sup>99,13,24</sup> A sua distribuição geográfica é alargada a todo o mundo com frequência relativa elevada dentro das ataxias espinhocerebelares em países como Brasil (69-72%);<sup>14,15</sup> Portugal (58-74%);<sup>16,17</sup> Singapura (53%);<sup>18</sup> China (49%);<sup>19</sup> Holanda (44%);<sup>20</sup> Alemanha (42%)<sup>21</sup> e, Japão (28-63%).<sup>22</sup>

Clinicamente, a MJD é uma patologia heterogênea que, em 92% dos casos, se manifesta com ataxia da marcha.<sup>100</sup> Esta doença, altamente limitante, tem como apresentação a ataxia cerebelar, alterações oculares, síndrome piramidal, sinais extrapiramidais, disfagia e perturbações do sono.<sup>97,23</sup>

Estão descritas várias escalas para avaliar o estado da doença, sendo a *Assessment and Rating of Ataxia* (SARA) a mais validada até ao momento.<sup>109</sup> No entanto, a SARA não apresenta qualquer utilidade em indivíduos pré-sintomáticos e também não permite identificar diferenças subtis que podem servir como pontos-chave em futuros ensaios terapêuticos.

A lesão cerebelar é responsável pela principal manifestação clínica: a ataxia. O cerebelo desempenha um papel importante na função motora, contudo as disfunções cognitivas e emocionais têm também sido relatadas em doentes com lesões do cerebelo.<sup>101</sup> Isso enfatiza a importância de estudos que consideram aspectos não-motores na MJD.

Além disso, a doença é caracterizada por uma extensa degeneração morfológica dos neurónios do sistema nervoso central e periférico causando alterações funcionais difusas.<sup>102</sup> Foram efetuados por *Rub U et al.*<sup>111</sup> *Tokumar AM et al.*<sup>103</sup> e *D'Abreu A et al.*<sup>12</sup> estudos neuropatológicos e de neuro-imagem que indicaram um amplo envolvimento do sistema nervoso central, incluindo o cerebelo, o tronco cerebral, os gânglios da base, a medula espinal<sup>102,103</sup> bem como a nível cerebral: os lóbulos frontal, temporal, parietal e occipital.<sup>103,12</sup>

A espectroscopia protônica por Ressonância Magnética (MRS) oferece uma abordagem não-ionizante e não-invasiva para obter informação quantitativa sobre a relação entre os metabolitos e a sua função clínica em doentes com doenças neurodegenerativas.<sup>104</sup> A MRS permite ainda identificar alterações *in vivo* das concentrações dos metabolitos no cérebro que podem ocorrer antes da atrofia cerebral, permitindo uma intervenção terapêutica precoce.

As alterações nos metabolitos cerebrais em pacientes com MJD tem sido previamente estudadas com espectroscopia, mas principalmente em equipamentos de RM com 1,5T.<sup>105,106</sup> Estes estudos, na sua maioria relatam apenas rácios entre metabolitos que dificultam a interpretação dos dados.<sup>107,108</sup>

Existem também estudos anatómicos e bioquímicos com ratinhos transgênicos sem qualquer patologia realizados com equipamentos de RM de elevada intensidade de campo magnético (7 e 9,4T).<sup>90,95</sup>, bem como trabalhos desenvolvidos em espectroscopia protônica em animais transgênicos com espectrómetros de 14,1T. Contudo os ratinhos transgênicos utilizados eram crescidos (6 meses) e só foi analisada a região do cerebelo.<sup>110</sup>

Nenhum estudo foi realizado com ratinhos com uma média de idade de 68 dias portadores de SCA3 com um equipamento de RM de alta performance para a região do córtex pré-frontal, hipocampo e estriado.

Estudos de neuro-imagem através de RM têm sido relevantes na caracterização de lesões cerebrais em ataxias espinhocerebelares e na doença de *Machado Joseph* em particular. Contudo, na MJD, alguns dos estudos de RM efetuados basearam-se somente na análise visual ou quantificação manual.<sup>26</sup>

*Rub U et al.*<sup>111</sup> indicaram que os estudos anatómicos efetuados por RM demonstraram alterações significativas no cerebelo, no vérmis, no tronco cerebral e nos gânglios da base nos pacientes com MJD, enquanto que *Hirano et al.*<sup>112</sup> mencionaram que estudos funcionais têm sugerido o envolvimento de outras áreas cerebrais, como o córtex cerebral e o tálamo. *Herlidou-Memê S et al.*<sup>113</sup> e *Etchebehere EC et al.*<sup>114</sup> assinalaram que além de simples inspeção visual, algoritmos de processamento de imagem também podem ser aplicados às imagens de RM.<sup>115,116</sup>

Tradicionalmente, o cerebelo é considerado como tendo um papel importante na função motora, no entanto disfunções cognitivas e emocionais têm também sido observadas em doentes com lesões do cerebelo.<sup>101</sup> o que enfatiza a importância de estudos e investigações específicas que considerem aspetos não motores em MJD.

*D' Abreu et al.*<sup>25</sup> assinalaram também que existe evidência de disfunção axonal da matéria branca profunda. A função cognitiva encontra-se alterada na

doença de *Machado Joseph*, em domínios tais como a atenção, a função executiva, raciocínio abstrato não-verbal, capacidade visual e memória.<sup>117,118</sup>

*D'Abreu et al.*<sup>12</sup> aplicaram uma análise morfométrica voxel-a-voxel (VBM) em um grande número de pacientes e encontraram atrofia no neocórtex, incluindo frontal, parietal, temporal e occipital. *Etchebehere EC et al.*<sup>114</sup> revelaram envolvimento do córtex nesta doença através de estudos com tomografia por emissão de positrões (PET) e tomografia por emissão de fóton único (SPECT).

Estes dados de imagem sugerem fortemente que a neurodegeneração em MJD se estende muito além do cerebelo e das vias motoras. Nos últimos anos, os défices cognitivos têm sido cada vez mais reconhecidos na MJD. *Lopes et al.*<sup>119</sup> encontraram défices de memória ocasionais, ao passo que *Kawai et al.*<sup>120</sup> também identificaram dificuldades em tarefas visuo-espaciais e de linguagem. Tais alterações neuropsicológicas não podem ser explicadas exclusivamente por lesão cerebelar.

Apesar de achados patológicos obtidos por autópsia poderem demonstrar as lesões e as regiões cerebrais realmente envolvidas, eles refletem apenas os estádios terminais da doença, e não fornecem uma visão a respeito de quando e onde começou a haver comprometimento cerebral e como progrediu a neurodegeneração. Um estudo de imagem realizado ao longo da vida pode revelar o curso da progressão da doença. Foram reportados, em relatórios efetuados a imagens de ressonância magnética, alterações de intensidade em doentes portadores da mutação quando comparados com doentes saudáveis.<sup>121,122,123,124</sup>

*Klockgether et al.*<sup>125</sup> relataram as seguintes alterações cerebrais através da RM na ataxia espinocerebelar tipo 3: alargamento do quarto ventrículo, retração moderada do vérmis e hemisférios cerebelares, ponte, putamen e atrofia do caudado. *Soong et al.*<sup>126</sup> demonstraram com a utilização da tomografia por emissão de positrões (PET) com flúor-18-fluoro-2-desoxiglucose (FDG) alterações significativas no metabolismo da glicose no cerebelo, tronco cerebral e córtex cerebral em indivíduos assintomáticos com mutação genética, sugerindo atividade da doença pré-clínica. Estes resultados incluem diminuição do radioisótopo no cerebelo, tronco cerebral e córtex occipital e aumento do metabolismo do FDG no córtex parietal e temporal dos portadores do gene SCA3 assintomáticos. Os autores concluíram também que os resultados obtidos para os pacientes com a Doença de Machado Joseph são semelhantes às observadas na doença de Parkinson.

Regiões como o córtex pré-frontal, estriado e hipocampo foram pouco analisadas, daí o interesse em verificar se ocorre atrofia tal como foi identificado em outras regiões como por exemplo o cerebelo.<sup>110</sup>

Para efetuar a análise dessas três regiões recorreu-se a um estudo por volumetria para comparar o volume cerebral destas regiões de interesse em animais transgênicos sem qualquer tipo de patologia e com MJD. Para além do estudo volumétrico foi efetuada espectroscopia *single-voxel* nas 3 regiões cerebrais de enfoque para analisar os metabolitos presentes nessas áreas e seus comportamentos.

Já foram descritos estudos da MJD com equipamentos de 1,5T e 4T em humanos. No entanto, um campo de alta intensidade poderá ultrapassar as limitações inerentes a intensidade mais baixas, visto que será possível identificar através de espectroscopia protónica, metabolitos que por vezes não são incluídos por terem ressonâncias muito próximas com outros metabolitos predominantes e devido à aplicação deficiente da supressão da água. Para ultrapassar estes limites neste estudo foi utilizado um equipamento de ressonância animal de 9,4T.

Os metabolitos mais abordados nesta dissertação são o glutamato, ácido gama-aminobutírico, aspartato, creatina e fosfocreatina. Os três primeiros são neurotransmissores do sistema nervoso central dos mamíferos. O GABA é um neurotransmissor inibitório, o glutamato é um neurotransmissor excitatório tal como o aspartato. A creatina e a fosfocreatina são moléculas essenciais para o metabolismo energético funcionando como reserva energética. Alterações das concentrações desses metabolitos podem ser visíveis por espectroscopia protónica.

Pretende-se verificar quais são os metabolitos que diferem de região para região e como variam, para eventualmente utilizar os dados em futuros ensaios terapêuticos.

Definiu-se como objetivos principais desta dissertação:

- Verificar se a Ressonância Magnética é uma técnica de imagem que permite fornecer informação relevante sobre a patologia ainda no seu estágio inicial.
- Investigar a possibilidade de envolvimento cerebral (região do córtex pré-frontal, estriado e hipocampo) em ratinhos transgênicos portadores MJD com 2 meses de idade através de imagens de RM ponderada em T2 e espectroscopia protónica.

Os objetivos específicos da dissertação são:

- Verificar se ocorre alteração do volume cerebral dos ratinhos portadores de ataxia espinhocerebelar do tipo 3 em comparação com o grupo de controlo nas regiões do hipocampo, estriado e córtex pré-frontal;

- Averiguar se ocorrem alterações dos metabolitos que atuam como neurotransmissores como o Glutamato, Ácido gama – aminobutírico e Aspartato entre os 2 grupos de estudo;
- Investigar se ocorre alteração dos metabolitos relacionados com o metabolismo energético (Creatina e Fosfocreatina) em animais transgênicos com MJD em comparação com o grupo de controlo;
- Examinar os restantes metabolitos detetados por espectroscopia protónica e verificar se ocorrem alterações dos seus valores entre os 2 grupos da amostra.

No capítulo 2 são definidos os conceitos fundamentais e os fundamentos teóricos para a compreensão deste trabalho. É descrita a anatomia cerebral no ratinho, doenças do movimento e em especial a MJD. São descritos os princípios de RM, a sequência RARE, ponderação T2 e espectroscopia. É também descrito neste capítulo o modelo animal transgênico utilizado.

O terceiro capítulo apresenta os métodos utilizados para a execução do trabalho nomeadamente o equipamento, procedimento do exame, protocolos aplicados, análise da imagem e pós-processamento e por fim descrição dos softwares necessário para a recolha e análise dos dados.

O quarto capítulo apresenta os resultados obtidos através da medição volumétrica e espectroscopia protónica.

No capítulo 5 é efetuado a discussão dos resultados obtidos. São expostas as limitações encontradas durante a realização deste estudo e as perspectivas futuras.

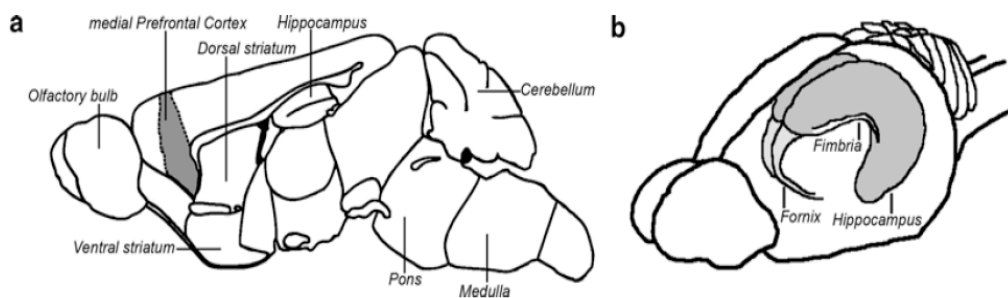
Por último apresentam-se as referências bibliográficas seguindo-se a estas seguem-se os anexos.

## Capítulo 2 - Fundamentos teóricos

### 2.1 Anatomia Cerebral Animal

O cérebro dos mamíferos é estruturalmente organizado em diferentes regiões anatómicas distintas. Estas são principalmente dedicadas ao controlo das funções comportamentais e fisiológicas. Várias regiões cerebrais são de interesse para os neurocientistas tais como:

- Bulbo olfativo, que está envolvido na deteção de odores;
- Córtex pré-frontal, que é importante para o controlo executivo;
- Estriado, também importante para o controlo executivo bem como na integração do movimento e recompensação do processamento;
- Hipocampo, controla a formação e recuperação de memórias associativas e episódicas;
- Cerebelo, está envolvido na aprendizagem motora e coordenação. Controla também voluntariamente movimentos físicos aprendidos;
- Ponte, contém o trato de substância branca dos nervos cranianos que transmitem sinais entre o cérebro e o cerebelo.
- Medula, controla as funções autonómicas e transmite informação entre o cérebro e a medula espinal<sup>1,96</sup>



- **Figura 2.1 a)** Representação esquemática de uma seção sagital do cérebro de rato.  
**b)** Representação esquemática do hipocampo e fórnix cerebral. Adaptado de [http://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-61779-111-6\\_2](http://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-61779-111-6_2)

### 2.2 Doenças do movimento

As doenças de movimento ou doenças de poliglutamina (poliQ) incluem: ataxias espinhocerebelares (SCA, do inglês *spinocerebellar ataxia*) tipos 1, 2, 6, 7 e 17; doença de *Machado Joseph* também conhecida como ataxia espinhocerebelar tipo 3; doença de *Huntington* (HD); atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana (DRPLA); atrofia muscular bulbo-espinhal – Doença de *Kennedy* (SBMA/SMA1)<sup>2,3</sup>

Estas doenças são autossómicas dominantes e estão ligadas a uma mutação no gene do recetor de androgénio localizado no cromossoma X. Esta mutação ocorre devido a repetição da expansão do trinucleótideo citosina-adenina-guanina (CAG) que codifica um segmento poliQ na região de codificação dos genes causadores da doença. Durante a síntese de proteínas, as repetições de CAG expandidas são convertidas para uma série de resíduos de glutamina ininterruptas que formam um segmento poliQ, e o acumular de proteínas de poliglutamina pode danificar a mitocôndria e o sistema ubiquitina proteassoma.<sup>4,5,6</sup> Como consequência, estas proteínas poliQ agregadas são encontradas nos neurónios degenerados, tal como no tronco cerebral, cerebelo e trato espinal.<sup>7</sup> Assim, proteínas contendo o segmento poliQ diferente, em última análise podem levar à disfunção e degeneração de subpopulações neuronais específicas.<sup>8</sup>

O trinucleótideo CAG expandido é instável e tende a expandir ainda mais, resultando num início da doença em uma idade mais precoce e aumento de repetições em gerações sucessivas provocando um agravamento da doença. Isso é um fenómeno chamado antecipação genética e é uma característica proeminente de todas as doenças de poliQ.<sup>9,10</sup>

As doenças de movimento afetam igualmente homens e mulheres e atingem principalmente o sistema nervoso central (SNC).<sup>11</sup>

Alguns tipos específicos de ataxias espinhocerebelares podem ser mais agressivas, e a maioria dos pacientes com SCA podem necessitar de utilizar cadeira de rodas 10 a 15 anos após o início dos sintomas. A maioria dos pacientes com SCA tem uma vida útil reduzida.<sup>11</sup>

## 2.3 Doença de Machado Joseph

A Doença de *Machado Joseph* é uma doença neurodegenerativa caracterizada pela notável heterogeneidade fenotípica.

Apesar de rara, é o tipo mais comum de ataxia espinhocerebelar autossómica dominante em todo o mundo (0,3 -2,0:100000).<sup>12</sup> A sua distribuição geográfica é alargada a todo o mundo com frequência relativa elevada dentro das ataxias espinhocerebelares (SCA) em países como Brasil (69-72%);<sup>14,15</sup> Portugal (58-74%);<sup>16,17</sup> Singapura (53%);<sup>18</sup> China (49%);<sup>19</sup> Holanda (44%);<sup>20</sup> Alemanha (42%)<sup>21</sup> e, Japão (28-63%).<sup>22</sup> Curiosamente, a prevalência difere consoante a região dentro de um mesmo país. Por exemplo, em Portugal continental a MJD é relativamente rara 1:100000,<sup>23</sup> com exceção da região do Vale do Tejo em que a prevalência é 1:1000.<sup>23</sup> No arquipélago dos Açores particularmente na ilha das

Flores foi encontrada a maior prevalência a nível mundial 1:239.<sup>13, 24</sup>

É causada por uma mutação de expansão da repetição CAG na região de codificação do gene da MJD localizado no cromossoma 14q32.1 que é responsável pela doença.<sup>25</sup>

As manifestações clínicas incluem ataxia, oftalmoparesia, neuropatia periférica, disfunção piramidal, distonia, distúrbios do sono e parkinsonismo.<sup>26</sup>

## 2.4 Ressonância Magnética

A RM é um fenómeno físico causado pela interação de dipolos magnéticos com campos magnéticos. Quando colocado num campo magnético externo, um dipolo magnético pode apenas absorver ou libertar energia sob a forma de radiação electromagnética a frequências específicas.

Um dipolo magnético não somente produz um campo magnético, mas também responde à presença de qualquer campo magnético de outras fontes.<sup>27</sup>

Muitas partículas subatómicas, como os eletrões, prótons e neutrões, possuem um momento dipolar magnético intrínseco devido ao seu spin. O número quântico de spin pode ter somente valores +1/2 e -1/2.

Quando as partículas são combinadas para formar átomos e moléculas, o valor do spin de cada partícula é somado, portanto o valor do spin de um átomo ou molécula pode variar entre múltiplos positivos ou negativos de 1/2, também podendo assumir o valor zero. Átomos e moléculas com spin diferente de zero podem ser afetados quando expostos a um campo magnético.

O núcleo de Hidrogénio é o mais apropriado para a ressonância magnética devido à sua elevada abundância no corpo humano e ao seu elevado momento magnético. Estima-se, nesse sentido, que o sinal que pode ser obtido do hidrogénio é 1000 vezes superior a qualquer outro elemento presente nos tecidos do corpo humano. Por essa razão o hidrogénio é utilizado como fonte de sinal na maioria dos exames de ressonância magnética.<sup>28</sup>

Na RM, observa-se um sinal produzido pelos momentos magnéticos dos prótons. Esse sinal é uma corrente elétrica induzida em uma bobina recetora pelos momentos magnéticos. O momento magnético de um único próton é, entretanto, muito pequeno para induzir uma corrente detetável em uma bobina: portanto, os prótons devem ser alinhados para produzirem um momento magnético significativo e detetável.<sup>28,29</sup>

Normalmente, os prótons no corpo têm uma orientação completamente aleatória. Os seus pequeníssimos vetores de momento magnético apontam em

todas as direções e cancelam-se de forma a que o momento magnético global é nulo.

Porém, se colocados em um campo magnético externo ( $B_0$ ) forte, os spins alinham-se na mesma direção do campo magnético, no mesmo sentido do seu vetor ou em sentido contrário. Como demonstrado na figura 2.2.

Um número ligeiramente superior de spins alinha-se no mesmo sentido (num estado de menor energia) do que em sentido oposto (estado de maior energia).

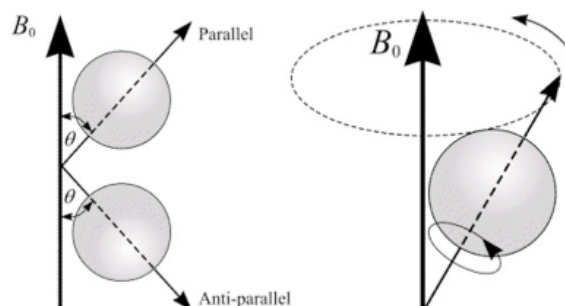
A diferença entre o número de núcleos no estado de menor energia e no estado de maior energia depende da intensidade do campo magnético externo e da temperatura.

Esse predomínio cria uma pequena magnetização resultante de equilíbrio no tecido que torna possível a RM. <sup>29</sup>

Um dipolo experimenta um binário/torque  $T$  perpendicular ao seu momento magnético  $\mu$  e ao campo externo  $B_0$ :  $T = \mu \times B_0$ . Ao contrário da agulha da bússola macroscópica, o núcleo tem um momento angular constante, e, portanto, não se pode alinhar com  $B_0$ . Pelo contrário, o binário faz com que ocorra uma precessão giroscópica no dipolo nuclear em torno do eixo do campo externo, a uma velocidade de rotação constante, a chamada frequência de *Larmor*:

$$\omega_0 = \gamma B_0$$

**Equação 2.1 – Frequência de Larmor**



**Figura 2.2 – Imagem representativa da forma como o próton alinha paralela e antiparalelamente e precessa em torno do eixo do campo magnético. Imagem retirada de <http://www.easymeasure.co.uk/>**

Na frequência de *Larmor*,  $\gamma$  corresponde à constante giromagnética. Esta corresponde à razão entre o momento angular e o momento magnético de cada núcleo em RM. A razão giromagnética do hidrogênio é de 42,57 MHz/T. No entanto, em equipamentos com diferentes intensidades de campo magnético o hidrogênio apresenta frequências de precessão variáveis.

A aplicação de um impulso de radiofrequência (RF) fará com que o momento magnético dos prótons altere o seu estado.

A rapidez ou a frequência de precessão do núcleo de hidrogênio depende

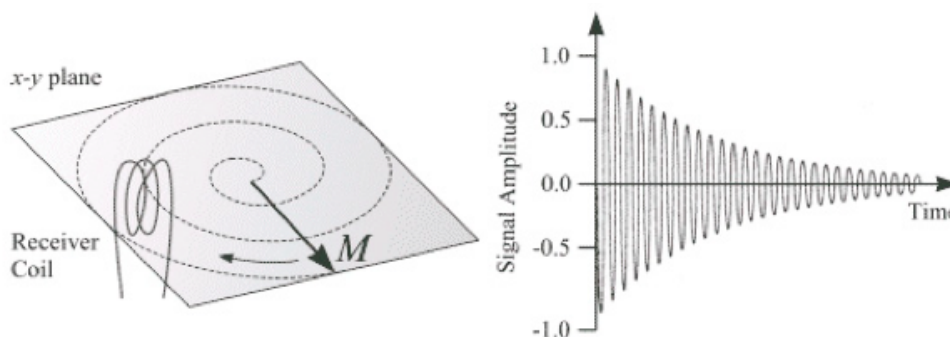
somente da intensidade do campo magnético. Quanto maior o campo magnético, maior será a frequência de precessão do spin. Conseguem-se rodar a magnetização para o plano transversal por meio de um impulso de radiação eletromagnética oscilando na frequência de *Larmor* do hidrogênio.

Esse impulso de radiofrequência que está em ressonância com o sistema é aplicado por tempo suficiente para rodar a magnetização longitudinal ( $M_0$ ) para o plano transversal (rotação de  $90^\circ$ ) onde esta pode ser medida e reconstruída para se obter uma imagem. O pulso aplicado pode rodar a magnetização longitudinal entre 0 e  $180^\circ$ .

A rotação do vetor de magnetização para o plano transversal pelo impulso de radiofrequência é o resultado de alguns dos spins passarem para o nível de maior energia com esta excitação, e também, o fato de estes precessarem em coerência.

A magnetização no plano transversal gerará uma corrente na bobina receptora (de acordo com a lei de *Faraday*). Ao longo do tempo o sinal decai enquanto que a magnetização retorna para o seu estado de equilíbrio, como mostrado na figura 2.3.

O processo pelo qual o núcleo excitado retorna ao equilíbrio devido à libertação de energia para o meio é conhecido como relaxação. Esta ocorre por meio da relaxação spin-rede e da relaxação spin-spin, as quais são definidas por duas constantes T1 e T2 respectivamente.



**Figura 2.3 – a) Esquema representativo do sinal detetado pela antena receptora. b) Decaimento do sinal. Imagem retirada de <http://www.easymeasure.co.uk/>**

### 2.4.1 Relaxação T1

Imediatamente após a aplicação do impulso de RF, o vetor ( $M_0$ ) é rodado em direção ao plano xy, criando  $M_{xy}$ . Isso causa uma diminuição correspondente no valor do componente vertical de  $M_0$ . Após um impulso de RF de 90 graus, o tempo requerido para o núcleo recuperar 63,2% do valor original de ( $M_0$ ) é definido como T1. À medida que a excitação é perdida, a magnetização longitudinal é gradualmente recuperada, por isso ela é conhecida como relaxação longitudinal.

Como a relaxação longitudinal envolve troca de energia entre os *spins* nucleares excitados e o ambiente (rede) molecular, ela é também referida como tempo de relaxação spin-rede.<sup>31</sup>

O valor de T1 é dependente da natureza física e química do ambiente que envolve o núcleo excitado. Em geral, moléculas menores, incluindo a água, relaxam muito mais lentamente do que moléculas de tamanho médio como os lípidos.

Quando um tecido com T1 curto é examinado usando uma sequência com um tempo de repetição (TR) do impulso de RF de 90 graus relativamente mais longo, o sinal oriundo desse tecido é intenso. Se o TR for mais curto do que o T1 do tecido, o núcleo não retornará ao equilíbrio antes do próximo pulso de RF, e o tecido é dito como estando saturado. Dessa forma, a intensidade do sinal aumenta à medida que o tempo de relaxação do tecido diminui.<sup>31</sup>

## 2.4.2 Relaxação T2

A relaxação spin-spin (T2) ocorre por meio da interação dos prótons com os campos magnéticos de outros núcleos. Após a aplicação de um impulso de RF, o núcleo excitado inicialmente precessa em fase em relação aos outros núcleos, resultando num valor elevado de  $M_{xy}$ . Entretanto, a coerência de fase é rapidamente perdida, uma vez que cada um dos núcleos tem o seu próprio campo magnético diminuto que interfere com os outros (relaxação spin-spin). A interação spin-spin transfere energia entre os núcleos envolvidos, de forma que a frequência de precessão de alguns esteja atrasada e a frequência de outros esteja acelerada. Dessa forma, a coerência de fase é perdida.

O processo de relaxação pode ser descrito pela equação exponencial:

$$M_{xy}(t) = M_{0,xy} \exp(-t/T2)$$

### Equação 2.2– Equação exponencial sobre o processo de relaxação

A constante de tempo para esta forma de relaxação, chamada de T2, é o período de tempo que decorre até 63,2% do sinal ser perdido.

O tempo de relaxação spin-spin depende do ambiente molecular dos spins e desta forma o T2 varia entre tecidos. Spins em fluidos influenciam de menor forma a fase dos spins vizinhos do que em sólidos. Neste caso os spins levam mais tempo a perder a fase e os tempos de relaxação T2 são mais longos do que em sólidos.<sup>31</sup>

### 2.4.3 Tempo de Repetição e Tempo de Eco

#### **Tempo de Repetição**

Tempo de Repetição (TR) representa o tempo entre sucessivas sequências de impulsos de excitação. Variações no valor de TR têm um efeito importante no controle das características de contraste da imagem. Para sequências spin eco valores curtos de TR (<1000 ms) são comuns em imagens exibindo contraste T1, e valores longos de TR (> 1500 ms) são comuns em imagens exibindo contraste T2. TR é também um fator que influencia o tempo de scan.

#### **Tempo de Eco**

Tempo de Eco (TE) representa o tempo em milissegundos entre a aplicação do pulso de excitação e a amostragem do sinal de RM.

### 2.4.4 Sequências

Existem duas principais famílias de sequências consoante o tipo de eco registado:

- Eco de gradiente;
- Spin eco.

Inúmeras variações foram desenvolvidas dentro de cada uma dessas famílias, principalmente para aumentar a velocidade das aquisições.<sup>128</sup>

#### **Eco Gradiente**

Na sequência eco de gradiente é aplicado um impulso de RF que roda o vector de magnetização parcialmente para o plano transversal. Os gradientes, em oposição aos impulsos de RF, são usados para realinhar ou desalinhar a magnetização transversal.

É constituída por uma série de impulsos de excitação, cada um separado por um TR. Os dados são adquiridos após a aplicação dos impulsos de excitação chamado tempo de eco (TE). O contraste da imagem pode variar com alterações tanto do TR e TE.<sup>128</sup> Outras sequências alternativas foram desenvolvidas como:

- Sequência eco-gradiente com deterioração da magnetização transversal residual (*spoiled gradient echo e ultrafast gradient echo*);
- *Steady state gradient echo*;
- *Contrast enhanced steady state gradient echo*;
- Gradientes equilibrados (*Balanced steady state gradient echo*);

- Ecoplanar.

### **Spin-Eco**

A sequência spin eco é baseada na repetição de pulsos de RF de 90 graus e de 180 graus. Este impulso de 180 graus tem como função realinhar os spins e é dado exatamente a meio caminho entre o impulso de excitação (90 graus) e o eco. Após um impulso de RF de 90 graus, o vector de magnetização encontra-se no plano transversal. Devido ao desfaseamento T2 os spins com o passar do tempo encontram-se com velocidades de precessão diferentes. Um impulso de 180 graus é então aplicado para realinhar os vectores dos spins para que estes voltem a precessar à mesma velocidade. O pulso de RF de 180 graus é aplicado no tempo TE/2.

Foram desenvolvidas sequências alternativas à spin-eco tradicional tendo esta como base que permitem efetuar a aquisição de uma forma mais rápida, como por exemplo *Fast spin-eco*, e *single shot fast spin-eco*.<sup>128</sup>

### **Recuperação inversão**

A sequência recuperação inversão é geralmente uma variante de uma sequência spin-eco convencional em que começa com um impulso de inversão de 180 graus. Quando o impulso de inversão é removido, o vector começa a perder a sua magnetização transversal e volta para a posição inicial B0. Um impulso de 90 graus de excitação é então aplicado depois de um determinado tempo após o impulso de 180 graus chamado tempo de inversão. O contraste da imagem depende da magnitude da magnetização longitudinal condicionada pelo tempo de inversão assim como do TE e TR. O contraste é baseado em curvas de recuperação T1 após o pulso de inversão de 180 graus. O impulso de 180 graus produz uma grande diferença do contraste entre a gordura e a água.<sup>128</sup>

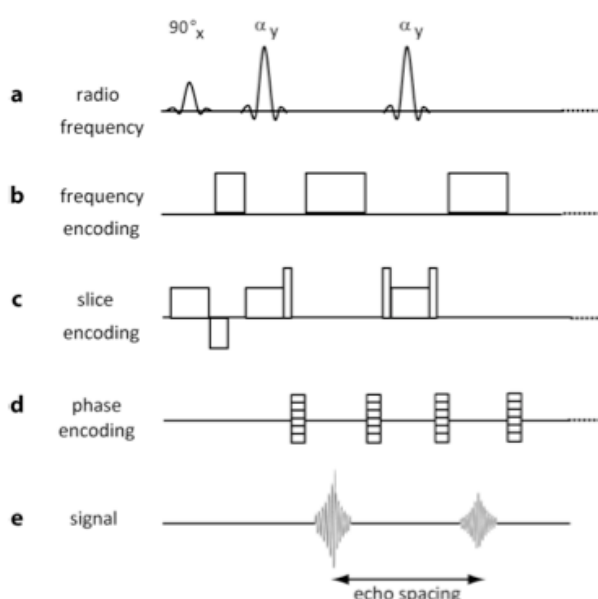
### **RARE**

Na década de 1980, quando a RM foi introduzida como técnica de diagnóstico, os tempos de aquisição longos constituíam restrições graves para a aquisição de imagens, sendo maior a probabilidade de ocorrência de artefactos na imagem causados pelo movimento do paciente.

Estas restrições levaram a investigações de técnicas de imagem mais rápidas. Em 1985 a imagem com a técnica FLASH (*Fast Low-Angle Shot*) foi introduzida.<sup>32</sup> O decaimento livre (FID) gerado por um impulso de RF que roda a

magnetização longitudinal de um pequeno ângulo é detetado como um eco de gradiente. A repetição desta sequência permite a aquisição de uma imagem em apenas alguns segundos. Aproximadamente ao mesmo tempo, foi proposto um novo método de imagem rápido. Ao contrário do FLASH esta abordagem baseia-se principalmente em imagens spin eco e foi designado como aquisição rápida multicorte com melhoramento do relaxamento (RARE).<sup>33,34</sup>

RARE é baseado no princípio de imagem de spin-eco e emprega codificação de fase independente para cada eco de um conjunto de ecos equidistantes.<sup>35</sup> A abordagem do conjunto de ecos resulta em uma redução drástica no tempo de aquisição comparativamente à imagem spin-eco convencional, que era até então utilizada para a obtenção de imagem anatômica por RM.



**Figura 2.4 – Esquema representativo da aquisição rápida multicorte com melhoramento do relaxamento. Imagem retirada de <http://www.easymeasure.co.uk/>**

A Figura 2.4 mostra o diagrama da sequência RARE base.

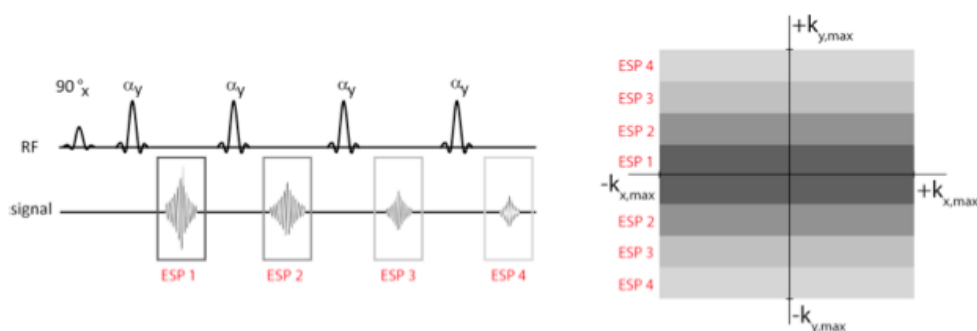
Depois de um impulso RF de excitação de seleção de corte um conjunto de impulsos de RF de alinhamento são aplicados através dos quais uma série de ecos são gerados. Os impulsos RF de alinhamento aplicados são de  $180^\circ$ .<sup>33</sup>

Em sequências RARE básicas, a fase dos impulsos RF de alinhamento são normalmente desfasados de  $90^\circ$  a partir da fase do impulso de excitação de RF (Figura 2.4a) para satisfazer a condição *Carr-Purcell-Meiboom-Gill* (CPMG) para sequências de impulso multi-eco.<sup>36</sup> Pela mesma razão, os impulsos de alinhamento são todos separados por um intervalo de tempo constante, chamado intervalo entre ecos (ESP) e o tempo entre o impulso de excitação e o primeiro impulso de alinhamento é exatamente metade do ESP.<sup>36</sup> Além disso, a condição de CPMG que

assume a fase acumulada entre dois impulsos de alinhamento é igual para cada ESP. Isto é realizado através de gradientes simétricos chamados ‘Crusher’ na direção de codificação de corte em torno do impulso RF de alinhamento com a exceção do primeiro, em que o gradiente esquerdo é combinado com o gradiente de reversão de corte do impulso de excitação (Figura 2.4c). Pela mesma razão, cada gradiente de codificação de fase é seguido por um gradiente exibindo a mesma amplitude mas polaridade invertida (um impulso com  $90^\circ$  positivo e outro com  $90^\circ$  negativo) (Figura 2.4d).

Para preparar a magnetização antes do primeiro impulso de reorientação, um gradiente de desfasamento com exatamente metade da duração do gradiente de codificação de frequência está incluído depois do impulso RF de excitação (Figura 2.4b). Ao cumprir todos estes requisitos ficou assegurado que um eco é gerado após cada impulso RF de alinhamento exatamente na frequência central.

O contraste das imagens RARE é dominado principalmente pelo tempo de relaxação T2 e dado pelo TE efetivo (TE<sub>eff</sub>), que é o tempo entre o impulso RF de excitação e a aquisição de uma linha no espaço k com a codificação de fase zero. Ao mudar a posição da linha de codificação de fase zero no conjunto de ecos a ponderação T2 pode ser modificada.<sup>37</sup>



**Figura 2.5 – Esquema representativo da codificação de fase center-out. Imagem retirada de <http://www.easymeasure.co.uk/>**

Aqui, é visível um processo em que foi empregue uma pequena ponderação T2 uma vez que o sinal pertencente ao primeiro eco é armazenado no centro do espaço k.

Assumindo um ESP de 8 ms, o TE efetivo é igual a 8 ms para este exemplo. Para aumentar o grau de ponderação T2, não o primeiro, mas um dos ecos subsequentes teriam de ser posicionados no centro do espaço k. Para o exemplo anterior TE<sub>eff</sub> seria de 32 ms no caso do quarto eco ser colocado no centro da espaço k.

O comprimento do conjunto de ecos (ETL) indica-nos o número de impulsos RF de alinhamento após um impulso RF de excitação e, portanto, determina o número de excitações necessárias para um dado tamanho de matriz.

No exemplo representado na Figura 2.5, o ETL é quatro, o que significa que são necessárias 32 excitações para uma matriz de 128 etapas de codificação de fase ficar preenchida. Como resultado, 32 ecos resultantes do espaçamento do primeira eco estão disponíveis e são todos armazenados no segmento central (cinzento escuro) visualizado no esquema do espaço k na Figura 2.5.

Todos os ecos restantes são distribuídos para preencher o restante espaço k, resultando em segmentos contendo 16 linhas cada, para o exemplo dado. No entanto pode-se preencher somente uma parte do espaço k e a parte restante é interpolada/ estimada através da propriedade do plexo conjugado e calculado por processamento paralelo.

RARE pode ser combinada com outras técnicas de amostragem do espaço k como aquisições espirais ou radiais e pode, também, ser realizada como uma sequência de impulsos 3D.<sup>38</sup>

Vários nomes alternativos surgiram para a sequência RARE original, incluindo FAISE (*Fast acquisition interleaved spin echo*), FSE (*Fast spin echo*) e TSE (*Turbo spin echo*) foram assumidas por diferentes fabricantes de equipamentos de RM.

#### 2.4.5 Espectroscopia protónica

Espectroscopia protónica por RM é um método *in vivo* não invasivo que mede a informação bioquímica dentro de uma região de interesse (ROI) denominado voxel, proporcionando assim informação sobre o metabolismo celular. A espectroscopia protónica utiliza o sinal de prótons (<sup>1</sup>H) dentro de produtos químicos observados na ROI para produzir um espectro.<sup>47</sup>

A localização do sinal pode ser realizada utilizando duas abordagens com um único voxel (SVS) ou pela técnica *multi-voxel*, MRSI. Como nesta dissertação foi utilizada unicamente a técnica voxel único, só esta será abordada.

Após a ressonância magnética convencional e aquisições de imagem nos planos axial, coronal e sagital, é escolhido um voxel dentro da ROI que abrange o volume de interesse, este define a região onde os espectros vão ser adquiridos.

Convencionou-se uma escala para medição da frequência de ressonância independente do campo magnético do equipamento de RM a que se deu o nome de

desvio químico, expressa em partes por milhão (ppm). Para expressar o desvio químico em ppm, é utilizada a equação:

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} \times 10^6$$

### Equação 2.3 – Cálculo do desvio químico em ppm

Onde  $\delta$  é o desvio químico em partes por milhão (ppm),  $\nu$  e  $\nu_{ref}$  são as frequências de ressonância do composto sob investigação e do composto de referência, respectivamente, medidos em Hz.<sup>33</sup>

Para uma espectroscopia protônica *in vitro*, o composto de referência é geralmente tetrametilsilano, TMS [(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Si], escolhido porque contém um núcleo quase totalmente protegido. O seu pico único (singleto) é assumido como tendo um desvio químico de 0,0 ppm. TMS é tóxico [31] e assim, em uma espectroscopia protônica *in vivo* do cérebro, o pico CH<sub>3</sub> de N-acetil aspartato (NAA) é geralmente o padrão de referência (cujo valor de desvio químico é 2,01 ppm).

O núcleo de um átomo consiste em prótons e nêutrons, rodeado por elétrons em órbita. Quando o átomo é colocado num campo magnético aplicado externamente, os prótons precessam e induzem um campo magnético local conhecido como o campo magnético efetivo ( $B_{eff}$ ).

A densidade de elétrons que cercam cada núcleo pode variar e, como resultado, o  $B_0$  somado ao  $B_{eff}$  pode diferir em cada núcleo o que resulta no fenómeno conhecido como desvio químico.<sup>40</sup>

Os produtos químicos geralmente têm mais do que um próton e cada próton dá um sinal de RM detetável. Prótons dentro do mesmo ambiente químico sentem o mesmo campo magnético, resultando em desvios químicos idênticos. Isto resulta num espectro contendo uma coleção de picos em diferentes radiofrequências representando núcleos de prótons em diferentes ambientes químicos.

Núcleos em estreita proximidade um do outro influenciam o campo magnético efetivo do vizinho ( $B_{eff}$ ).

Núcleos sentindo o mesmo desvio químico são denominados equivalentes e aqueles que não sentem o mesmo desvio químico são chamados de não equivalentes.

Núcleos equivalentes não produzem divisão do pico observável. No entanto, se há mais do que um próton na molécula e estes prótons são não equivalentes ocorre um acoplamento entre estes, chamado de acoplamento spin-spin ou

acoplamento J, fazendo com que os picos de ressonância se dividam. Em vez de um sinal como seria esperado observar para os núcleos não equivalentes, duas ou três frequências de ressonância são observadas.<sup>33,41</sup>

Existem vários tipos de interações que podem ocorrer no espectro e que o vão influenciar:

- Interações entre dípolos magnéticos spin;
- Interação quadrípolo eléctrico dependendo do spin;
- Anisotropia do desvio químico;
- Acoplamento J.

No entanto o tipo de interação mais significativo é o acoplamento J.

### **Acoplamento spin-spin ou acoplamento J**

Na presença de um campo magnético,  $B_0$ , onde temos uma ligação entre dois núcleos "Z" e "X" se, por exemplo, "X" tem uma probabilidade igual de ser alinhado no mesmo sentido ou no sentido contrário de  $B_0$ , o núcleo "Z" será dividido em dois picos espectrais iguais. O pico espectral do núcleo "Z" que está acoplado a "X" alinhado com  $B_0$  terá uma frequência mais elevada enquanto que alinhado no sentido contrário de  $B_0$  terá uma frequência mais baixa. Este processo de modificação de frequência pelos núcleos vizinhos é chamado de acoplamento spin-spin. A constante de acoplamento J expressa a diferença numérica (em *Hertz*) entre as duas frequências resultantes do mesmo núcleo. É um valor único para cada molécula, que ao contrário do desvio químico, permanece constante com  $B_0$ .

Geralmente, se o núcleo "Z" está acoplado a vários núcleos equivalentes quimicamente "X", a linha espectral do núcleo "Z" será dividido em "n + 1" picos múltiplos. Por exemplo, no espectro de etanol,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ , a linha espectral do grupo  $\text{CH}_3$  é dividido num tripleto pela sua interação com os protões  $\text{CH}_2$  enquanto há uma divisão recíproca da linha  $\text{CH}_2$  num quarteto pela sua interação com os protões  $\text{CH}_3$ . A linha de OH é dividida num tripleto pelos protões  $\text{CH}_2$  e cada componente do quarteto  $\text{CH}_2$  é subdividida num duplete pelo protão OH.

No entanto, os núcleos quimicamente equivalentes (por exemplo, os três protões  $\text{CH}_3$ ) não produzem uma divisão observável uns com os outros. A ligação C-C aqui contribui para a ligação covalente dos electrões através dos quais estas interações spin-spin tomam lugar.

## **Sequências em espectroscopia**

Na altura do aparecimento da espectroscopia *in vivo* utilizava-se uma bobina de superfície para limitar o volume de interesse a partir do qual o sinal era eficazmente recolhido. A força do sinal dependia da distância em que o tecido se encontrava da bobina mas com uma gama espacial limitada. As bobinas de superfície foram usadas mais tarde somente como gradiente seletor de corte numa sequência conhecida como *Depth-Resolved Surface-coil* (DRESS).<sup>48</sup>

Os sinais eram recolhidos a partir de um único corte com DRESS e assim a seleção volumétrica era pouco definida, devido ao campo de RF não uniformemente distribuído na bobina de superfície. Outra desvantagem na utilização de bobinas de superfície para a localização espacial era o aumento da dificuldade na localização da origem do sinal a partir de um volume espesso dentro de um órgão. A técnica era também limitada na localização de sinal proveniente de órgãos superficiais.

Os métodos atuais dependem da rapidez da mudança dos gradientes magnéticos para obter a localização espacial. Um voxel é definido pela intersecção dos três planos ortogonais, em que cada plano é excitado por um impulso de seleção espacial aplicado na presença de um gradiente (tal como no caso da seleção de corte em Ressonância Magnética Convencional).

## **Aquisição na espectroscopia**

### Seleção da região de interesse

É importante assegurar que o voxel escolhido está colocado totalmente dentro da ROI para obter um espectro com boa qualidade que é representativo da patologia a ser avaliada.

Para avaliar o exato posicionamento onde se encontra o voxel escolhido na ROI é necessário realizar imagens nos planos dos três eixos (axial, sagital e coronal).

A qualidade espectral pode ser afetada se a colocação do voxel for feita em regiões com fraca homogeneidade de campo como interfaces de ar, osso, couro cabeludo e, no caso da espectroscopia ser feita para avaliação de uma patologia visível, o voxel deve abranger só o local da lesão sem incluir tecido cerebral normal.

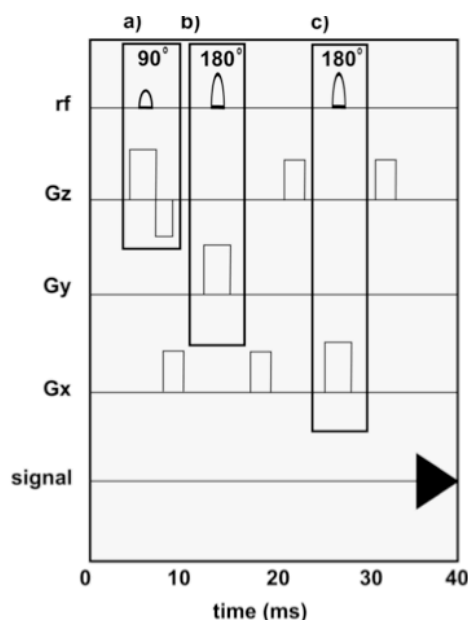
## **PRESS**

O método de aquisição utilizado para os estudos nesta dissertação foi *Point-RESolved Spectroscopy* (PRESS).

A aquisição PRESS é baseada numa sequência spin eco com um impulso de radiofrequência (RF) de  $90^\circ$  seguido de dois impulsos de RF de  $180^\circ$ , de modo a que o spin eco primário seja reorientado novamente pelo terceiro impulso.

O volume é excitado com um método passo a passo, no qual cada impulso tem um gradiente de seleção de corte em um dos três eixos principais (x, y, z). O impulso de RF inicial  $90^\circ$  é aplicado no eixo Z, seguido pelo primeiro impulso de  $180^\circ$  no eixo Y e, por último, o impulso de  $180^\circ$  no eixo X.

A ordem dos gradientes utilizados é dada como um exemplo e pode ser alterada.<sup>41</sup> O objetivo do gradiente de seleção de corte é assegurar que somente os prótons localizados na ROI sintam os três impulsos de RF. É importante mencionar que as contribuições para o sinal provenientes da fronteira da ROI ainda podem ocorrer. Esta é suprimida com a utilização de gradientes desfasados.



**Figura 2.6** – Esquema representativo da seleção do volume de interesse utilizando a sequência PRESS com a aplicação de 3 pulsos de RF simultaneamente. A) O primeiro pulso de RM  $90^\circ$  é aplicado no plano Z seguido por b) pulso de RF  $180^\circ$  aplicado no eixo Y e por fim c) pulso de RF  $180^\circ$  aplicado no eixo do X. Imagem retirada de <http://www.easymeasure.co.uk/>

O bloco de três impulsos ( $90^\circ$ - $180^\circ$ - $180^\circ$ ) é sucessivamente repetido para aumentar a média da relação sinal-ruído dos espectros. O número de aquisições é o número de vezes que a sequência é repetida (tipicamente 128). O tempo de repetição (TR) é o intervalo de tempo entre as repetições de toda a sequência de impulsos (ou seja, entre o primeiro  $90^\circ$  e o  $90^\circ$  subsequente). O tempo de eco (TE) é o tempo entre o impulso  $90^\circ$  e o aparecimento do sinal de eco (figura 2.6).

## Tempos de eco

Os metabolitos têm estruturas moleculares diferentes e os seus prótons residem em diferentes ambientes químicos. O sinal de MRS a partir dos metabolitos tem, portanto, taxas de recuperação (ou relaxação T1) e de decaimento (ou relaxação T2) diferentes. A recolha de dados de espectroscopia com diferentes tempos de eco fornece informações sobre um número diferente de metabolitos.

Uma aquisição com tempo de eco mais curto, tipicamente 20-40 ms, vai produzir mais informações no espectro porque um menor número de sinais de metabolitos vão ser deteriorados.

O espectro vai assim conter mais picos. Para uma aquisição *in vivo*, o problema com os espectros de TE curto é que eles podem se sobrepor e conter contribuições de lípidos e macromoléculas. A aquisição TE mais longa (tipicamente TE  $\geq 135$ ms), por outro lado vai resultar na deterioração significativa do sinal, resultando num menor número de picos no espectro. Lípidos e macromoléculas têm tempos de relaxação T2 curtos; os seus sinais vão decair, eliminando a sua contribuição no espectro. No entanto, potenciais picos de metabolitos de interesse são perdidos. Estes metabolitos muitas vezes têm um acoplamento J forte, sofrem interações destrutivas e os seus sinais têm deterioração.

A escolha do tempo TE numa aquisição depende do objetivo do exame. Nesta dissertação foram utilizados TE curtos que possibilitam observar metabolitos com tempos de relaxação T2 longos e curtos. Para além disso a aplicação de TE curtos permite obter uma melhor relação sinal-ruído.

## Shimming

O objetivo do *shimming* é a produção de um campo magnético homogêneo sobre a ROI. Este garante que os núcleos equivalentes experimentem o mesmo campo magnético. Com uma boa aplicação de *shimming* ocorre uma melhoria da resolução do pico e aumento da relação sinal-ruído. Por outro lado, com uma má aplicação do *shimming* ocorre um aumento da largura da linha espectral provocando assim um pico amplo.

Quanto maior for o valor da largura a meia altura, mais difícil é distinguir picos que se encontrem próximos, por exemplo, sobreposição dos picos de creatina e colina total.

## Água

Como a água é o composto mais abundante no tecido, a espectroscopia protónica por RM efetuada a quase todos os tecidos é dominada pela ressonância

de 4,7 ppm que se origina a partir de prótons da água. Esta é 10.000 vezes superior à dos restantes metabolitos vistos no espectro.

A largura a meia altura do pico da água é um bom marcador para determinar a homogeneidade do campo. Este pode ser utilizado com referência interna para a medição das concentrações absolutas dos metabolitos. Pode também ser utilizado para correção de distorções da forma da linha espectral bem como para ajustes do desvio da frequência entre vóxeis.

Embora a deteção de metabolitos seja possível sem supressão de água, o pico de água leva a distorções de base e sinais falsos devido à modulação do sinal induzida por vibração que faz a deteção de metabolitos não credíveis. A supressão do sinal da água elimina estes problemas, levando a uma deteção consistente e fiável de espectros de metabolitos.

O sinal da água pode ser eliminado através da utilização de diferentes parâmetros de relaxamento.

Os dois métodos mais vulgarmente utilizados são o desvio químico seletivo (CHESS) e técnica de eliminação da água pela Transformada de Fourier (WEFT).

O CHESS consiste na aplicação de um impulso de frequência seletiva 90° centrada na frequência de ressonância dos prótons da água. WEFT é uma sequência de pulso de recuperação inversão que se baseia na diferença do tempo de relaxação T1 da água (solvente) em comparação com a ressonância dos solutos.

Este é constituído por um impulso de 180°. Os impulsos em ambos os métodos são aplicados antes da implementação da sequência PRESS.

O rigor e fiabilidade da espectroscopia *in vivo* é altamente dependente da eficiência da supressão de água. A técnica utilizada nesta dissertação foi a VAPOR (*variable power and optimized relaxation delays*) que combina a supressão de água baseada em T1 e impulsos de RF com potência variável para fornecer excelente supressão de água com uma grande insensibilidade para com T1 e falta de homogeneidade do campo B1.<sup>43</sup> O princípio fundamental da supressão de água VAPOR é definir variações ideais de potência e atrasos no tempo no conjunto de vários impulsos.<sup>42</sup>

### **A aquisição de um espectro de água**

É aplicado um espectro adicional da água (espectro sem supressão de água) como referência interna para quantificação das intensidades de sinal dos metabolitos.<sup>44</sup>

O teor de água altera-se consoante a idade sendo gradualmente inferior com o aumento da idade.<sup>127</sup>

Também são observadas alterações do teor de água consoante a patologia, por exemplo os tumores cerebrais exibem um aumento do teor de água em comparação com tecidos saudáveis.<sup>45</sup>

### **Interpretação dos metabolitos medidos utilizando espectroscopia protónica**

A espectroscopia *in vivo* contém três componentes diferentes água, metabolitos, lípidos/macromoléculas.<sup>46</sup>

O espectro de espectroscopia protónica *in vivo* de um cérebro humano abrange dos 0,5 aos 9,0 ppm.

Os espectros protónicos são exibidos num gráfico xy. O eixo x horizontal representa os valores da frequência do desvio químico dos vários metabolitos numa dada amostra de tecido. As unidades dos desvios químicos podem ser apresentadas em Hz ou ppm. Hz é a unidade de frequência utilizada para a frequência a que os prótons precessão. Contudo esta difere consoante a intensidade do campo magnético dificultando a comparação de perfis espectrais. Para superar isto, as posições dos picos dos metabolitos são apresentadas em partes por milhão (ppm), uma escala independente da intensidade de campo.

No eixo vertical y está representada a amplitude relativa do sinal, ou concentrações para os vários metabolitos, isto é, a altura do pico reflete a quantidade do metabolito.

Os espectros são lidos da direita para a esquerda, os valores (ppm) no eixo X vão crescendo no mesmo sentido (ou seja, da direita para a esquerda).

Os metabolitos que podem ser identificados através de espectroscopia são dependentes do tempo de eco aplicado.

As concentrações de metabolitos normais no cérebro variam ligeiramente em diferentes faixas etárias.<sup>131</sup> O espectro resultante, adquirido a partir de um cérebro humano, consiste em cerca de 18-20 metabolitos e nove lípidos e componentes macromoleculares. Os perfis metabólicos podem sofrer modificações quando estamos na presença de patologia em comparação com um cérebro normal. Espectros de patologias distintas também podem ter perfis metabólicos distintos, com diferentes metabolitos e concentrações.<sup>47</sup>

## **2.4.6 Metabolitos**

### **Mio-inositol**

Entre os nove isómeros de inositol, mio-inositol (m-Ins) é a forma predominante encontrado no tecido. Muitas vezes visível num espectro adquirido

com um TE mais curto, o sinal pode conter pequenas contribuições de inositol monofosfato, polifosfatos de inositol e glicina.

Mio-inositol mostra quatro picos no espectro, dois dos quais se destacam: um dubleto de dubletos a 3,52 ppm e um tripleto a 3,61 ppm. Os outros dois incluem um tripleto em 3,27 ppm geralmente obscurecido pela colina, e outro em 4,05 ppm, que não é geralmente observado devido à supressão da água.<sup>52</sup>

A função de m-Ins não é clara, mas crê-se que desempenha um papel em vários sistemas neuronais de sinalização<sup>53,54</sup>, metabolismo do inositol ligada à membrana de fosfolípidos<sup>53</sup>, crescimento celular<sup>51</sup> e uma forma de armazenamento de glucose.<sup>77</sup> Não está presente em neurónios e tem sido proposto como um marcador de célula da glia.<sup>55</sup> Não tem capacidade em atravessar a barreira cérebro-sangue (BBB).

A quantidade de mio-inositol varia regionalmente, sendo menor na substância branca, e ligeiramente superior na substância cinzenta.<sup>56,57</sup> Normalmente as concentrações de m-Ins no cérebro humano normal variam de 3.8-8.1 mM.<sup>58,59</sup> Neste estudo a média dos valores do metabolito inositol em ratinhos normais foi de 4,218 para a região do hipocampo, 2,981 para a região do córtex pré-frontal e 2,926 para a região do estriado.

Os níveis aumentados têm sido associado com gliomas pontinos intrínsecos e difusos, diabetes e doença de Alzheimer, e diminuição dos níveis com tumores malignos<sup>60</sup> e acidente vascular cerebral.<sup>49</sup>

## **Colina**

Os metabolitos contendo colina incluem: glicerofosforilcolina (GPC), fosforilcolina (PCH) e colina livre. Eles contribuem para um pico proeminente em 3,2 ppm e picos secundários em 3,5 e 4,0 ppm. Muitas vezes não é possível separar as suas contribuições com espectroscopia protónica mas eles são distinguíveis com espectroscopia de fósforo.<sup>61</sup> Como por vezes a separação e distinção dos picos dos compostos de colina é difícil de efetuar, este conjunto é classificado como colina total (TCho).

As concentrações normais de colina total no cérebro humano são de cerca de 0,9-2,5 mM,<sup>59</sup> e é relatado que a sua concentração varia significativamente entre as diferentes regiões do cérebro, aumentando com a idade.<sup>49,52</sup> Neste estudo a média dos valores dos metabolitos Fosforilcolina e Glicerofosforilcolina em ratinhos normais foi respectivamente de 1,035 para a região do hipocampo, 0,913; 0,248 para a região do PFC e 1,297; 0,277 para a região do estriado.

A colina desempenha um papel na síntese de fosfolípidos que formam as membranas das células. A sua concentração aumenta com a síntese e destruição da membrana celular. Portanto, a colina é considerada como sendo um marcador de volume e integridade da membrana.

Porque não há mais Cho na substância branca do que na substância cinzenta, o nível de Cho está correlacionando com o grau de mielinização.<sup>53,56</sup>

No entanto, as mudanças são comumente associadas com alterações na composição da membrana, com níveis aumentados em tumores,<sup>60,62</sup> isquemia, traumatismos cranianos, inflamação, esclerose múltipla, doença de Alzheimer, e diminuição do seu nível em doença hepática.<sup>49,63</sup>

### **Creatina**

O sinal de creatina resulta de dois produtos químicos: creatina (Cr) e fosfocreatina (PCr) chamada de creatina total (tCr). Eles contribuem para dois picos muito próximos quase sobrepostos em 3,03 e 3,93 ppm.

Ela desempenha um papel no armazenamento anaeróbio e produção de energia nas células. Durante o processo de produção de energia, a creatina quinase catalisa a transferência reversível de fosfato inorgânico (Pi) da PCr e Adenosina difosfato (ADP) para Cr e Trifosfato de adenosina (ATP). Esta reação de Cr / PCr sustenta o consumo de energia nas células e facilita a transferência de ATP a partir da mitocôndria para locais onde a energia é necessária. tCr é por conseguinte um marcador do metabolismo energético. A síntese da creatina ocorre no rim e no fígado. As regiões com maiores quantidades de enzimas creatina quinase também têm altas concentrações de Cr e PCr. Concentrações mais elevadas destas enzimas têm sido relatadas em preparações de células de astrócitos e oligodendrócitos do que nos neurónios.<sup>64,65</sup>

Com efeito, o sinal de tCr foi referido como sendo superior na matéria cinzenta, 6,4-9,7 mM, relativamente à substância branca, 5.2-5.7 mM em humanos<sup>53,66</sup> O conteúdo tCr no cérebro humano varia entre 5.1-10.6 mM.<sup>58,59</sup> Tem um valor reduzido nas crianças e aumenta com a idade.<sup>49</sup> Neste estudo a média dos valores dos metabolitos Creatina e Fosfocreatina em ratinhos normais foi respectivamente de 3,463; 2,647 para a região do hipocampo, 2,089;2,681 para a região do PFC e 3,110;2,166 para a região do estriado.

Diminuição nos níveis de Cr tem sido observada em hipóxia, tumores e acidente vascular cerebral, e aumento em trauma e distrofia miotónica.<sup>50</sup>

## Glutamato e Glutamina

Para as intensidades de campos magnéticos utilizadas na clínica (tipicamente 1.5- 3,0 T), os sinais de Glutamato (Glu) e Glutamina (Gln) sobrepõem-se e são de difícil distinção e quantificação *in vivo*, devido a efeitos de acoplamento J fortes.<sup>49,52</sup> O Glu e a Gln são geralmente observados como uma sobreposição de ressonância complexa chamado Glx. O complexo Glx pode ser separado por edição espectral ou utilizando técnicas homonucleares de dissociação.<sup>68,69</sup> É também possível separar utilizando equipamentos de RM com intensidades de campo magnético mais elevadas<sup>70,71</sup> e, quando tal é possível, a ressonância de Glu ocorre entre 2,04-2,35 ppm e a de Gln entre 2,12-2,46 ppm.<sup>52</sup> Glu está presente em todas as células e é sintetizado a partir do precursor alfa-cetoglutarato no ciclo do ácido cítrico em mitocôndrias. Glu atua como principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central e assim é encontrado em concentrações mais elevadas em neurónios do que em células da glia. A sua concentração na matéria cinzenta é assim referida como sendo superior à da substância branca,<sup>53,56</sup> com concentração no cérebro de 6.0-12.5 mM em humanos.<sup>56,58,59</sup>

Gln por outro lado é um neurotransmissor inibitório predominantemente encontrado em astrócitos que contêm Gln-ligase. Devido à grande população de astrócitos no sistema nervoso central, a concentração de Gln na matéria cinzenta é mais elevada do que na matéria branca<sup>56</sup> variando entre 3.0-5.8 mM no cérebro humano.<sup>58,72</sup> Neste estudo a média dos valores dos metabolitos Glutamato e Glutamina em ratinhos normais foi respectivamente de 5,956;3,017 para a região do hipocampo, 7,454;2,549 para a região do PFC e 5,408;2,824 para a região do estriado.

A via de Glu/Gln é essencial para a desintoxicação de amoníaco no fígado; eles são, portanto, considerados em conjunto como aminoácidos neurotransmissores pois desempenham um papel na desintoxicação e regulação dos neurotransmissores. Se o fígado está comprometido, a desintoxicação amoníaco é realizada nos astrócitos pela enzima glutamina sintetase que combina amoníaco e Glu para produzir Gln. Por conseguinte, Gln é uma forma de armazenamento de Glu. Quando o ciclo de Glu/Gln é alterado com hiperamonemia o nível de Gln aumenta significativamente. Gln atua assim como um biomarcador da doença hepática e seus níveis podem ser monitorados no cérebro.<sup>89,57</sup>

O aumento das concentrações de Glu e Gln têm sido observados em isquemia grave, meningiomas, hipóxia e encefalopatia hepática<sup>49,75,76</sup> e sua diminuição na doença de Alzheimer.<sup>49</sup>

## **N-acetil aspartato**

N-acetil aspartato (NAA) é um aminoácido livre relativamente abundante no cérebro humano e contribui para o pico mais proeminente no espectro de próton a 2,01 ppm (singlete). NAA também tem ressonâncias menores resultantes de grupos do aspartato CH e CH<sub>2</sub> que contribuem para duplete-de-dupletos a 2,49, 2,67 e 4,38 ppm, mais um duplete dependente da temperatura da amida a 7,82 ppm.

Neste estudo a média dos valores do metabolito Aspartato em ratinhos normais foi de 1,836 para a região do hipocampo e 1,740 para a região do córtex pré-frontal.

Confinado na porção líquida do citoplasma,<sup>77</sup> que está localizada principalmente nos neurónios e dendritos do sistema nervoso central e periférico.<sup>52</sup> A concentração de NAA na matéria cinzenta é relatada como sendo mais elevada do que na substância branca.<sup>56</sup> NAA é um marcador neurotransmissor do funcionamento normal dos neurónios observado apenas no parênquima cerebral e tecido neuronal. No parênquima cerebral normal, a sua concentração depende da densidade e atividade funcional das células. A concentração no cérebro de NAA varia de 7.9-16.6 mM em humanos,<sup>52,58</sup> mas é baixo em lactentes e o seu aumento coincide com a mielinização.<sup>77</sup>

O grupo NAA contém, pelo menos, duas porções químicas: NAA e NAAG. NAAG consiste no ácido N- acetilaspártico (NAA) e ácido glutâmico acoplado através de uma ligação peptídea. NAAG está predominantemente nas células nervosas, mas varia regionalmente dentro do cérebro com concentrações entre os 0.6 e os 2.7 mM em humanos.<sup>78</sup>

O seu pico ocorre a 2.10 ppm, e sobrepõe-se ao grande pico do NAA em campos magnéticos de com baixa intensidade magnética. O pico de NAA contém, assim, contribuições de NAAG, que pode ser separada com campos magnéticos mais elevados.<sup>52</sup>

O conjunto formado por NAA e NAAG é chamado de NAA total (TNAA). Neste estudo a média dos valores dos metabolitos NAA e NAAG em ratinhos normais foi respectivamente de 4,426;0,877 para a região do hipocampo, 5,687;0,720 para a região do PFC e 4,867;0,770 para a região do estriado.

Devido à sua especificidade para os neurónios, NAA é geralmente considerado um marcador de densidade neuronal saudável.<sup>49</sup> Uma diminuição na intensidade do pico de NAA foi avaliada num certo número de distúrbios neurológicos incluindo esclerose múltipla,<sup>79</sup> isquemia,<sup>80</sup> traumatismo craniano agudo,<sup>81</sup> esquizofrenia,<sup>82,83</sup> inflamação<sup>49</sup> e tumores.<sup>60</sup> Aumento do NAA também tem sido relatado na doença de Canavan.<sup>79,84</sup>

## **Lactato**

Lactato é o produto final da glicólise anaeróbica, que exibe um dubleto a 1,31 ppm. O pico de lactato em espectroscopia é variável consoante os tempos de eco aplicados.

Com aquisições utilizando TE intermédios (135/144ms) o dubleto aparece invertido abaixo da linha de base devido ao acoplamento J. Mas com tempos de eco muito curtos ou muito longos (30 ou 288 ms) o dubleto surge acima da linha de base.

Através de tempos de eco mais curtos é difícil distinguir o lactato de lípidos e macromoléculas e assim, devido a esse facto, o lactato é habitualmente estudado com tempos de TE mais longos.<sup>86</sup>

Em circunstâncias normais, o lactato está presente apenas em quantidades diminutas no cérebro de humanos (cerca de 0,4 mM<sup>59</sup>), e só se torna visível por MRS em tecidos patológicos que recorrem a respiração anaeróbica. A sua presença indica que a respiração normal (oxidação aeróbia) está afetada e os carboidratos estão a ser catabolizados por via anaeróbia. Situações de hipoxia originam aumento do lactato por ativação da via anaeróbia e degradação da glicose. Também se encontra alterado em convulsões, distúrbios metabólicos com acumulação de macrófagos (áreas de inflamação aguda). O lactato é portanto um marcador de metabolismo anaeróbio. A concentração de lactato aumenta também em casos de acidente vascular cerebral, traumatismo, tumores, tecido necrótico e massas quísticas.<sup>63</sup> Ativação funcional e hiperventilação também têm sido sugeridas como causas para pequenos aumentos do lactato a nível cerebral.<sup>87,88</sup>

Neste estudo a média dos valores do metabolito Lactato em ratinhos normais foi de 2,222 para a região do hipocampo, 1,803 para a região do córtex pré-frontal e 5,168 para a região do estriado.

## **Alanina**

A alanina (Ala) é um dos compostos examinados na espectroscopia de RM. Ala tem um desvio químico de 1,48 ppm com um dubleto. Apresenta um pico invertido devido ao acoplamento J para com TE intermédio 135-144ms. Tem um papel no ciclo do ácido cítrico e encontra-se elevada em meningiomas, abscessos piogénicos e glioblastomas.<sup>92</sup> Neste estudo a média dos valores do metabolito Alanina em ratinhos normais foi de 1,355 para a região do hipocampo, 1,195 para a região do córtex pré-frontal e 2,054 para a região do estriado.

## **Taurina**

A taurina é visualizada a 3,25 ppm com um tripleto a 3,43 ppm através de espectroscopia protónica.

É um ácido orgânico cujo objetivo é desempenhar um papel na regulação osmótica e estabilização da membrana. Se o tempo de eco for muito curto pode ser difícil distingui-lo do metabolito mio-inositol e com TE médio/longo tem pouca relação sinal-ruído.<sup>92</sup>

Neste estudo a média dos valores do metabolito Taurina em ratinhos normais foi de 7,400 para a região do hipocampo, 6,539 para a região do córtex pré-frontal e 10,276 para a região do estriado.

Altas concentrações de taurina são observadas em meduloblastomas e adenomas hipofisários.<sup>92</sup>

## **Glutationa**

A glutatona (GSH) na sua forma reduzida primária é um antioxidante importante do sistema nervoso central. Uma vez que as ressonâncias de todas as três porções (glicina, cisteína e glutamato de GSH) se sobrepõem a outros metabolitos, é difícil fazer a medição de GSH não oxidado usando espectroscopia protónica de ressonância magnética (MRS).

As ressonâncias de prótons do radical CH<sub>2</sub> da cisteína da GSH são de 2,95 ppm, e são escolhidas como as ressonâncias alvo, necessitando de ser distinguidas da ressonância singlete proeminente da creatina a 3,02 ppm.<sup>91</sup> Neste estudo a média dos valores do metabolito Glutationa em ratinhos normais foi de 1,410 para a região do hipocampo, 0,990 para a região do córtex pré-frontal e 0,941 para a região do estriado.

## **GABA**

Ácido gama-aminobutírico (GABA) é visualizado em 1,9; 2,3; 3,0 ppm, mas 2,3 ppm deve ser a primeira escolha porque os valores de 1,9 e 3,0 ppm se sobrepõem a outros metabolitos dominantes (glutamato e glutamina). GABA é um neurotransmissor inibitório principal do sistema nervoso central. Neste estudo a média dos valores do metabolito GABA em ratinhos normais foi de 1,808 para a região do hipocampo, 1,996 para a região do córtex pré-frontal e 2,425 para a região do estriado. As alterações na concentração de GABA têm sido relatadas em vários casos clínicos. A concentração de GABA apresenta-se diminuída na epilepsia, autismo, esquizofrenia e no síndrome de Stiff-Person.<sup>93</sup>

## **Glicose**

O metabolismo da glicose é essencial para o normal funcionamento do cérebro e está estabelecido que um fornecimento contínuo de glicose do sangue é necessário para um normal metabolismo cerebral. A glicose é a fonte primária de energia na maioria dos organismos onde é usado respiração aeróbia e anaeróbia. Uma alteração ou o comprometimento no consumo de glicose está associado a várias condições patológicas.

O pico da glicose pode ser visualizado através de espectroscopia protónica aos 3,43 ppm e 3,8 ppm. No entanto este pode estar sobreposto com outros metabolitos como o mio-inositol e taurina. Neste estudo a média dos valores do metabolito Glicose em ratinhos normais foi de 1,279 para a região do hipocampo, 1,369 para a região do córtex pré-frontal e 1,246 para a região do estriado.

Pensa-se que as concentrações de Glc no tecido cerebral se encontram diminuídas em lesões malignas, onde Glc é rapidamente utilizado para facilitar a divisão celular e crescimento tumoral. Aumentos na concentração de glicose têm sido relatados em casos de diabetes mellitus e encefalopatia hipóxica.<sup>94</sup>

### **2.4.7 Modelo Animal transgênico**

Foram utilizados ratinhos transgênicos ou de tipo selvagem C57 BL/6 com ataxia do tipo 3 [Q69]. Esta é a estirpe de ratinho mais utilizada devido à facilidade reprodutível e robustez. São efetuadas alterações genéticas para a sua utilização como modelos de doenças humanas.

Os animais foram alojados numa sala com temperatura controlada mantido um ciclo de 12 horas de luz/12 horas de escuro. Comida e água foram fornecidas *ad libitum*. As experiências envolvendo ratos foram previamente aprovadas pela Organização Responsável pelo Bem-Estar dos Animais da Faculdade de Medicina e Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra (ORBEA e FMUC/CNC, Coimbra, Portugal) e foram realizadas em conformidade com a diretiva da Comunidade Europeia (86/609/CEE) para o cuidado e uso de animais de laboratório. Os investigadores receberam treino adequado (curso certificado FELASA) e certificação das autoridades portuguesas (Direção Geral de Veterinária de Lisboa, Portugal) para realizar as experiências.

## Capítulo 3 - Metodologia

### 3.1 Desenho do estudo

O estudo foi realizado no 3º Semestre do mestrado de Radiações Aplicadas às Tecnologias da Saúde de Lisboa, com início em Julho de 2015 e término em Maio de 2016.

O local da sua realização foi o Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde com a respectiva autorização do Diretor, Prof. Doutor Miguel Castelo Branco.

As imagens foram adquiridas num equipamento de Ressonância Magnética animal de pequeno porte *BioSpec 94/20 Bruker* de 9.4T. Para realização dos exames radiológicos foi necessário anestésiar os ratinhos, efetuar monitorização cardíaca, controle da temperatura e manutenção respiratória durante todo o procedimento.

O pós processamento das imagens T2 foi efetuado no *MATLAB* e para o pós-processamento da espectroscopia protónica utilizou-se o programa *LC Model*.

A análise estatística dos dados recolhidos foi efetuada com o programa estatístico *SPSS® (Statistic Package for the Social Sciences)*.

### 3.2 Caracterização da amostra

Neste estudo foram incluídos 29 animais transgénicos sendo que 10 eram do género masculino e 19 eram do género feminino.

A média de peso dos ratinhos era de 19 gramas sendo que o valor máximo era de 26 g e o mínimo de 14 gramas.

Foram incluídos 29 animais transgénicos para análise por Ressonância Magnética. Desses, 14 animais pertenciam ao grupo de controlo e 15 pertenciam ao grupo de ratinhos com a doença de Machado Joseph.

### 3.3 Recolha de dados

A recolha de dados foi efetuada durante 9 meses (Maio de 2015 até Janeiro de 2016) com o equipamento de Ressonância Magnética animal *Bruker – BioSpec 94/20 USR*.

### 3.4 Equipamento utilizado

#### 3.4.1 *Bruker* Ressonância Magnética pré-clínica - *BioSpec 94/20 USR*

A aquisição das imagens *in vivo* foi efetuada com um equipamento de ressonância magnética animal de pequeno porte *BioSpec 94/20 USR* de 9,4T (figura 3.1).



**Figura 3.1-** Equipamento RM animal 9,4T *BioSpec 94/20 USR*

Esta linha *BioSpec* foi desenhada com o intuito de introduzir no mercado da imagiologia equipamentos de RM pré-clínicos e moleculares. Este equipamento combina sondas de RM criogenicamente arrefecidas para um excepcional aumento de sensibilidade (*MRI CryoProbe*), juntamente com magnetos (*Ultrashield Refrigerated*) com intensidades de campo elevadas que garantem alta resolução espacial *in vivo*.

Especificações técnicas:

**Tabela 3.1-** Especificações técnicas do equipamento RM linha *BioSpec 94/20 USR*

<b>Peso</b>	120 kg
<b>Carga máxima (peso do animal)</b>	5 kg
<b>Tipo de magneto</b>	Ultra blindado e refrigerado
<b>Frequência de ressonância 1H</b>	400,3 MHz
<b>Diâmetro do magneto</b>	210 mm
<b>Gradiente</b>	440 mT/m @ 200 A (300 V)
<b>Conjunto shim</b>	Z0, X, Y, Z, Z2, ZX, ZY, X2-Y2, 2XY, Z3, Z4
<b>Número de canais de transmissão</b>	1 x 1H/19F
<b>Potência de transmissão</b>	1000 W
<b>Número de canais de recepção</b>	1 x 1H/ 19F
<b>Bobina de RF padrão</b>	Bobina de transmissão de volume, ID=72 mm
<b>Precisão de posicionamento</b>	< 1mm (absoluto) <0,1 mm (relativo)

<b>Blindagem RF</b>	< -55 dB (a 200 MHz com gaiola de Faraday montada)
<b>Fonte de alimentação</b>	115/235 VAC, 50/60 Hz
<b>Fusível</b>	4 AT na fonte de alimentação <i>autopac</i>
<b>DC saída da fonte de alimentação</b>	48 V DC

A antena transmissora utilizada foi a *T12054V3* (*Bruker Biospin, Ettlingen, Germany*), uma antena cruzada de configuração padrão *Bruker* utilizando uma bobina de volume para excitação. Esta bobina de sinergia permite máxima sensibilidade com menores tempos de exame (figura 3.2).



Figura 3.2 - Antena transmissora *Bruker* e cama para ratinho

Tabela 3.2- Especificações técnicas da antena *T12054V3*

<b>Dimensões</b>	86 mm diâmetro interno 112mm diâmetro externo 275 mm comprimento
<b>Peso</b>	Aproximadamente 2,4Kg
<b>Frequência (1H)</b>	400,3 MHz
<b>Distância ao centro</b>	192 mm a partir da placa frontal da bobina
<b>Potência máxima</b>	2000 Watt para um pulso máximo de comprimento de 5ms
<b>Equipamento de fixação</b>	Fixação pneumática para ser usada somente quando a bobina esta dentro do gradiente
<b>Carga típica</b>	Carga corporal do ratinho (450g)
<b>Dissociação ativada</b>	Sim
<b>Polarização (1H)</b>	Circular
<b>Modo operacional</b>	Transmissor/recetor
<b>Homogeneidade</b>	+/- 7% transversal para d 58 mm 30% longitudinal para i 65 mm

A antena recetora de superfície para ratinho com detecção de sinais em quadratura (*Bruker Biospin, Ettlingen, Germany*) é a *T20007V3* (*Bruker Biospin, Ettlingen, Germany*) (figura 3.3).

**Tabela 3.3- Especificações técnicas da antena de superfície T20007V3**

<b>Dimensões</b>	104 x60 x 24 mm
<b>Comprimento da estrutura de RF</b>	15 x 25 mm
<b>Distância ao centro</b>	13 mm
<b>Peso</b>	520g
<b>Frequência</b>	400,3 MHz
<b>Carga típica</b>	Cabeça do ratinho (cerca de 40g)
<b>Polarização</b>	Circular
<b>Modo operacional</b>	Apenas recetor
<b>Homogeneidade</b>	Esquerda – direita < 10%



**Figura 3.3- Antena de superfície T20007V3**

### 3.5 Procedimento do exame:

#### 3.5.1 Anestesia

Os animais foram anestesiados com isoflurano (1-2%) através de um sistema *E-Z SA800, Euthanex, Palmer, USA* (figura 3.4). O isoflurano é um medicamento anestésico líquido, não inflamável, para uso em anestesia geral inalatória, por meio de um equipamento que o transforma em vapor. Consiste de um líquido estável, claro, incolor sem aditivos ou conservantes químicos. É o agente anestésico mais seguro e efetivo disponível em veterinária. A máquina de anestesia geral volátil é composta de duas unidades: a alimentação de gases frescos que transportam o oxigênio e os vapores anestésicos e o circuito anestésico propriamente dito.

Manteve-se uma constante monitorização da temperatura, (37° +/- 1°) com o equipamento *Haake SC 100, Thermo Scientific, USA*, e manutenção da função respiratória entre os valores 60-80 respirações por minuto através do equipamento *1030, Small Animals Instruments Inc., NY, USA*. (figura 3.5).



Figura 3.4 – Sistema de anestesia EZ-SA800

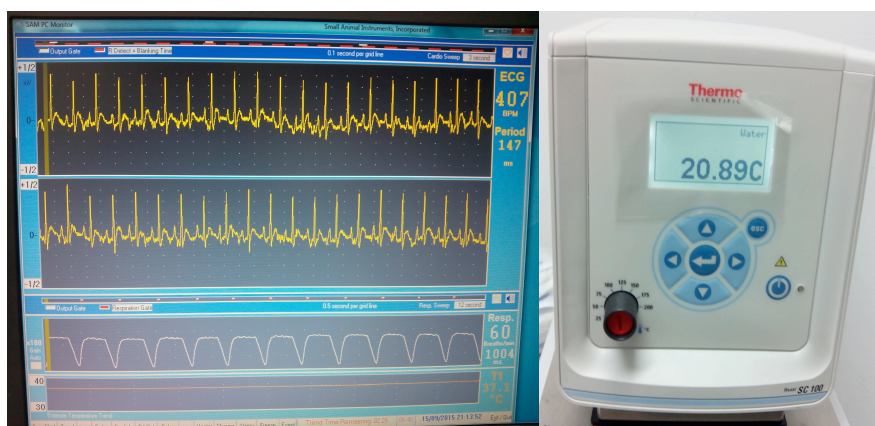


Figura 3.5- Equipamento de monitorização de temperatura Haake SC 100 e de respiração SAI Inc.

### 3.5.2 Posicionamento do animal

- Após a administração da anestesia inalatória é posicionado o ratinho na cama animal.
- Coloca-se o sensor que permite monitorizar a função vital do animal bem como o sensor de temperatura corporal. Ambos são ligados à unidade de monitorização presente no gabinete de trabalho.
- Coloca-se o cobertor de aquecimento (*Makrolon*) sobre o animal. É recomendado colocar o cobertor fora da zona que vai ser avaliada.
- Encaixa-se a cama animal com o animal na base rolante deslizante que está montada na mesa magnética.
- Liga-se o cobertor de aquecimento os tubos de circulação da água. (água destilada).

- Liga-se o termóstato para observar a temperatura corporal do animal. Ajusta-se a temperatura até ao valor de equilíbrio desejado (limite do ajuste de temperatura: 20 – 45° C).
- A inserção e ligação da bobina deve ser efetuada sempre que se muda a bobina de RM. Deve-se inserir a cama do animal no equipamento no carril a partir da extremidade do magneto.
- O centro de qualquer antena transmissora de RM e/ou bobina recetora deve ser alinhado com a posição central do magneto. Devem-se utilizar os dispositivos específicos de posicionamento/alinhamento ou etiquetas para alcançar a posição correta.
- Move-se o animal para o interior do magneto e inicia-se a aquisição (figura 3.6).



Figura 3.6- Animal anestesiado posicionado na cama com cobertor de aquecimento

### 3.5.3 Preparação da sequência de pré-aquisição

- **Configuração da frequência de referência:**

A água e a gordura contribuem com sinais fortes na ressonância. Têm frequências de ressonâncias diferentes, separadas aproximadamente por 250Hz para um campo B<sub>0</sub> de 1,5T. Quando a frequência de referência da aquisição está programada para a água, o sinal é essencialmente detetado como um nível constante. A gordura, com uma frequência ligeiramente diferente, alterna entre estar em fase e fora de fase com a água. A frequência de precessão da gordura em fase e fora de fase com a da água ocorre em diferentes instantes temporais (1,8 e 4,2 ms). Para pixéis que contenham uma mistura de água e gordura, a imagem obtida com tempos de eco fora de fase e em fase têm sinais escuros e claros respectivamente na imagem.

- **Shimming interativo:**

Para melhorar a homogeneidade do campo magnético de base gerado por ressonância magnética, um método de *shimming* interativo inclui os passos de produção de uma sequência de impulsos sob a forma de um conjunto de impulsos de gradiente bipolar no volume a estudar, e inserindo sinais de eco que são adquiridos numa matriz de medição. Um coeficiente de correlação dos sinais de eco de pelo menos uma parte das linhas da matriz de medição é formado tendo em conta a linha de referência. A corrente de *shimming* atravessa pelo menos uma bobina de *shimming* e depois é variada de forma a causar um aumento do coeficiente de correlação. Estas etapas são repetidas até que o coeficiente de correlação atinja um valor selecionado que corresponda a uma boa homogeneidade do campo.

- **Configuração da potência de referência TX:**

Como os pacientes variam muito em tamanho e forma, cada pessoa muda a impedância das antenas de transmissão/recepção ligeiramente. Para a transferência de energia ideal entre a bobina e o paciente (em ambos os sentidos), a impedância da bobina de RF deve ser combinada com a impedância da linha de transmissão (os fios que ligam o amplificador RF e a bobina).

Se a correspondência de impedância não for feita, uma grande fracção da potência de RF gerada pelo amplificador não vai ser transmitida para o paciente mas sim vai ser reflectida de volta para a interface da bobina-linha de transmissão.

Para garantir uma boa correspondência e eficiente transferência de potência de RF, os circuitos de aquisição monitorizam o rácio entre a transferência enviada e reflectida da potência de RF enquanto a capacidade é ajustada eletronicamente na interface de bobina-linha de transmissão. Quando uma boa correspondência de impedância é obtida a potência de RF reflectida é minimizada.

- **Configuração do ganho do recetor:**

Este passo de calibração envolve o ajuste do ganho do amplificador de recepção no que diz respeito ao sinal máximo de RM que ocorre durante a aquisição de imagem. Se o valor de atenuação estiver muito baixo (ou seja, o ganho do recetor está muito alto), o sinal vai sobrecarregar o conversor analógico para digital provocando recorte dos dados. Uma vez que os maiores picos do sinal de RM são tipicamente de codificação de fase de baixa ordem que se encontram no centro do espaço k, o recorte dos dados irá afectar o contraste da imagem. Se o atenuador de

recepção está muito alto, então o ganho do recetor será insuficiente, e o ruído na imagem aumentará.

A aquisição calibra automaticamente a atenuação do recetor pela execução de uma sequência de impulsos similar ao especificado para a imagem latente, exceto se o gradiente de codificação de fase estiver definido para zero (quando este é zero o sinal é máximo). Após a atenuação do recetor ser definida, pode-se começar a executar a aquisição no paciente.

- **Mapa  $B_0$  para espectroscopia protónica**

Para calcular as diferenças nas configurações de *shim*, é necessário obter um mapa preciso do efeito de cada *shim* no campo  $B_0$  como uma função da coordenada Z. É necessário também saber quantas diferenças em Hz são criadas no campo para cada posição da amostra alterando o *shim* em Z de cada unidade +1 DAC (unidades de *shim* são chamadas de unidades DAC porque são números inteiros que impulsionam o conversor analógico para digital a produzir uma corrente analógica na bobina de *shim*).

O *shim* pode ser mapeado mudando cada *shim* por uma quantidade significativa e remapeando o campo. Subtraindo esse mapa de campo a partir do mapa obtido antes das alterações dos valores de *shim* podemos saber exatamente o efeito produzido por cada 100 unidade de mudança das configurações de *shim*.

### 3.5.4 Protocolos de sequências, aquisição T2

Na sequência RARE (*Rapid Acquisition with Refocused Echoes*) também conhecida como RSE (*Rapid Spin Echo*) com ponderação T2, foram adquiridas imagens em 3 planos, sagital, coronal e axial.

**Tabela 3.4- Protocolo sequência T2 RARE**

	Sagital	Coronal	Axial
TR	2500 ms	2500 ms	3800 ms
TE	33 ms	33 ms	33 ms
Averages	6	6	10
Tamanho dos pixéis	0,0781mm x 0,0781mm	0,0781mm x 0,0781mm	0,0781mm x 0,0781mm
Espessura de corte	0,5 mm	0,5 mm	0,5 mm
Espaçamento entre pixéis	Sem espaçamento (volume total da cabeça 256 pixéis x 256 pixéis x14 cortes)	Sem espaçamento (volume total da cabeça 256 pixéis x 256 pixéis x14 cortes)	Sem espaçamento (volume total da cabeça 256 pixéis x 256 pixéis x34 cortes)
Tempo do scan	8 min	8 min	20 min

### 3.5.5 Protocolo Espectroscopia protónica

Os dados de espectroscopia foram recolhidos num volume de interesse colocado no estriado direito, hipocampo e córtex pré-frontal.

**Tabela 3.5- VOI Espectroscopia**

	VOI	V <sub>t</sub>
<b>Estriado direito</b>	1,8x1,8x1,6 mm <sup>3</sup>	4,32 mm <sup>3</sup>
<b>Hipocampo</b>	2,1x1,3x1,3 mm <sup>3</sup>	3,55 mm <sup>3</sup>
<b>Córtex pré-frontal</b>	2,0x1,0x2,0 mm <sup>3</sup>	4,00 mm <sup>3</sup>

Foi utilizada uma aquisição rápida multicorte com melhoramento do relaxamento, (RARE) em três planos ortogonais (axial, coronal e sagital) com os seguintes parâmetros.

**Tabela 3.6- Protocolo Espectroscopia RARE**

<b>TR</b>	2500 ms
<b>TE</b>	33 ms
<b>Tamanho da Matriz</b>	256 × 256
<b>FOV</b>	20 × 20 mm <sup>2</sup>
<b>Cortes</b>	22
<b>Espessura de corte</b>	0,5 mm
<b>Average</b>	1
<b>Tempo de aquisição</b>	1 min e 20 sec

O mapa de B<sub>0</sub> foi adquirido e *MAPSHIM* foi utilizado para ajustar automaticamente o *shim* das bobinas de 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> ordem com correção iterativa.

Bandas de linhas espectrais da água foram obtidas para o estriado, hipocampo e córtex pré-frontal com valores em torno de 13-18 Hz.

A sequência PRESS (*Point resolved spectroscopy*) foi utilizada em combinação com supressão do volume exterior e supressão da água, (VAPOR - *Variable Power RF pulses with optimized relaxations delays*).

**Tabela 3.7- Protocolo sequência PRESS**

<b>TR</b>	2500 ms
<b>TE</b>	16,225 ms
<b>Averages</b>	720,3
<b>Flip Angles</b>	90°, 142°, 142°
<b>Largura de banda</b>	5000 Hz
<b>Número de pontos adquiridos</b>	2048
<b>Resolução espectral</b>	1,22 Hz/pt
<b>Tempo de aquisição</b>	30 min

Por cada animal foi efetuada uma aquisição sem supressão de água imediatamente antes da aquisição do espectro com supressão de água.

**Tabela 3.8- Protocolo aquisição sem supressão de água**

<b>TR</b>	2500 ms
<b>TE</b>	16,225 ms
<b>Averages</b>	16
<b>Tempo de aquisição</b>	40 sec

### 3.6 Análise da imagem e pós-processamento

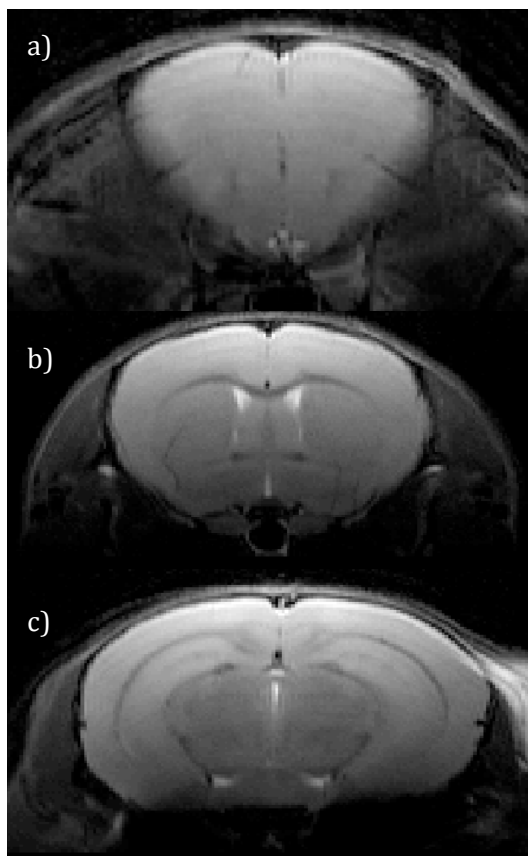
#### 3.6.1 Protocolo medição volumétrica

Antes de realizar a medição volumétrica foi efetuada uma investigação dedicada ao cérebro de ratinhos, regiões cerebrais de interesse e seus bordos. Para isso foi utilizado o *website* de exibição de dados de imagem cerebral *Scalable Brain Atlas*.

Para evitar erros sistemáticos, a análise volumétrica foi efetuada sem o conhecimento do grupo a que cada ratinho pertencia (grupo de controlo ou doente). Esses dados permaneceram ocultos também durante a análise estatística.

Para a análise volumétrica das estruturas do cérebro as imagens foram pré-processadas e segmentadas no *MATLAB R2012b*. Durante o pré-processamento foram seguidas as seguintes etapas:

- a) Correção da sensibilidade da antena: as correlações foram implementadas usando curvas de intensidade a partir de imagens ponderadas em T2 obtidas por um fantoma homogêneo (fantoma cilíndrico com 1,5cm de diâmetro e 3,8cm de comprimento composto por água) e adquiridas com a mesma configuração da bobina do sistema;
- b) As intensidades cerebrais foram normalizadas;
- c) As estruturas de interesse foram segmentadas utilizando um método manual de detecção de contornos com base na observação de atlas cerebrais de modelos animais;
- d) O software faz uma junção da segmentação para determinar o volume total da estrutura;
- e) Os valores de volume foram obtidos multiplicando o número de *voxels* marcados como pertencendo a cada estrutura de interesse, pela dimensão do voxel.



**Figura 3.7-** Imagens de RM ponderadas em T2 cortes axiais utilizadas para efetuar a medição volumétrica  
a)Córtex pré-frontal, b)Estriado, c)Hipocampo

### 3.6.2 Pós-processamento espectroscopia

Os espectros de hidrogênio foram salvos no formato FID, corrigidos para desvio de frequência e efeitos de correntes *Eddy* residuais utilizando o sinal da água como referência.

Em seguida os dados foram analisados usando o software *LCModel*. A análise com o *LCModel* calcula o melhor ajuste com o espectro adquirido, como uma combinação linear de modelos de espectros de metabolitos cerebrais.

O critério de limite inferior *Cramer-Rao* (CRLB) foi utilizado como uma medida de fiabilidade da aparente quantificação das concentrações do metabolito. As concentrações dos metabolitos com CRLB superior a 24% não foram incluídas na análise. Os resultados são dados em relação ao teor de água no tecido. A qualidade espectral foi avaliada através de inspeção visual da relação sinal-ruído que foram fornecidas pelo *LCModel*.

### 3.7 Softwares utilizados

#### 3.7.1 Scalable Brain Atlas

É um serviço *web* que permite acesso unificado a uma larga coleção de atlas de modelos cerebrais de diferentes espécies. Dispõe de 20 modelos atlas para seis espécies. Os atlas utilizados nesta dissertação foram correspondentes a ratinho:

- *Waxholm Space for the mouse* (2012) que permite ver cortes axiais adquiridos num equipamento de RM 9,4T *General Electric Medical Systems 12,4X*. As imagens T1 foram adquiridas com uma sequência Spin Eco (TR:50ms, TE: 5,1ms). As imagens T2 foram adquiridas com a sequência multi eco *Carr-Purcell-Meiboom-Gill* (TR:300ms, TE: 7,5 até 60ms). As imagens T2\* foram adquiridas com uma sequência gradiente eco com 45° (TR:50ms, TE: 4,3ms). As imagens com corpúsculos de *Nissl* (cortes a 21µm com coloração de *Nissl* digitalizado a uma resolução de 9,9 µm);
- *Allen Mouse Brain volumetric atlas* que permite ver em cortes axiais, com coloração de *Nissl* e em 3D interativo. Este Atlas foi criado pelo *Allen Institute for Brain Science*.

#### 3.7.2 RadiAnt DICOM Viewer 2.2.9

Antes de efetuar a correção da falta de homogeneidade e normalização das imagens é necessário utilizar um software próprio para imagens DICOM. Através desse software foram examinadas as sequências de imagens e identificado o ponto mais superior da cabeça do ratinho em pixels que irá coincidir com a superfície interna da antena. Esse dado será necessário posteriormente para no MATLAB se executar o pós-processamento das imagens T2.

#### 3.7.3 MATLAB (MATrix LABoratory) R2012b

É um software interativo que permite efetuar análise numérica, cálculo com matrizes, processamento de sinais e construção de gráficos, entre outras funções. O elemento básico de informação do *Matlab* é uma matriz que não requer dimensionamento. Esse sistema permite a resolução de muitos problemas numéricos em apenas uma fração do tempo que se gastaria para escrever um programa semelhante em linguagem Fortran, basic ou C. Além disso, as soluções

dos problemas são expressas no *Matlab* quase exatamente como elas são escritas matematicamente.

Após a análise das imagens através do *RadiAnt DICOM Viewer 2.2.9* é necessário indicar o ponto mais superior da cabeça do ratinho num plano sagital que irá coincidir com a superfície interna da antena.

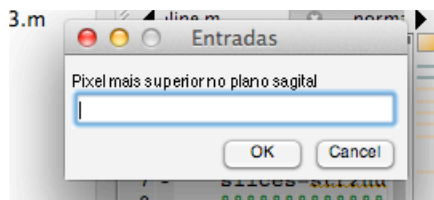


Figura 3.8 – Pixel mais superior no plano sagital

O segundo passo é a compensação da variação de intensidade causada pela antena de superfície no qual deve-se indicar o diretório das curvas de intensidade, o número de cortes e o ponto mais superior da cabeça do ratinho.

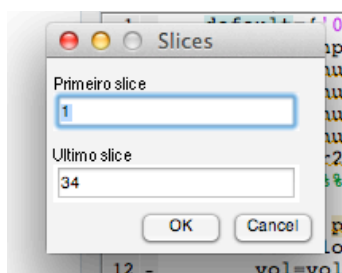


Figura 3.9 – Número de cortes

Posteriormente é necessário verificar qual é a intensidade máxima da sequência após retirar os *outliers*. A escala de cinzas deve estar apropriada para efetuar a segmentação.

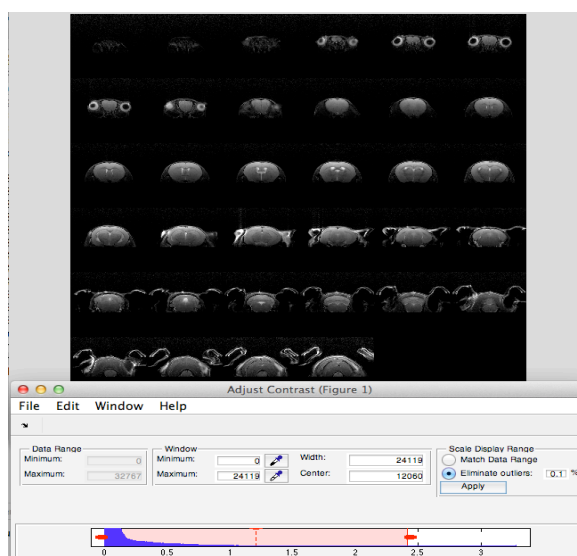


Figura 3.10 - Ajuste do contraste da imagem

Por fim é necessário realizar a normalização das imagens para um nível de intensidade entre os 0-7000 e deve-se ter em conta o valor máximo de entrada medido no passo anterior. O nível de intensidade foi escolhido a partir de uma técnica de experimentação. Deste modo a escala de cinzentos foi adaptada para uma faixa que permita uma melhor visualização do cérebro do ratinho.



Figura 3.11 - Ajuste de intensidades

É efetuado a segmentação de forma manual através do *Matlab* tendo em conta os contornos das estruturas a avaliar. Ao longo dos 34 cortes é necessário delinear os contornos das estruturas de interesse e após essa tarefa é nos dado o valor do volume em  $\text{mm}^3$  através da junção das segmentações de todos os cortes.

O resultado final após segmentação manual de todos os cortes para cada uma das regiões cerebrais esta apresentado na figura 3.12.

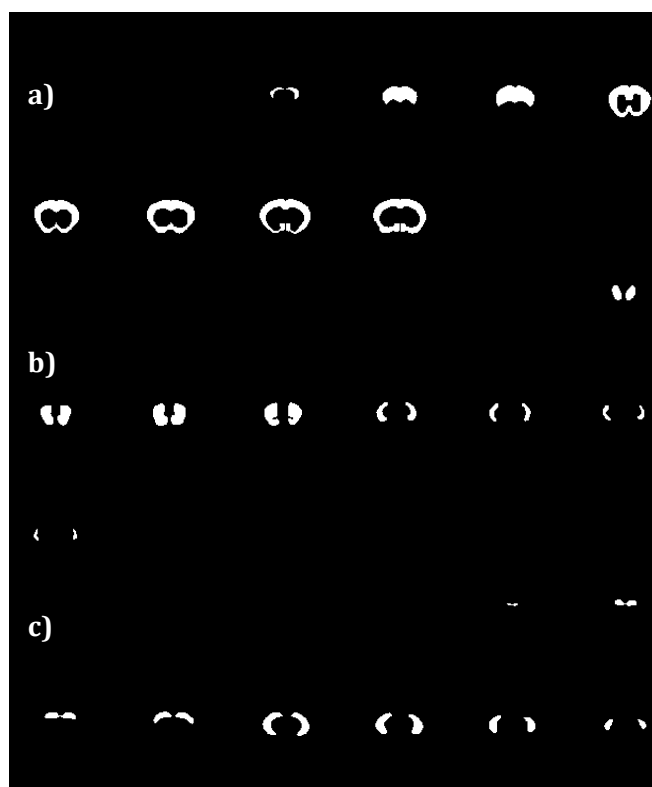


Figura 3.12 – Resultado final após medição volumétrica a) Córtex pré-frontal b) Estriado c) Hipocampo

### 3.7.4 LC Model

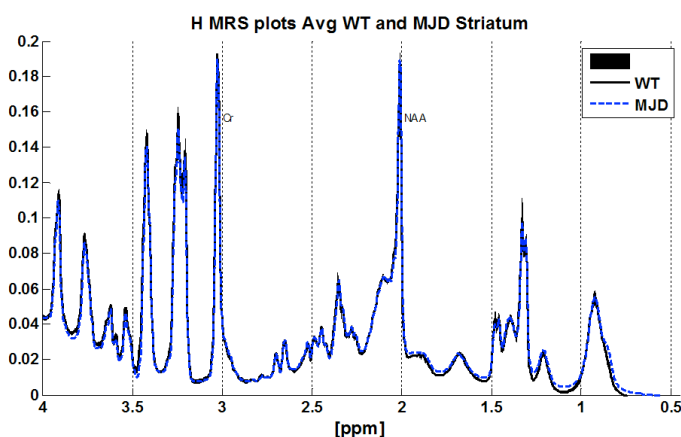
O *LCModel* é um software habitualmente utilizado para o processamento de espectros protónicos. É um método de análise de espectros *in vivo* a partir de tecido cerebral como uma combinação linear de modelos *in vitro* a partir de espectros de soluções metabólicas individuais.

Os espectros de modelo completo em vez de ressonâncias individuais são utilizados a fim de incorporar o máximo de informação prévia para a análise.

Utilizou-se um algoritmo de regularização restrita para encontrar o melhor compromisso entre a linha de base e a linha de contorno em conformidade com os dados. O método utiliza o padrão espectral determinado experimentalmente de cada metabolito sem mais análise.

*LCModel* é automático (não interativo) sem entrada subjetiva. São obtidos os resultados de estimativas de probabilidade máximas de concentrações dos metabolitos e suas incertezas (limites inferiores – *Cramér-Rao*).

As análises obtidas pelo *LCModel* abrangem espectros de RM com campos de 1,5T a 9,4T e uma vasta gama de sequências.



**Figura 3.13** – Espectro médio de animais transgênicos com a doença de *Machado Joseph* e do Grupo de Controlo para a região do estriado.

## 3.8 Ferramentas de análise estatística

### 3.8.1 Software estatístico para as ciências sociais – SPSS (Statistical Package for the Social Sciences)

A análise estatística dos dados foi efetuada através do software SPSS 16.0 (Lançamento 16.0.1 – Novembro 15, 2007; IBM; Estados Unidos) tendo em conta os dados recolhidos no equipamento de RM animal *Bruker* 9,4T, e processados com *MATLAB* e *LCModel*.

A caracterização e descrição da amostra foram efetuadas através de medidas de tendência central e de dispersão. A análise de relações e associações ocorreu mediante a subordinação dos testes estatísticos, considerando que um valor de p igual ou menor que 0.05 indicava um resultado estatisticamente significativo.

## Capítulo 4 - Resultados

O estudo foi composto por 14 ratinhos sem qualquer tipo de alterações e considerados normais que pertenciam ao grupo de controlo e 15 ratinhos alterados geneticamente que apresentavam a doença de *Machado Joseph* dando um total de 29 animais transgênicos que foram analisados por RM.

**Tabela 3.9 – Percentagem de animais transgênicos pertencentes a cada grupo do estudo**

	Frequência	%
Género Feminino	19	65,52%
Género Masculino	10	34,48%
Total	29	100%

A

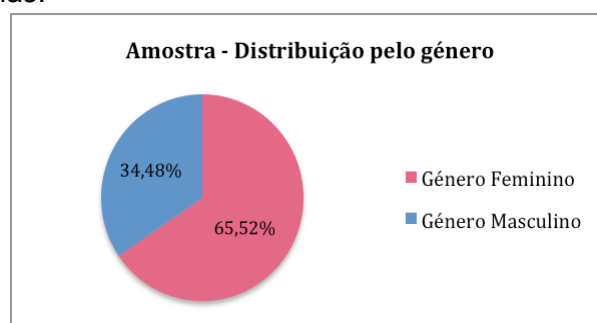
base de dados foi composta por 29 animais transgênicos sendo que 10 eram do género masculino e 19 do género feminino.

**Tabela 3.10 – Percentagem de animais transgênicos pertencentes ao género feminino e masculino**

	Frequência	%
Grupo de Controlo	14	48,28%
Grupo MJD	15	51,72%
Total	29	100%

A média das idades dos ratinhos era de 68 dias sendo que a idade mínima era de 59 dias e a máxima 78 dias.

A média de peso dos ratinhos era de 19 gramas sendo o valor máximo 26 g e o mínimo 14 gramas.



**Gráfico 4.1- Gráfico que demonstra a predominância do género feminino na amostra geral comparativamente ao género masculino**

Todos os animais foram submetidos a exames de Ressonância Magnética utilizando a sequência T2 para o estudo anatômico e posteriormente foi realizada a medição volumétrica de 3 regiões cerebrais córtex pré-frontal, estriado e hipocampo.

Após a aplicação da sequência T2 foi efetuada espectroscopia protônica *single-voxel* nas 3 regiões cerebrais de interesse para o estudo dos seguintes metabolitos: Ácido gama – aminobutírico (GABA); Ácido N- acetilaspártico e Ácido Glutâmico (NAAG); Alanina (Ala); Aspartato (Asp); Creatina (Cr); Fosfocreatina (PCr); Fosforilcolina (PCh); Glicerofosforilcolina (GPC); Glicose (Glc); Glutamato (Glu); Glutamina (Gln); Glutathiona (GSH); Inositol (Ins); Lactato (Lac); N-acetil aspartato (NAA); Rácio GABA/Glutamato e Taurina (Tau).

Na amostra testou-se a diferença entre o volume do estriado, hipocampo e córtex pré-frontal bem como a diferença dos valores dos vários metabolitos entre os dois grupos de estudo (grupo de controle e doentes MJ), para cada uma das regiões. Foram ainda efetuadas correlações com o intuito de comparar os vários parâmetros entre si.

Como os dados não seguem uma distribuição normal, não verificam o teste de normalidade (significância inferior a 0,05) pelo que se utilizaram testes não paramétricos: *Mann Whitney U* e correlação de *Spearman*.

## 4.1 Resultados da medição volumétrica

### **Medição volumétrica no estriado, hipocampo e córtex pré-frontal**

Foi averiguado se os valores dos volumes obtidos para cada uma das três regiões cerebrais em separado eram diferentes entre os dois grupos de estudo. Verificou-se através do Teste *Mann-Whitney U* que o valor de *mean rank* dos volumes obtidos no estriado no grupo de controle era de 17,04mm<sup>3</sup> e no grupo com MJD era de 13,10 mm<sup>3</sup>. Valores similares entre os dois grupos do estudo foram obtidos no hipocampo e córtex pré-frontal (respetivamente 14,71 mm<sup>3</sup> no grupo de controle, 15,27 mm<sup>3</sup> no grupo com MJD e 13,57 mm<sup>3</sup> no grupo de controle, 16,33 mm<sup>3</sup> no grupo com MJD).

Os resultados do teste *Mann-Whitney U* relativamente às medições volumétricas demonstram que não há uma diferença estatisticamente significativa entre os valores das medição nos animais transgênicos normais comparativamente aos que têm a doença de Machado Joseph (significância de 0,214 no estriado, 0,861 no hipocampo e 0,383 no PFC). Tabela com o Teste *Mann-Whitney U* em anexo. (Anexo 1 tabela 1).

**Tabela 3.11 - Tabela relativa aos valores da medição dos volumes em 3 regiões cerebrais dos 2 grupos da amostra**

ROI		Grupo	N	Mean rank
Estriado	Volumes	WT	14	17.04
		MJD	15	13.10
		Total	29	
Hipocampo	Volumes	WT	14	14.71
		MJD	15	15.27
		Total	29	
PFC	Volumes	WT	14	13.57
		MJD	15	16.33
		Total	29	

### Influência do género no volume cerebral das três regiões de interesse

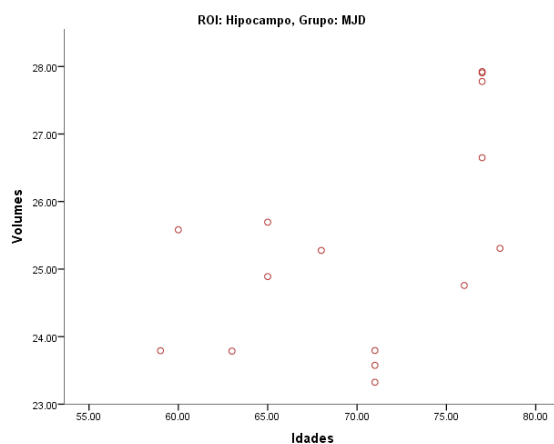
Seguidamente foi efetuado um teste estatístico para aferir a influência do género nos dados obtidos a partir das medições volumétricas de cada uma das regiões cerebrais analisadas nesta dissertação.

Quanto ao género, este demonstrou ser um fator que não possui uma influência direta sobre a patologia, através da realização do Teste *Mann-Whitney U* (significância superior a 0,05) nas 3 regiões cerebrais. Não são visíveis diferenças significativas nos valores *mean rank* de volume cerebral em ambos os géneros para a região do estriado (grupo de controlo: 7,83 mm<sup>3</sup> para o género masculino, 7,25 mm<sup>3</sup> para o género feminino; grupo MJD: 7,50 mm<sup>3</sup> para o género masculino, 8,18 mm<sup>3</sup> para o género feminino), hipocampo (grupo de controlo: 7,00 mm<sup>3</sup> para o género masculino, 7,88 mm<sup>3</sup> para o género feminino; grupo MJD: 9,50 mm<sup>3</sup> para o género masculino, 7,45 mm<sup>3</sup> para o género feminino) e córtex pré-frontal (grupo de controlo: 6,67 mm<sup>3</sup> para o género masculino, 8,13 mm<sup>3</sup> para o género feminino; grupo MJD: 8,50 mm<sup>3</sup> para o género masculino, 7,82 mm<sup>3</sup> para o género feminino) tanto no grupo de controlo como no grupo de doentes. Os valores de significância obtidos foram de 0,796 no grupo de controlo e 0,794 no grupo de MJD para a região do estriado, 0,699 para o grupo de controlo e 0,433 para o grupo de MJD no hipocampo e, por fim, 0,519 para o grupo de controlo e 0,794 para o grupo de MJD no córtex pré-frontal. Tabela com o Teste *Mann-Whitney U* em anexo. (Anexo 1 tabela 2 e 3).

## Influência da idade no volume cerebral das três regiões de interesse

Foi realizada uma correlação de *Spearman* para averiguar se a idade era um factor que possuía influência no volume cerebral das regiões de interesse. Os resultados indicaram que existem diferenças significativas do volume cerebral no hipocampo nos ratinhos com ataxia espinhocerebelar do tipo 3 com o aumento da idade (valor de coeficiente de correlação de 0,595 e significância de 0,025). Estes valores indicam que o volume cerebral do hipocampo tende a aumentar com a progressão da idade em ratinhos portadores da doença. Tabela com correlação de *Spearman* em anexo. (Anexo 1 tabela 4)

Através deste gráfico de distribuição da amostra de ratinhos com MJD tendo em conta o volume do hipocampo e a idade verificamos que existe uma separação da amostra de animais (aos 75 dias de idade aproximadamente). Os ratinhos com MJD e idade superior a 75 dias têm tendência a ter valores mais elevados de volume cerebral na região do hipocampo. Desta forma, considerou-se importante dividir a idade dos animais em 2 classes e efetuar a mesma análise para confirmar os resultados obtidos até ao momento.



**Gráfico 4.2** - Diagrama de dispersão do volume para a região do hipocampo no grupo de ratinhos com MJD consoante a idade

## Influência da idade no volume cerebral das três regiões de interesse – divisão em 2 classes

A partir do teste *Mann-Whitney U* não foi possível obter resultados do grupo de controlo para a classe de idades igual ou superior a 75 dias visto que os animais deste grupo tinham idade inferior 70 dias.

Através do teste não paramétrico *Mann-Whitney U* observamos diferenças significativas entre as 2 classes de idades na região do estriado e hipocampo para os ratinhos portadores da doença. Os valores *mean rank* dos volumes no estriado

são 6,11 mm<sup>3</sup> para ratinhos com menos de 75 dias de idade e 10,83 mm<sup>3</sup> para os ratinhos com idade igual ou superior a 75 dias. Relativamente à zona do hipocampo obtivemos 5,67 mm<sup>3</sup> e 11,50 mm<sup>3</sup> respectivamente. Valores de significância de 0,045 para o estriado e 0,013 para o hipocampo. Isto indica-nos que valores mais elevados de volume cerebral nestas zonas ocorrem nos ratinhos que apresentam uma idade mais avançada. Tabela com o teste não paramétrico *Mann-Whitney U* em anexo. (Anexo 1 tabela 5).

**Tabela 3.12 - Valores da medição dos volumes em 3 regiões cerebrais dos 2 grupos da amostra tendo em conta a idade (divisão em 2 classes: inferior a 75 dias e superior ou igual a 75 dias)**

ROI	Grupo		2 classes de idade (75 dias)	N	Mean rank
Estriado	WT	Volumes	<75 dias	14	7.50
			=>75 dias	0	.00
			Total	14	
	MJD	Volumes	<75 dias	9	6.11
			=>75 dias	6	10.83
			Total	15	
Hipocampo	WT	Volumes	<75 dias	14	7.50
			=>75 dias	0	.00
			Total	14	
	MJD	Volumes	<75 dias	9	5.67
			=>75 dias	6	11.50
			Total	15	
PFC	WT	Volumes	<75 dias	14	7.50
			=>75 dias	0	.00
			Total	14	
	MJD	Volumes	<75 dias	9	9.44
			=>75 dias	6	5.83
			Total	15	

## 4.2 Resultados da espectroscopia

### 1º Hipótese: Alterações nos metabolitos GABA, Glu e rácio GABA/Glu tendo em conta a região cerebral

A primeira hipótese diagnóstica de investigação pretende testar se os valores de glutamato, ácido gama-aminobutírico e rácio GABA/Glu obtidos variam entre o grupo de controlo e os ratinhos com a doença de Machado Joseph em função das 3 regiões cerebrais.

Verificou-se através do Teste Mann-Whitney que os valores *mean rank* de GABA no córtex pré-frontal no grupo de controlo é de 13,79 e no grupo MJD 16,13,

no estriado 12,21 no grupo de controlo e 17,60 no grupo MJD e no hipocampo no grupo de controlo é de 14,86 e no grupo MJD 15,13. Através desses valores conclui-se que não existem diferenças significativas do metabolito GABA tanto no córtex pré-frontal, estriado ou hipocampo. Foram apresentadas significâncias de 0,089 no estriado, de 0,458 no córtex pré-frontal e 0,930 no hipocampo.

Relativamente ao metabolito Glutamato os valores *mean rank* obtidos não foram significantes entre o grupo de ratinhos com MJD e o grupo de controlo no córtex pré-frontal, estriado e hipocampo (córtex pré-frontal 14,07 grupo de controlo e 15,87 grupo de MJD, no estriado 13,36 no grupo de controlo e 16,53 no grupo de doentes e no hipocampo 14,86 no grupo de controlo e 15,13 no grupo de doentes). Apresentaram-se significâncias de 0,315 no estriado, de 0,570 no córtex pré-frontal e de 0,930 no hipocampo.

Não são observadas também diferenças significativas do rácio GABA/Glu nos 2 grupos em estudo nas 3 regiões de interesse. Tabela com o Teste *Mann-Whitney U* em anexo. (Anexo 1 tabela 6).

**Tabela 3.13 - Valores de 2 metabolitos e seu rácio tendo em conta a região cerebral nos 2 grupos da amostra**

ROI		Grupo	N	Mean rank
Estriado	GABA	WT	14	12.21
		MJD	15	17.60
		Total	29	
	Glu	WT	14	13.36
		MJD	15	16.53
		Total	29	
	Racio Gaba Glu	WT	14	15.36
		MJD	15	14.67
		Total	29	
Hipocampo	GABA	WT	14	14.86
		MJD	15	15.13
		Total	29	
	Glu	WT	14	14.86
		MJD	15	15.13
		Total	29	
	Racio Gaba Glu	WT	14	17.36
		MJD	15	12.80
		Total	29	
PFC	GABA	WT	14	13.79
		MJD	15	16.13
		Total	29	

	Glu	WT	14	14.07
		MJD	15	15.87
		Total	29	
	Racio Gaba Glu	WT	14	15.86
		MJD	15	14.20
		Total	29	

### **Influência do gênero nos valores obtidos de GABA, Glu e Rácio para cada região de interesse**

Considerou-se relevante verificar se o gênero influencia os valores obtidos de GABA, Glu e rácio GABA/Glu para as 3 regiões de interesse.

Através do teste não paramétrico *Mann-Whitney U* foram visíveis diferenças significativas entre os valores de Glutamato na região do hipocampo para o grupo de controlo tendo em conta o género. Os valores *mean rank* obtidos para os ratinhos machos foi de 10,83 e para as fêmeas 5,00 (significância de 0,010). Os ratinhos do género masculino tendem a ter valores mais elevados de Glutamato na região do hipocampo em comparação com os ratinhos do género feminino. O GABA e o rácio GABA/Glu não apresentam diferenças significativas dos seus valores consoante o género dos animais estudados tanto no grupo de controlo como no grupo de ratinhos com MJD. Tabela com o teste não paramétrico *Mann-Whitney U* em anexo. (Anexo 1 tabela 7 e 8).

### **Influência da idade nos valores obtidos de GABA, Glu e Rácio para cada região de interesse**

Para comparar os valores de GABA, Glu e rácio GABA/Glu tendo em conta as idades dos ratinhos pertencentes as 2 amostras para as três regiões de interesse, foi efetuada uma correlação *Spearman*.

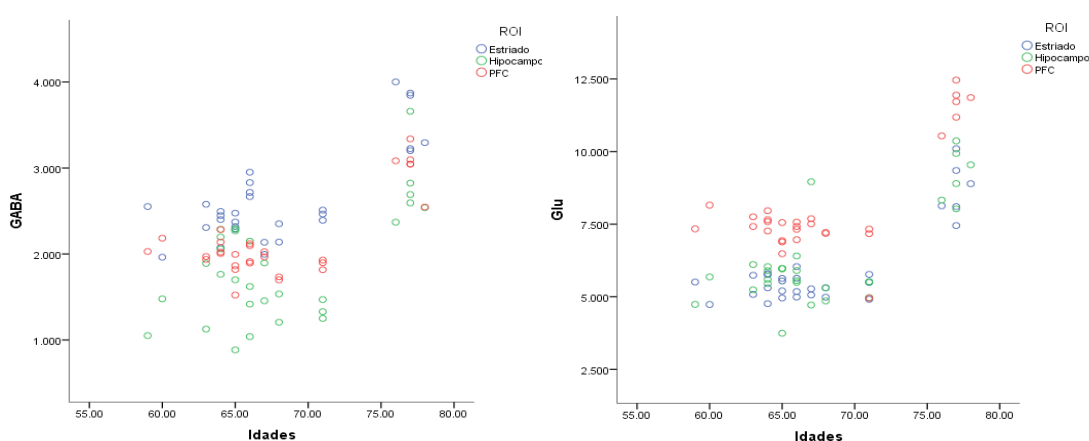
Através do teste de correlação *Spearman* obtivemos correlações entre os valores de GABA e Glu para as três regiões de interesse tendo em conta a idade dos animais com ataxia espinhocerebelar do tipo 3. Relativamente ao GABA obtivemos coeficientes de correlação de 0,710 e significâncias de 0,003 para a região do estriado, coeficientes de correlação de 0,796 e significância de 0,000 para o hipocampo e coeficientes de correlação de 0,592 e significância de 0,020 para o PFC. Os valores do metabolito Glutamato estão correlacionados com a idade dos ratinhos com MJD para as três regiões abordadas (coeficientes de correlação de 0,789 e significâncias de 0,000 para a região do estriado, coeficientes de correlação de 0,777 e significância de 0,001 para o hipocampo e coeficientes de correlação de 0,632 e significância de 0,012 para o PFC). Tanto para o GABA como para o Glu a

correlação é significativa para valores de 0,01 no estriado e hipocampo e para valores de 0,05 no PFC. Não foram observadas variações significativas entre os valores do rácio GABA/Glu e das idades dos ratinhos de ambos os grupos de estudo. Não foram observadas variações dos valores de GABA, Glu e rácio GABA/Glu tendo em conta a idade dos ratinhos pertencentes ao grupo de controlo. Tabela com o teste não paramétrico Spearman em anexo. (Anexo 1 tabela 9).

O diagrama de dispersão é um gráfico onde pontos no espaço cartesiano XY são usados para representar simultaneamente os valores de duas variáveis quantitativas medidas num conjunto de dados. Os dados são apresentados por um conjunto de pontos, cada ponto tem um determinado valor de uma variável que vai indicar a sua posição no eixo horizontal e um determinado valor para a outra variável que determina a posição no eixo vertical.

Nestes 2 diagramas de dispersão podemos ver a relação entre dois metabolitos (GABA e Glu) em ambos os grupos de estudo tendo em conta a idade.

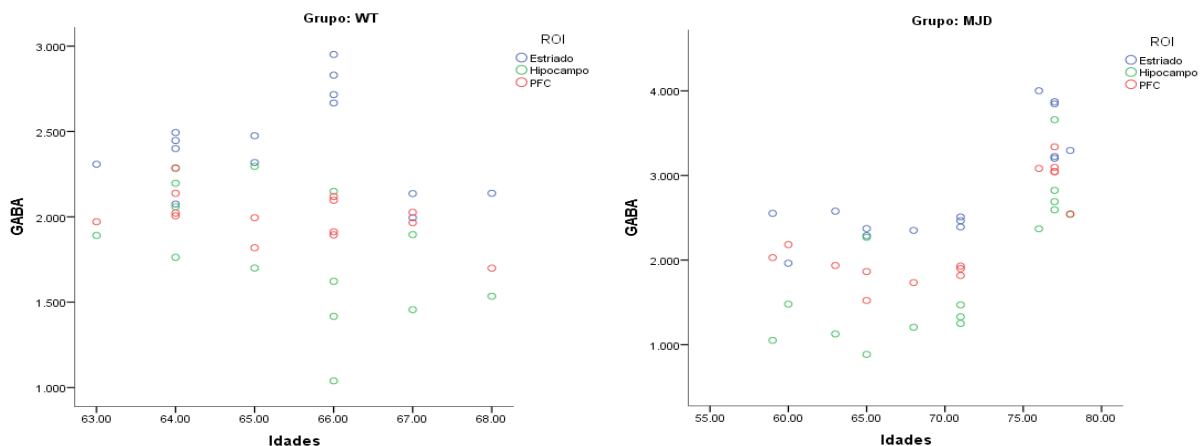
O diagrama de dispersão tem a capacidade de mostrar possíveis relações não lineares entre as variáveis. Tanto no gráfico do GABA como no do Glutamato foram obtidos dois aglomerados de pontos. Um aglomerado antes dos 75 dias e outro depois dos 75 dias de idade. Isto indica-nos que a amostra não é linear tendo em conta a idade dos ratinhos.



**Gráfico 4.3 – Diagrama de dispersão do GABA e Glu tendo em conta as idades dos ratinhos**

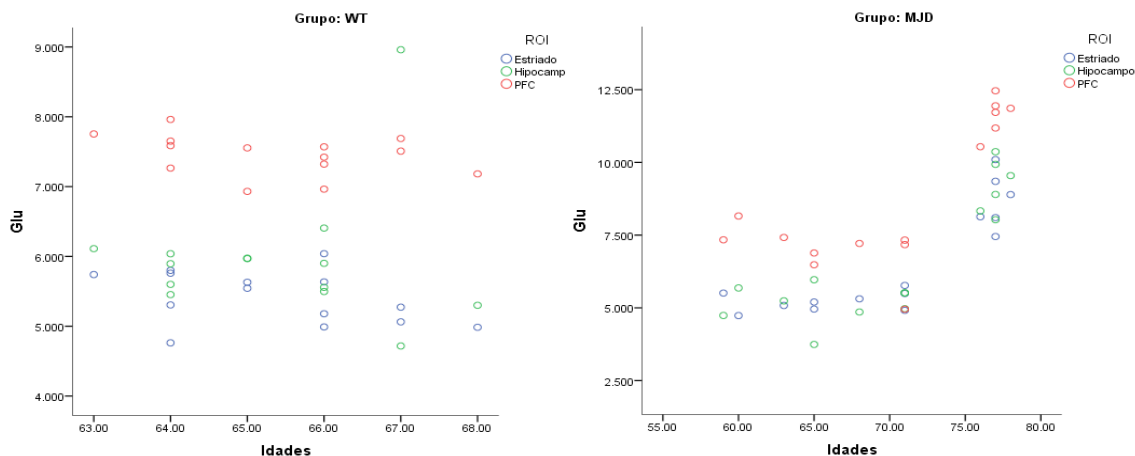
O seguinte diagrama é referente ao metabolito GABA tendo em conta a idade da amostra no grupo de controlo e no grupo de ratinhos com MJD. Podemos observar que o grupo de controlo apresenta uma distribuição normal dos valores de GABA nas três regiões de interesse tendo em conta a idade da amostra. No entanto, no grupo de ratinhos com ataxia espinhocerebelar do tipo 3 observamos uma divisão da amostra aos 75 dias de idade. Isto indica-nos que alguns ratinhos desta amostra apresentam valores de GABA mais elevados para as três regiões de interesse

comparativamente com os restantes animais do mesmo grupo devido à idade mais avançada que estes apresentam.



**Gráfico 4.4 – Diagrama de dispersão do GABA tendo em conta as idades dos ratinhos em ambos os grupos de estudo**

Nos diagramas do Glutamato podemos verificar que obtemos o mesmo padrão. Uma divisória dos valores de Glu no grupo de ratinhos com MJD por volta dos 75 dias de idade. Temos um grupo de animais com valores de Glutamato baixos e um grupo de animais com valores mais elevados o que nos indica que animais com idade mais avançada tendem a ter valores mais elevados de Glu. Estamos na presença de uma distribuição assimétrica.



**Gráfico 4.5 – Diagrama de dispersão do Glu tendo em conta as idades dos ratinhos em ambos os grupos de estudo**

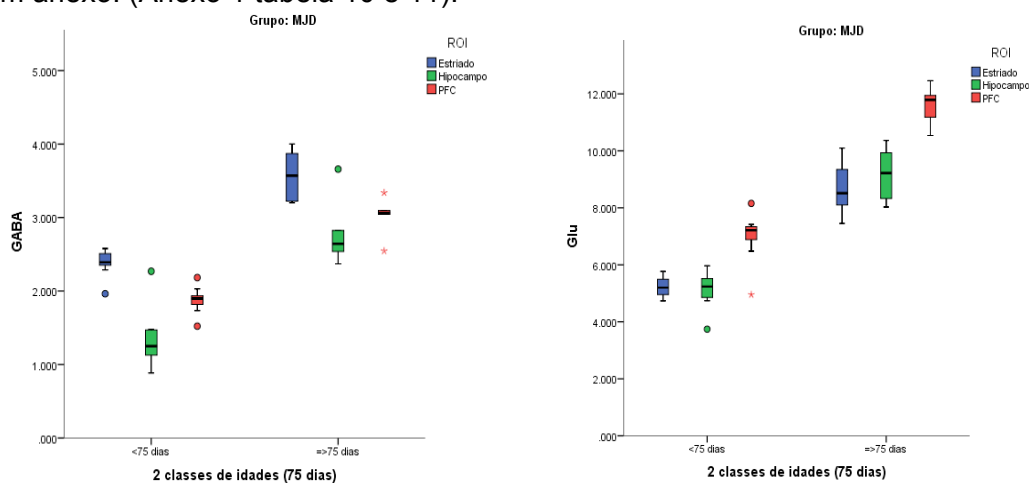
## Influência da idade nos valores obtidos de GABA, Glu e Rácio para cada região de interesse - divisão em 2 classes

A partir do teste de *Mann-Whitney U* não foi possível obter resultados do grupo de controlo para a classe de idades igual ou superior a 75 dias visto que os animais deste grupo tinham idade inferior a 70 dias.

Relativamente ao grupo de MJD os resultados obtidos mostraram diferenças significativas nos valores de GABA e Glu para as duas classes de idades nas três regiões de interesse e para o rácio GABA/Glu na região do hipocampo.

Os valores *mean rank* obtidos para o GABA e Glu foram de 5,00 para idades inferior a 75 dias, e 12,50 para idades superior ou igual a 75 dias na região do estriado, hipocampo e córtex pré-frontal (significância de 0,001). Para o rácio GABA/Glu os valores *mean rank* obtidos no hipocampo foram de 6,00 para idades inferior a 75 dias, e 11,00 para idades superior ou igual a 75 dias (significância de 0,034). Não foram obtidos valores significativos entre as 2 classes de idade para o rácio nas 2 outras regiões de interesse.

Foram obtidos sempre valores mais elevados de GABA e Glu nos ratinhos com idade superior a 75 dias para as três regiões cerebrais de interesse. Também no rácio de GABA/Glu para a região do hipocampo, os valores mais elevados pertenciam aos animais com idade mais avançada. Tabela do teste *Mann-Whitney U* em anexo. (Anexo 1 tabela 10 e 11).



**Gráfico 4.6 – Diagramas de extremos e quadris referente ao metabolitos GABA e Glu para as três regiões de interesse nos animais com MJ4D**

A partir dos diagramas de extremos e quadris podemos ter acesso a informação sobre a distribuição dos valores de GABA e Glu em cada região de interesse consoante a idade (2 classes). No diagrama do GABA podemos observar que os seus valores são sempre superiores no grupo de ratinhos com idade superior do que 75 dias para qualquer uma das regiões em estudo. O mesmo é observado

relativamente ao metabolito Glutamato. No diagrama do GABA os valores mais altos observados ocorreram no grupo de ratinhos com mais do que 75 dias de idade no estriado enquanto que o menor valor foi observado no grupo de ratinhos com idade inferior a 75 dias no hipocampo. O glutamato obteve resultados diferentes, sendo que o local onde foi observado o maior valor deste metabolito foi no PFC no grupo de ratinhos com idade superior a 75 dias, enquanto o menor valor foi observado nos ratinhos com idade inferior a 75 dias tanto no estriado como no hipocampo. Tendo em conta a posição da mediana podemos constatar que existem diferenças bastantes significativas entre os valores de GABA e Glu nas 3 regiões de estudo entre as 2 classes de idades. Não são observados grandes bigodes (valores não discrepantes positivos e negativos) para ambos os metabolitos). No GABA ocorreram 7 valores extremos, 1 no estriado (valor discrepante inferior), 2 no hipocampo e 4 no PFC. No Glutamato ocorreram 3 valores extremos, 1 no hipocampo (valor discrepante inferior) e 2 no PFC. A classe que apresentou um maior número de valores extremos foi a classe de ratinhos com idade inferior a 75 dias para ambos os metabolitos em estudo.

#### **Correlação entre Glutamato, ácido gama-aminobutírico (GABA) , rácio GABA/Glu e o volume cerebral de cada região cerebral analisada**

Realizou-se uma correlação *Spearman* entre o volume de cada região cerebral de interesse e os valores dos 2 metabolitos propostos na 1º hipótese de investigação e o seu rácio.

Através do teste não paramétrico de correlação *Spearman* foram obtidas correlações entre os valores de GABA, Glu e rácio GABA/Glu com os valores de volume para a região do hipocampo (coeficiente de correlação de 0,629 para o GABA; 0,546 para o Glu e 0,546 para o rácio GABA/Glu). Observamos assim através dos valores de correlação de *Spearman* uma relação positiva entre o aumento do valor de Glu, GABA e rácio e o volume cerebral no hipocampo (significâncias de 0,012, 0,035 e 0,035 respectivamente). Isto indica-nos que ratinhos doentes com volumes mais elevados tendem a ter valores mais altos desses 2 metabolitos e do seu rácio na região do hipocampo. Não foram observadas correlações entre o volume cerebral e os valores de GABA, Glu e rácio GABA/Glu nas restantes regiões em estudo. Tabela de correlação *Spearman* em anexo. (Anexo 1 tabela12).

## 2º Hipótese – Alterações do Aspartato

A segunda hipótese pretende averiguar se os valores de aspartato obtidos variam consoante o grupo de ratinhos normais e com a doença de Machado Joseph nas regiões cerebrais de interesse.

Como não foram obtidos dados suficientes deste metabolito na região do estriado, esta região de interesse não foi abrangida na análise estatística.

A dimensão da amostra nas restantes regiões também foi alterada. No hipocampo não foi possível medir este metabolito em 4 ratinhos do grupo de controlo e 8 no grupo de doentes enquanto que no PFC não foi possível obter valores de aspartato de um ratinho pertencente ao grupo de controlo.

Os resultados obtidos no teste *Mann-Whitney U* indicam que em média os valores do metabolito aspartato é superior nos animais com MJD (19,20) do que no grupo de controlo (9,08) na região do córtex pré-frontal (significância de 0,001). Não foram obtidas diferenças significativas nos valores de aspartato para a região do estriado no grupo de ratinhos portadores da doença em comparação com o grupo de controlo. Tabela com o teste Mann-Whitney U em anexo. (Anexo 1 tabela13).

**Tabela 3.14 – Valores médios do aspartato nos 2 grupos da amostra na região do hipocampo e córtex pré-frontal**

ROI		Grupo	N	Mean rank
Hipocampo	Asp	WT	10	7.20
		MJD	7	11.57
		Total	17	
PFC	Asp	WT	13	9.08
		MJD	15	19.20
		Total	28	

### Influência do género nos valores obtidos de Asp para cada região de interesse

Através do Teste *Mann-Whitney U* testou-se se o género é um factor que influencia os valores de aspartato em ambos os grupos em estudo. Como não foram obtidos dados suficientes deste metabolito na região do estriado, esta região de interesse não foi abrangida na análise estatística. As restantes regiões também não obtiveram diferenças significativas entre o género feminino e masculino tanto no grupo de controlo como no grupo de ratinhos com ataxia espinhocerebelar do tipo 3 no hipocampo e PFC.

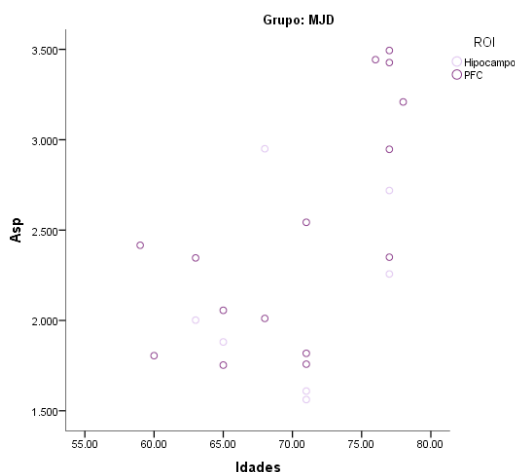
Os valores de significância foram de 0,201 para o grupo de controlo e 0,077 para o grupo de animais com MJD no hipocampo e 0,884 no grupo de controlo e 0,602 no grupo de MJD para o PFC. Tabela com o teste-T de amostras independentes em anexo. (Anexo 1 tabela14 e 15).

### Influência da idade nos valores obtidos de Asp para cada região de interesse

A idade é um factor que pode influenciar os dados dos metabolitos, logo aplicou-se uma correlação de *Spearman* de forma a averiguar se o valor de Aspartato está correlacionado com a idade dos animais em estudo. Como não foram obtidos dados suficientes deste metabolito na região do estriado, esta região de interesse não foi abrangida na análise estatística.

O hipocampo não apresentou nenhuma correlação com a idade dos animais tanto para o grupo de controlo como para o grupo de ratinhos com MJD (coeficiente de correlação de 0,543 e significância de 0,105 no grupo de controlo e coeficiente de correlação de 0,145 e significância de 0,756 no grupo de ratinhos com MJD).

No entanto, no córtex pré-frontal obtivemos uma correlação positiva entre a idade e o metabolito Aspartato no grupo MJD. Isto indica-nos que ratinhos doentes com mais idade tendem a ter valores mais altos deste metabolito na região do PFC (coeficiente de correlação de 0,626 e significância de 0,012). Tabela de correlação *Spearman* em anexo. (Anexo 1 tabela 16).



**Gráfico 4.7 – Diagrama de dispersão referente ao metabolito aspartato para a região do Hipocampo e PFC no grupo MJD**

Observa-se uma divisória entre os valores da idade dos ratinhos com a doença de Machado Joseph aos 75 dias. A amostra é assimétrica e pelo diagrama podemos observar que os ratinhos com mais do que 75 dias de idade tendem a ter valores mais elevados de Aspartato comparativamente com os restantes ratinhos pertencentes ao mesmo grupo. Para confirmar estes dados foi efetuada uma divisão

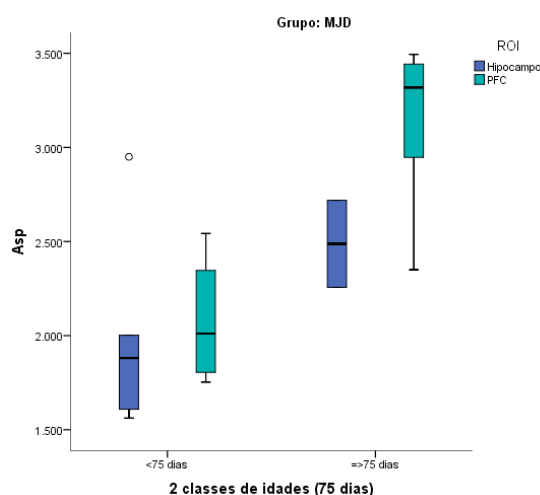
da amostra em 2 classes, ratinhos com idade inferior a 75 dias e ratinhos com idade igual ou superior a 75 dias.

### Influência da idade nos valores obtidos de Asp para cada região de interesse - divisão em 2 classes

Como a nossa amostra de ratinhos portadores de ataxia espinhocerebelar do tipo 3 não é linear efetuou-se um teste não paramétrico Mann-Whitney U com o intuito de verificar se os valores de aspartato diferem dentro da amostra de ratinhos com MJD consoante a idade.

Como não foram obtidos dados suficientes deste metabolito na região do estriado, esta região de interesse não foi abrangida na análise estatística.

Os resultados deste teste indicaram que a média das classes dos ratinhos com menos de 75 dias no córtex pré-frontal é de 5,22, enquanto nos ratinhos com idade superior ou igual a 75 dias é de 12,17. Estes resultados são significativos e indicam que dentro desta região cerebral os ratinhos mais velhos tendem a ter valores mais elevados de aspartato do que os restantes, com um valor significativo de 0,003. Não foram obtidas diferenças significativas entre as 2 classes de idades e o valor de Asp para a região do hipocampo. Tabela com o teste Mann-Whitney U em anexo. (Anexo 1 tabela17 e 18).



**Gráfico 4.8 – Diagramas de extremos e quadris referente ao metabolito Aspartato presente no hipocampo e PFC nos animais com MJD**

Neste diagrama de extremos e quadris referente ao metabolito aspartato para a região do córtex pré-frontal e hipocampo podemos observar os valores obtidos de Asp para o grupo de ratinhos com doença de Machado Joseph.

Podemos observar pelo diagrama *boxplot* que com o aumento da idade os valores de aspartato tendem a aumentar tanto no hipocampo como no córtex pré-frontal no grupo de ratinhos pertencentes ao MJD. No entanto, os valores foram

significativos apenas na zona do PFC. A distribuição no hipocampo é assimétrica negativa nos ratinhos com menos de 75 dias (a linha da mediana está mais próxima de Q3 do que de Q1) e simétrica nos ratinhos com mais de 75 dias (a linha representativa da mediana encontra-se no centro do retângulo e os bigodes têm aproximadamente o mesmo tamanho). No hipocampo a caixa dos ratinhos com mais do que 75 dias não possui bigodes o que indica que estes dados não tem valores não discrepantes, enquanto o grupo de ratinhos com menos do que 75 dias tem apenas um pequeno bigode que representa os menores valores não discrepantes do conjunto.

A distribuição no PFC é ligeiramente assimétrica positiva nos ratinhos com idade inferior a 75 dias (a linha da mediana está mais próxima de Q1 do que de Q3) e nos ratinhos com idade superior ou igual a 75 dias é assimétrica negativa. As duas caixas possuem bigodes sendo que o superior do grupo de ratinhos com menos de 75 dias é maior do que o inferior o que indica que existem um maior numero de maiores valores não discrepantes. No grupo de ratinhos com idade superior a 75 dias temos um bigode inferior grande o que indica que existem no conjunto menores valores não discrepantes.

### **Correlação entre Aspartato e o volume cerebral de cada região cerebral analisada**

Realizou-se teste de correlação de *Spearman* entre o volume de cada região cerebral de interesse e os valores do Aspartato. Como não foram obtidos dados suficientes deste metabolito na região do estriado, esta região de interesse não foi abrangida na análise estatística.

Através da correlação de *Spearman* foi obtida uma correlação positiva entre o valor de aspartato e volume na região do hipocampo no grupo de ratinhos portadores de ataxia espinhocerebelar do tipo 3 (coeficiente de correlação de 0,786 e significância de 0,036). No PFC não obtivemos nenhum tipo de correlação entre as 2 variáveis em estudo, tanto no grupo de controlo como no grupo de ratinhos com MJD (coeficiente de correlação de 0,247, significância de 0,415 e coeficiente de correlação -0,204, significância de 0,467, respectivamente). Estes valores indicam que valores mais elevados de aspartato tendem a ocorrer em cérebros com volumes do hipocampo maiores em ratinhos com MJD. Tabela de correlação *Spearman* em anexo. (Anexo 1 tabela 19).

### 3º Hipótese – Alterações Creatina total (Creatina + Fosfocreatina)

A terceira hipótese tem por finalidade conferir se os valores de Creatina total (Creatina + Fosfocreatina) obtidos variam consoante o grupo de ratinhos normais e com a doença de Machado Joseph nas três regiões cerebrais de interesse. Pretende portanto investigar se ocorrem alterações do metabolismo energético quando os ratinhos tem a doença de Machado Joseph.

Não foi possível obter dados do metabolito creatina total de um ratinho pertencente ao grupo de doentes para a região do hipocampo.

Através do teste *Mann-Whitney U* obtivemos diferenças significativas de creatina total na região do córtex pré-frontal entre os 2 grupos em estudo. Os valores de *mean rank* foram de 11,32 no grupo de controlo e 18,43 no grupo MJD (significância de 0,025). Isto indica-nos que ratinhos doentes tendem a ter valores mais elevados de Creatina total do que os ratinhos do grupo de controlo para a região do PFC. Não foram obtidas diferenças significativas de Cr total entre os 2 grupos de animais na região do estriado e hipocampo. Tabela com o teste *Mann-Whitney U* em anexo. (Anexo 1 tabela 20).

Verificou-se assim que ocorreu um aumento do metabolismo energético no cérebro dos ratinhos doentes relativamente ao ratinhos normais.

**Tabela 3.15 – Valores médios de Cr+PCr nos 2 grupos da amostra na região do estriado, hipocampo e córtex pré-frontal**

ROI		Grupo	N	Mean rank
Estriado	Cr_total	WT	14	12.93
		MJD	15	16.93
		Total	29	
Hipocampo	Cr_total	WT	14	12.79
		MJD	14	16.21
		Total	28	
PFC	Cr_total	WT	14	11.32
		MJD	15	18.43
		Total	29	

#### Influência do género nos valores obtidos de Creatina total para cada região de interesse

Através do teste *Mann-Whitney U* testou-se se o género é um factor que influencia os valores de creatina total (Creatina mais FosfoCreatina) em ambos os grupos em estudo. Os resultados indicaram diferenças significativas entre os valores de creatina tendo em conta o género dos animais no grupo de controlo na região do

hipocampo. Foram obtidos valores mais elevados de Cr total nos ratinhos machos (11,17) em comparação com as fêmeas (4,75). Valores de significância de 0,005. Isto indica que os ratinhos do gênero masculino pertencentes ao grupo de controle têm valores mais elevados de creatina total em comparação com o gênero feminino na região do hipocampo. Tabela com o teste *Mann-Whitney U* em anexo. (Anexo 1 tabelas 21 e 22).

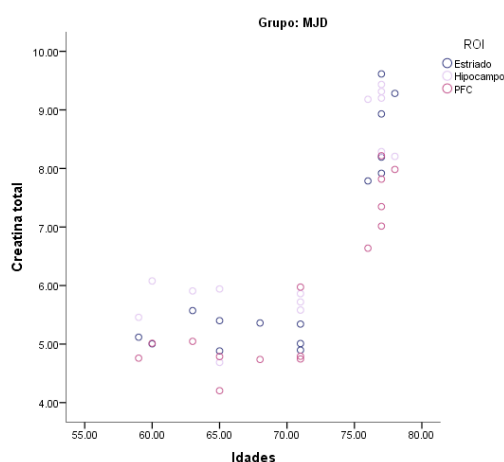
### Influência da idade nos valores obtidos de Creatina total para cada região de interesse

Para comparar os valores de Cr total tendo em conta as idades dos ratinhos pertencentes às 2 amostras para as três regiões de interesse foi realizada uma correlação de *Spearman*.

Através do teste de correlação *Spearman* obtivemos correlações entre os valores de Cr total para as três regiões de interesse tendo em conta a idade dos animais com ataxia espinhocerebelar do tipo 3.

Os valores do metabolito Cr total estão correlacionados com a idade dos ratinhos com MJD para as três regiões (coeficientes de correlação de 0,739 e significâncias de 0,002 para a região do estriado, coeficientes de correlação de 0,702 e significância de 0,005 para o hipocampo e coeficientes de correlação de 0,769 e significância de 0,001 para o PFC). A correlação obtida a partir dos valores de Cr e a idade dos animais com MJD é significativa para valores de 0,01 no estriado, hipocampo e PFC. Não foram observadas variações significativas entre os valores de creatina no grupo de controle e as idades dos animais. Tabela com a correlação *Spearman* em anexo. (Anexo 1 tabela 23).

O diagrama de dispersão tem a capacidade de mostrar possíveis relações não lineares entre as variáveis. No diagrama de Cr total obtivemos dois aglomerados de pontos. Um aglomerado antes dos 75 dias e outro depois dos 75 dias de idade. Isto indica-nos que a amostra não é linear tendo em conta a idade dos ratinhos no grupo de MJD para este metabolito.



**Gráfico 4.9 - Diagrama de dispersão da Creatina mais Fosfocreatina para as três regiões de interesse no grupo de MJD**

Caroline Jordão

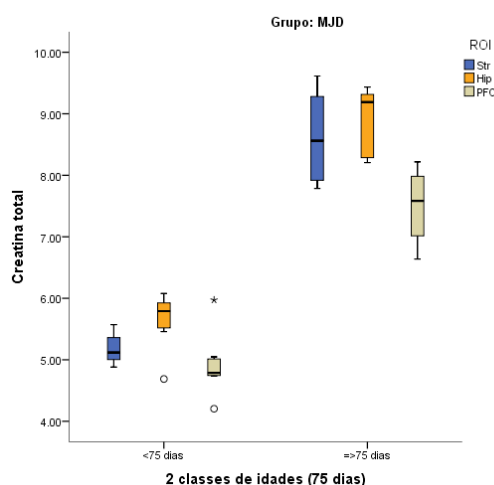
### Influência da idade nos valores obtidos de Creatina total para cada região de interesse - divisão em 2 classes

A partir do teste de *Mann-Whitney U* não foi possível obter resultados do grupo de controlo para a classe de idades igual ou superior a 75 dias visto que os animais deste grupo tinham idade inferior a 70 dias.

Relativamente ao grupo de MJD os resultados obtidos mostraram diferenças significativas nos valores de Cr total para as duas classes de idades nas três regiões de interesse.

Os valores *mean rank* obtidos para Cr foram de 5,00 para idades inferior a 75 dias, e 12,50 para idades superior ou igual a 75 dias na região do estriado e córtex pré-frontal (significância de 0,001) e na região do hipocampo os valores obtidos foram de 4,50 para idades inferior a 75 dias, e 11,50 para idades superior ou igual a 75 dias (significância de 0,002).

Foram obtidos sempre valores mais elevados de Cr total nos ratinhos com idade superior a 75 dias para as três regiões cerebrais de interesse no grupo de ratinhos portadores de ataxia espinhocerebelar do tipo 3. Tabela do teste *Mann-Whitney U* em anexo. (Anexo 1 tabelas 24 e 25).



**Gráfico 4.10 – Diagramas de extremos e quadris referente ao metabolito Creatina total presente nas três regiões de interesse nos animais com MJD tendo em conta a idade (2 classes)**

A partir do diagrama de extremos e quadris podemos ter acesso à informação sobre a distribuição dos valores de Cr total em cada região de interesse, consoante a idade dos animais.

Através deste diagrama de Cr podemos observar que os seus valores são sempre superiores no grupo de ratinhos com idade superior do que 75 dias para qualquer uma das regiões de estudo.

Os maiores valores observados ocorreram no grupo de ratinhos com mais do que 75 dias de idade no estriado e hipocampo enquanto que o menor valor foi observado no grupo de ratinhos com idade inferior a 75 dias no PFC.

Tendo em conta a posição da mediana podemos ver que existem diferenças bastantes significativas entre os valores de Cr total nas 3 regiões de estudo entre as 2 classes de idades. Não são observados grandes bigodes (valores não discrepantes positivos e negativos) para os ratinhos com idade inferior a 75 dias em comparação com os restantes animais do grupo MJD. Ocorreram 3 valores extremos: 1 no hipocampo (valor discrepante superior) e 2 no PFC na classe de ratinhos com idade inferior a 75 dias.

### **Correlação entre a Creatina, Fosfocreatina e o volume cerebral de cada região cerebral analisada**

Realizaram-se correlações entre o volume de cada região cerebral de interesse e os valores do metabolito propostos na 3<sup>o</sup> hipótese de investigação (correlação de Spearman).

Foi obtida uma correlação positiva entre os valores de Cr total e o volume cerebral do hipocampo através da correlação de *Spearman* (valores de coeficiente de correlação de 0,675 e significância de 0,008) no grupo de ratinhos portadores da doença. Valores mais elevados do volume hipocampo tendem a ter valores mais elevados de Cr nos animais transgénicos doentes. Não foram obtidas correlações entre o volume cerebral e o valor de Cr total para as regiões do estriado e córtex pré-frontal. Também não foram obtidas correlações entre as variáveis para os animais pertencentes ao grupo de controlo nas 3 regiões estudadas. (Anexo 1 tabela 26).

### **Resumo dos valores obtidos pelos testes estatísticos**

Para facilitar a análise dos dados obtidos estes foram colocados numa tabela onde podemos observar os 4 metabolitos que apresentaram diferenças significativas entre os 2 grupos da amostra nas 3 regiões cerebrais de interesse, bem como os dados das medições volumétricas e as comparações e correlações efetuadas para cada uma das hipóteses.

Em todos os casos os valores obtidos pelos ratinhos do grupo de controlo eram inferiores ao grupo de MJD com a exceção do teste efetuado com o intuito de comparar o género para os valores de Glutamato na região do hipocampo.

**Tabela 3.16 – Resumo testes estatísticos**

Parâmetros		Estriado	Hipocampo	PFC
Medição volumétrica	Volumes	-	-	-
	Volumes vs gênero	-	-	-
	Volumes vs idades	-	MJD	-
	Volumes vs idades classes	MJD/> 75 dias	MJD/> 75 dias	-
GABA	Valor metabolito	-	-	-
	Valor metabolito vs gênero	-	-	-
	Valor metabolito vs idades	MJD	MJD	MJD
	Valor metabolito vs idades classes	MJD/> 75 dias	MJD/> 75 dias	MJD/> 75 dias
	Valor metabolito vs volumes	-	MJD	-
Glutamato	Valor metabolito	-	-	-
	Valor metabolito vs gênero	-	WT/Masculino	-
	Valor metabolito vs idades	MJD	MJD	MJD
	Valor metabolito vs idades classes	MJD/> 75 dias	MJD/> 75 dias	MJD/> 75 dias
	Valor metabolito vs volumes	-	MJD	-
Aspartato	Valor metabolito	-	-	MJD
	Valor metabolito vs gênero	-	-	-
	Valor metabolito vs idades	-	-	MJD
	Valor metabolito vs idades classes	-	-	MJD/> 75 dias
	Valor metabolito vs volumes	-	MJD	-
Creatina total	Valor metabolito	-	-	MJD
	Valor metabolito vs gênero	-	WT/Masculino	-
	Valor metabolito vs idades	MJD	MJD	MJD
	Valor metabolito vs idades classes	MJD/> 75 dias	MJD/> 75 dias	MJD/> 75 dias
	Valor metabolito vs volumes	-	MJD	-

### Resultados restantes metabolitos

Como este estudo foi efetuado com um equipamento de alta intensidade de campo magnético 9,4T foi possível identificar muitos metabolitos no espectro que por vezes não são visualizados devido à sobreposições de picos com valores de ressonância muito próximos e também devido a uma deficiente supressão da água.

Para verificar se ocorreram correlações entre os metabolitos nas três regiões de interesse nos 2 grupos da amostra utilizou-se a correlação de *Spearman*. Foram efetuados mapas de cores através dos valores de coeficiente de correlação para

representação dos dados. Os dados apresentados são dados exploratórios para estudos futuros. (Anexo 1 tabelas 28,29,30,31,32,33,34).

## Capítulo 5 - Discussão/Conclusão

Este é o primeiro estudo que reporta informação anatômica e bioquímica de ratinhos com ataxia espinhocebelar numa idade precoce (aproximadamente 2 meses de idade) através de RM 9,4T efetuada no estriado, hipocampo e córtex pré-frontal.

A lesão cerebelar é responsável pela principal manifestação clínica presente na doença de Machado Joseph: a ataxia. Tradicionalmente, o cerebelo é considerado como tendo um papel importante na função motora, sendo esta a região principal onde ocorrem alterações patológicas na doença de *Machado Joseph*.<sup>25</sup>

No entanto disfunções cognitivas e emocionais têm também sido observadas em doentes com lesões do cerebelo.<sup>101</sup> Isso enfatiza a importância de estudos e investigações específicas que considerem aspetos não motores em MJD.

Nesta dissertação foram efetuados estudos volumétricos de 3 regiões cerebrais a partir de imagens ponderadas em T2 (estriado, hipocampo e córtex pré-frontal). Foram selecionadas estas regiões cerebrais em específico com o intuito de investigar a possibilidade de envolvimento cerebral generalizado, e não somente o cerebelo, em ratinhos portadores da MJD com idade precoce.

Inicialmente foi investigado se havia diferenças significativas dos volumes das 3 regiões de interesse nos 2 grupos em estudo. No entanto os valores obtidos a partir da medição volumétrica do estriado, hipocampo e PFC não diferem entre os 2 grupos de animais (tabela 3.11 e anexo 1 tabela 1). Similarmente não se verificaram diferenças entre os volumes cerebrais tendo em conta o género para cada um dos grupos de ratinhos (anexo 1 tabelas 2 e 3).

Por outro lado, o fator idade teve correlação com o volume cerebral do hipocampo em ratinhos com doença de Machado Joseph (Anexo 1 tabela 4). Os valores obtidos indicam que o volume cerebral do hipocampo tende a aumentar com a progressão da idade em ratinhos portadores da doença. Contudo, dado a amostra não se apresentar linear considerou-se importante dividir os ratinhos com MJD em duas classes tendo em conta a sua idade. Foram obtidos valores mais elevados de volume no estriado e hipocampo nos ratinhos com idade igual ou superior a 75 dias em comparação com os ratinhos mais novos. (tabela 3.12 e Anexo 1 tabela 5).

Podemos concluir assim que existe uma assimetria nos valores volumétricos dentro do grupo de ratinhos portadores da doença sendo que os ratinhos mais velhos tendem a ter valores mais elevados de volume no estriado e hipocampo em comparação com os ratinhos MJD mais novos.

Segundo um estudo da autoria de *Rub U et al.*,<sup>111</sup> efetuado em humanos adultos diagnosticados com MJD e geneticamente confirmados com MJD foram encontradas alterações significativas no cerebelo, vérmis, tronco cerebral e gânglios da base nos pacientes compatíveis com sinais de neurodegeneração. Foram efetuados por *Rub U et al.*<sup>111</sup> *Tokumar AM et al.*<sup>103</sup> e *D'Abreu A et al.*<sup>12</sup> estudos neuropatológicos e de neuroimagem que revelaram um amplo envolvimento do sistema nervoso central, incluindo o cerebelo, o tronco cerebral, os gânglios da base, a medula espinhal, bem como da região frontal, temporal, parietal e occipital. *D'Abreu A et al.*<sup>12</sup> demonstraram através de volumetria baseada por voxels (*voxel-based morphometry*) diminuição da matéria cinzenta nos lóbulos frontais, lóbulos parietais, lóbulos temporais, occipital e lóbulo límbico e diminuição da matéria branca no cerebelo e tronco cerebral com um equipamento de 3 T. Nesse estudo as áreas cognitivas afetadas são principalmente áreas primárias. *Horimoto Y et al.*<sup>115</sup> estudou 7 doentes longitudinalmente através de medição de áreas medio-sagitais de estruturas infra-tentoriais. Observaram correlações significativas entre a atrofia do cerebelo, base pontina e a idade. *D'Abreu A et al.*<sup>12</sup> sugerem que a idade é provavelmente o determinante mais importante da progressão da atrofia do cérebro. No entanto estes estudos foram efetuados em humanos adultos previamente diagnosticados com MJD (diagnóstico clínico e molecular) que apresentavam sinais clínicos da doença.

Além dos estudos volumétricos foi efetuada espectroscopia protónica single-voxel para estudo metabólico nas três regiões cerebrais descritas. Esta foi realizada para cada uma das três regiões tanto no grupo de controlo como no grupo de ratinhos portadores da doença.

A espectroscopia protónica tem sido demonstrada como uma técnica não invasiva única que tem a capacidade de analisar o metabolismo de tecidos vivos para estudos bioquímicos e fisiológicos. Esta tem como objetivo caracterizar distúrbios fornecendo valor diagnóstico que é complementar a outras modalidades. A espectroscopia não avalia a doença diretamente, já que a informação neuroquímica só pode fornecer um meio indireto de uma alteração patológica da composição bioquímica do tecido devido à doença.

Foram identificados 16 metabolitos através de espectroscopia protónica (Alanina, Aspartato, Creatina, Fosfocreatina, Ácido gama – aminobutírico,

Glutamato, Glicose, Glutamina, Glicerofosforilcolina, Fosforilcolina, Glutaciona, Inositol, Lactato, N-acetil aspartato, Ácido N- acetilaspártico e ácido glutâmico e Taurina.

De todos os metabolitos identificados considerou-se importante analisar os metabolitos com função de neurotransmissão (Ácido gama – aminobutírico, Glutamato, Aspartato) e metabolitos relacionados com o metabolismo energético (Creatina e Fosfocreatina).

Relativamente ao GABA este não apresentava diferenças significativas no grupo de ratinhos com MJD na região do córtex pré-frontal, hipocampo e estriado comparativamente ao grupo de controlo (tabela 3.13 e Anexo 1 tabela 6). Não foi demonstrado nenhuma correlação entre o género dos animais e os valores de GABA obtidos ( Anexo 1 tabelas 7 e 8). Relativamente à idade, esta parece estar correlacionada com os valores de GABA para as três regiões em estudo no grupo de animais portadores da doença ( Anexo 1 tabela 9). Foi observado uma correlação positiva entre a idade e os valores de GABA nos animais portadores de MJD, contudo a amostra de ratinhos do grupo de MJD não é simétrica e linear. Observa-se uma divisão dos animais pertencentes a este grupo sendo que os animais mais novos, com idade inferior a 75 dias, apresentam valores normais deste metabolitos enquanto os ratinhos com idade superior ou igual a 75 dias mostram um aumento significativo do valor de GABA para as três regiões em estudo ( Anexo 1 tabelas 10 e 11). Por fim efetuou-se uma correlação entre os volumes cerebrais e o valor de GABA sendo que obtivemos uma correlação positiva entre as duas variáveis na região do hipocampo ( Anexo 1 tabela 12). Valores mais elevados do volume do hipocampo tendem a ter valores mais elevados de GABA nos animais transgênicos portadores da doença.

*Griffin J et al.*,<sup>110</sup> obtiveram uma diminuição dos valores de NAA, GABA e Glu em ratinhos com 6 meses de idade com MJD através de um espectrómetro de 14,1T. Esses valores foram obtidos no cerebelo provavelmente devido a disfunção metabólica dos neurónios como um resultado de inclusões neuronais intranucleares causadas por um aumento de morte celular neuronal e subsequente gliose.

Os resultados obtidos a partir das análises estatísticas para o metabolito Glutamato foram idênticas às observadas pelo metabolito GABA. Não observámos diferenças significativas do valor de Glu no estriado, hipocampo e córtex pré-frontal entre os 2 grupos em estudo (tabela 3.13 e Anexo 1 tabela 6). O género apresentou-se como sendo um factor que influencia os valores de glutamato para os ratinhos do grupo de controlo na região do hipocampo (Anexo 1 tabelas 7 e 8). Os ratinhos do grupo de controlo que tem género masculino tendem a ter valores mais elevados de

Glutamato na região do hipocampo em comparação com os ratinhos do género feminino. O glutamato correlaciona-se com a idade no grupo MJD para as três regiões de interesse ( Anexo 1 tabela 9). No entanto como a amostra não é linear tendo em conta a idade dos ratinhos, mostrando dois aglomerados de resultados foi feita uma divisão da idade em 2 classes (idade inferior a 75 dias e superior ou igual a 75 dias). Foram obtidos valores significativamente diferentes entre os animais do grupo de MJD tendo em conta a idade para este metabolito nas três regiões de interesse ( Anexo 1 tabelas 10 e 11). Foram obtidos sempre valores mais elevados de Glu nos ratinhos com idade superior a 75 dias tanto para o hipocampo como estriado e PFC. Tal como previamente enunciado em relação ao metabolito GABA, considerou-se importante efetuar uma correlação entre os volumes cerebrais e o valor do metabolito Glu. Foram obtidas correlações entre as 2 variáveis para a região do hipocampo ( Anexo 1 tabela12), o que indicou que ratinhos portadores de MJD com volumes mais elevados do hipocampo tendem a ter valores mais altos do metabolito Glutamato.

*Tkac I et al.*,<sup>130</sup> efetuaram um estudo a ratinhos entre 8 a 12 semanas de idade com HD através de espectroscopia na região do estriado. Os resultados às 8 semanas de idade demonstraram diminuição dos valores de NAA e Glu/Gln. Diferentes processos relacionados com a doença podem ser responsáveis pelos valores observados de Gln e Glu. O aumento de Gln às 8 semanas pode representar um desequilíbrio no ciclo nos neurónios e astrócitos refletindo comprometimento da neurotransmissão de glutamatérgicos.

Uma possível justificação para os resultados discrepantes relativamente a outras publicações efetuadas é o facto dos animais utilizados nesta dissertação terem em média 68 dias de idade e se encontrarem numa fase muito precoce da doença, sendo que a obtenção de valores normais ou elevados de GABA e Glu sugere a ausência de morte neuronal nestas regiões cerebrais.

Como 2º hipótese diagnóstica, foi proposto testar a ocorrência de alteração do metabolito aspartato em animais transgénicos com a doença de Machado Joseph em comparação com o grupo de controlo. Este metabolito não foi detetado em todos os ratinhos pertencentes ao estudo, principalmente na região do estriado, por isso esta região de interesse não foi abrangida na análise estatística. Foram obtidas diferenças significativas deste metabolito para a região do PFC entre os 2 grupos em estudo (tabela 3.14 e Anexo 1 tabela 13). O aspartato encontrava-se aumentado nos ratinhos portadores da doença comparativamente com o grupo de controlo na região do PFC. Não foram obtidas diferenças significativas entre o género feminino e masculino tanto no grupo de controlo como no grupo de ratinhos com ataxia

espinhocerebelar do tipo 3 no hipocampo e PFC (Anexo 1 tabelas 14 e 15). A idade demonstrou ser um factor que se correlaciona de forma positiva com o aumento dos valores de Aspartato para a região do PFC (Anexo 1 tabela 16). Estes valores indicam que com a progressão da idade o valor de Aspartato tende a aumentar em doentes portadores de MJD somente na região do PFC. Não obstante, a amostra é assimétrica tendo em conta a idade e com a divisão da idade em duas classes os resultados indicaram que os ratinhos com mais do que 75 dias de idade tendem a ter valores mais elevados de Aspartato comparativamente com os restantes ratinhos pertencentes ao mesmo grupo para a região do PFC ( Anexo 1 tabelas 17 e 18).

Realizou-se uma correlação entre o volume de cada região cerebral de interesse e os valores do Aspartato e foram observadas correlações entre os valores de Asp e o volume na região do hipocampo no grupo de ratinhos portadores de ataxia espinhocerebelar do tipo 3 ( Anexo 1 tabela 19).

O metabolito NAA existe sobretudo em neurónios adultos e axónios e é conhecido como sendo um marcador neuronal. A sua presença fornece uma perspectiva do estado funcional dos neurónios e da integridade das células neuronais no cérebro, logo é um metabolito muito importante na análise do cérebro.

*LEI L et al.*,<sup>139</sup> obtiveram comprometimento de 4 regiões cerebelares: núcleo dentado cerebelar, córtex, vérmis e pedúnculo cerebelar médio. Foi observada uma diminuição de NAA/Cr nas zonas identificadas anteriormente em doentes com ataxia espinhocerebelar do tipo 3 bem como diminuição do NAA/Colina no vérmis do cerebelo e núcleo dentado nos humanos com MJD com um equipamento de 1,5T. Estes valores indicam que a disfunção e a diminuição do número de neurónios existentes no cerebelo, córtex e vérmis nos doentes com MJD e a atrofia axonal dos neurónios existentes no pedúnculo médio cerebelar e comprometimento neuronal do vérmis cerebelar e núcleo dentado são muito severa. *Abreu et al.*,<sup>25</sup> efetuaram um estudo sobre a matéria branca profunda em doentes com MJD e encontraram uma diminuição do rácio NAA/Cr nas regiões com matéria branca profunda comparativamente com o grupo de controlo com um equipamento de 3T.

*Adanyeguh IM et al.*,<sup>130</sup> analisaram 16 doentes com ATX tipo 1, 12 com ATX tipo 2, 21 com ATX tipo 3 e 12 com ATX tipo 7 com um equipamento de 3 T. Os resultados indicaram diminuição de NAA comparativamente com o grupo de controlo na região do vérmis e ponte. O glutamato também apresenta diminuição na região do vérmis e ponte em doentes com MJD. A diminuição dos valores de NAA é um sinal de perda neuronal e já tinha sido observada em estudos de espectroscopia em doenças de ATX.<sup>138</sup>

A última hipótese pretende averiguar se os valores Creatina e Fosfocreatina estão alterados entre os 2 grupos em estudos para as três regiões de interesse. Foi efetuada uma soma dos valores de Creatina e Fosfocreatina e foi efetuada a análise estatística tendo em conta o valor de Creatina total nos animais pertencentes ao estudo. Foram obtidas diferenças significativas de Creatina total na região do córtex pré-frontal entre os 2 grupos em estudo (tabela 3.15 e Anexo 1 tabela 20), o que ratinhos com MJD tendem a ter valores mais altos de Creatina total do que os ratinhos do grupo de controlo (alterações significativas para a região do córtex pré-frontal). Relativamente ao género, foram obtidos valores mais elevados de Creatina total nos ratinhos do género masculino em comparação com os do género feminino no grupo de controlo na região do hipocampo ( Anexo 1 tabelas 21 e 22). A Creatina total correlaciona-se com a idade de uma forma positiva e significativa para as 3 regiões de interesse no grupo de ratinhos com MJD ( Anexo 1 tabela 23. No entanto como a amostra não é linear tendo em conta a idade dos ratinhos no grupo de MJD para este metabolito efetuou-se uma divisão em 2 classes (idade inferior a 75 dias e superior ou igual a 75 dias). Foram obtidos sempre valores mais elevados de Creatina total nos ratinhos com idade superior a 75 dias para as três regiões cerebrais de interesse no grupo de ratinhos portadores de ataxia espinhocerebelar do tipo 3 ( Anexo 1 tabelas 24 e 25). Realizaram-se correlações entre o volume de cada região cerebral de interesse e os valores da soma dos dois metabolitos propostos na 3ª hipótese de investigação. Foram obtidas correlações positivas entre os volumes com a creatina dentro da região do hipocampo nos ratinhos com a doença de Machado Joseph ( Anexo 1 tabela 26).

*Adanyeguh IM. et al.*,<sup>130</sup> observaram um aumento significativo de Creatina total, um marcador energético frequentemente utilizado em estudos anteriores como uma referência da concentração em MRS tanto no vérmis como na ponte em pacientes adultos.<sup>131</sup> Como o cérebro tem uma capacidade limitada para armazenar glicose, a creatina quinase/sistema de Fosfocreatina é importante para sustentar as altas demandas de energia exigidas pelos neurónios.<sup>132</sup>

Devido ao facto da atividade da creatina quinase mitocondrial suprimir a formação de radicais livres dentro da mitocôndria,<sup>133</sup> o aumento da creatina total pode ser uma tentativa de aumentar os níveis de Creatina para suprimir a formação de radicais livres e aumentar a proteção neuronal. Alterações dos valores de creatina e fosfocreatina foram relatados na doença de *Huntington* (HD), outra doença poliglutamina que partilha características fisiopatológicas comuns com outras doenças com ataxia espinhocerebelares.<sup>134</sup> Usando técnicas de fixação de microondas, que instantaneamente inativam atividades enzimáticas cerebrais e

preservam os níveis *in vivo* de analitos, foi relatado um aumento dos níveis de creatina e fosfocreatina no cérebro de ratinhos portadores de doença de e *Huntington*. O aumento de Cr total precedida a uma diminuição dos níveis de trifosfato de adenosina em ratinhos pré-sintomáticos com 4 semanas de idade.<sup>135</sup> Do mesmo modo, o aumento da Creatina total<sup>136</sup> e alterações significativas do rácio PCr/Cr<sup>137</sup> foram observados através de espectroscopia protónica *single-voxel* em modelos de rato com HD numa fase precoce de idade.

*Tkac I et al.*,<sup>130</sup> efetuaram um estudo a ratinhos entre 8 a 12 semanas de idade com HD através de espectroscopia na região do estriado. Observaram um aumento de Creatina total as 8 e 12 semanas. Considerando a necessidade homeostática para manter os níveis normais de PCr devido a uma diminuição de creatina quinase no estriado pode ocorrer um aumento da regulação de Cr. A diminuição de respiração e produção de ATP também pode contribuir para um aumento da procura de Cr total. Portanto, o aumento de Creatina total em pacientes com ataxia espinhocelebelar é comparável à desregulação da amostra de Creatina total que foi observado em pacientes e animais com HD.

O aumento de Cr total/aumento do metabolismo energético nos animais portadores da doença de ataxia espinhocerebelar do tipo 3 pode ser consequência de maior demanda de energia por parte dos neurónios e desregulação do metabolismo energético.

Na comparação de mapas de cores entre os dois grupos em estudo, que analisaram os 16 metabolitos, foram observadas diferenças entre os dois grupos em estudo, sendo que o grupo de ratinhos portadores de MJD apresentaram valores de coeficiente de correlação mais elevados (Anexo 1 tabelas 28,29,30,31,32,33,34). Os dados apresentados são exploratórios para estudos futuros.

Como conclusão, a Ressonância Magnética é uma técnica de imagem que fornece informação relevante sobre a patologia possibilitando investigar envolvimento cerebral generalizado. A espectroscopia protónica fornece informação quantitativa sobre a relação entre os metabolismos e a sua função clínica em portadores de doenças neurodegenerativas.

Os valores normais de volume sugerem que estes animais ainda se encontram numa fase muito precoce da doença (média de 68 dias de idade). Os valores normais ou elevados de GABA, Glu e Aspartato sugerem a ausência de morte neuronal nestas regiões cerebrais. O aumento de Cr total/aumento do metabolismo energético nos animais com MJD pode ser consequência de maior demanda de energia por parte dos neurónios e desregulação do metabolismo energético.

## **Desenvolvimentos futuros**

Da realização deste estudo decorrem sugestões interessantes a realizar de futuro e que considero representarem uma mais-valia para as conclusões aqui apresentadas.

Como no espectro foram identificados 16 metabolitos e nesta dissertação foram analisados inteiramente apenas 5 metabolitos consideramos importante serem feitas análises dos restantes metabolitos para cada uma das regiões abordadas, e associadamente correlacionar com o género, idade e volume cerebral.

Também seria uma mais valia analisar os mesmos animais com 6, 9 e 12 meses de idade de forma a comparar os resultados observados até ao momento e verificar se ocorre atrofia de alguma das zonas analisadas ou alteração dos valores dos metabolitos neurotransmissores excitatórios ou inibidores que podem traduzir possível morte neuronal. Em estudos futuros, seria ainda interessante complementar o protocolo implementado utilizando também outras técnicas de RM.

## Capítulo 6 - Referências Bibliográficas

1. Watson C, Paxinos G, Puelles L. The mouse nervous system. London: Academic; 2012.
2. La Spada ATaylor J. Polyglutamines Placed into Context. *Neuron*. 2003;38(5):681-684.
3. Orr HZoghbi H. Trinucleotide Repeat Disorders. *Annu Rev Neurosci*. 2007;30(1):575-621.
4. D'Abreu A, França M, Paulson H, Lopes-Cendes I. Caring for Machado–Joseph disease: Current understanding and how to help patients. *Parkinsonism & Related Disorders*. 2010;16(1):2-7.
5. Bennett E, Shaler T, Woodman B, Ryu K, Zaitseva T, Becker C et al. Global changes to the ubiquitin system in Huntington's disease. *Nature*. 2007;448(7154):704-708.
6. Chafekar SDuennwald M. Impaired Heat Shock Response in Cells Expressing Full-Length Polyglutamine-Expanded Huntingtin. *PLoS ONE*. 2012;7(5):e37929.
7. Solans A, Zambrano A, Rodriguez M, Barrientos A. Cytotoxicity of a mutant huntingtin fragment in yeast involves early alterations in mitochondrial OXPHOS complexes II and III. *Human Molecular Genetics*. 2006;15(20):3063-3081.
8. Zoghbi HOrr H. Polyglutamine diseases: protein cleavage and aggregation. *Current Opinion in Neurobiology*. 1999;9(5):566-570.
9. Gatchel JZoghbi H. Diseases of Unstable Repeat Expansion: Mechanisms and Common Principles. *Nat Rev Genet*. 2005;6(10):743-755.
10. Schöls L, Bauer P, Schmidt T, Schulte T, Riess O. Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *The Lancet Neurology*. 2004;3(5):291-304.
11. Walker F. Huntington's disease. *The Lancet*. 2007;369(9557):218-228.
12. D'Abreu A, França Jr. M, Yasuda C, Campos B, Lopes-Cendes I, Cendes F. Neocortical Atrophy in Machado-Joseph Disease: A Longitudinal Neuroimaging Study. *Journal of Neuroimaging*. 2011;22(3):285-291.
13. Bettencourt CLima M. Machado-Joseph Disease: from first descriptions to new perspectives. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2011;6(1):35.
14. Teive H, Munhoz R, Raskin S, Werneck L. Spinocerebellar ataxia type 6 in Brazil. *Arq Neuro-Psiquiatr*. 2008;66(3b):691-694.
15. Jardim L, Silveira I, Pereira M, Ferro A, Alonso I, do Céu Moreira M et al. A survey of spinocerebellar ataxia in South Brazil - 66 new cases with Machado-Joseph disease, SCA7, SCA8, or unidentified disease-causing mutations. *Journal of Neurology*. 2001;248(10):870-876.
16. Vale J, Bugalho P, Silveira I, Sequeiros J, Guimarães J, Coutinho P. Autosomal dominant cerebellar ataxia: frequency analysis and clinical characterization of 45 families from Portugal. *European Journal of Neurology*. 2010;17(1):124-128.
17. Silveira I, Coutinho P, Maciel P, Gaspar C, Hayes S, Dias A et al. Analysis of SCA1, DRPLA, MJD, SCA2, and SCA6 CAG repeats in 48 portuguese ataxia families. *American Journal of Medical Genetics*. 1998;81(2):134-138.
18. Zhao Y, Tan E, Law H, Yoon C, Wong M, Ng I. Prevalence and ethnic differences of autosomal-dominant cerebellar ataxia in Singapore. *Clinical Genetics*. 2002;62(6):478-481.
19. Tang B, Liu C, Shen L, Dai H, Pan Q, Jing L et al. Frequency of SCA1, SCA2, SCA3/MJD, SCA6, SCA7, and DRPLA CAG Trinucleotide Repeat Expansion in Patients With Hereditary Spinocerebellar Ataxia From Chinese Kindreds. *Arch Neurol*. 2000;57(4):540.
20. van de Warrenburg B, Sinke R, Verschuuren-Bemelmans C, Scheffer H, Brunt E, Ippel P et al. Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: Prevalence and age at onset variance analysis. *Neurology*. 2002;58(5):702-708.

21. Schöls L, Amoiridis G, Büttner T, Przuntek H, Epplen J, Riess O. Autosomal dominant cerebellar ataxia: Phenotypic differences in genetically defined subtypes?. *Annals of Neurology*. 1997;42(6):924-932.
22. Maruyama H, Izumi Y, Morino H, Oda M, Toji H, Nakamura S et al. Difference in disease-free survival curve and regional distribution according to subtype of spinocerebellar ataxia: A study of 1,286 Japanese patients. *American Journal of Medical Genetics*. 2002;114(5):578-583.
23. Coutinho P. Doença de Machado-Joseph. Tentativa de definição. Tese. Universidade do Porto. 1992;.
24. Maciel P. Improvement in the Molecular Diagnosis of Machado-Joseph Disease. *Arch Neurol*. 2001;58(11):1821.
25. D'Abreu A, França Jr M, Appenzeller S, Lopes-Cendes I, Cendes F. Axonal Dysfunction in the Deep White Matter in Machado-Joseph Disease. *Journal of Neuroimaging*. 2009;19(1):9-12.
26. Abe Y, Tanaka F, Matsumoto M, Doyu M, Hirayama M, Kachi T et al. CAG repeat number correlates with the rate of brainstem and cerebellar atrophy in Machado-Joseph disease. *Neurology*. 1998;51(3):882-884.
27. Bloch F, Hansen W, Packard M. The Nuclear Induction Experiment. *Phys Rev*. 1946;70(7-8):474-485.
28. Wood M. Non-Mathematical Approach to Basic MRI by Hans-J. Smith and Frank N. Ranallo. *Med Phys*. 1990;17(4):720.
29. Abraham R. Principles of magnetic resonance. C. P. Slichter. Springer, Berlin, 1990, ISBN 3 540 5057 6, 640 pages, DM89.00. *Magn Reson Chem*. 1990;28(12):1078-1078.
30. Puddephat M. VoxelCube - The principles of magnetic resonance imaging [Internet]. Voxelcube.com. 2016 [cited 24 March 2016]. Available from: <http://www.voxelcube.com/articles/1/the-principles-of-magnetic-resonance-imaging>
31. Thomson C, Kornegay J, Burn R, Drayer B, Hadley D, Levesque D et al. MAGNETIC RESONANCE IMAGING-A GENERAL OVERVIEW OF PRINCIPLES AND EXAMPLES IN VETERINARY NEURODIAGNOSIS. *Veterinary Radiology & Ultrasound*. 1993;34(1):2-17.
32. Haase A, Frahm J, Matthaei D, Hanicke W, Merboldt K. FLASH imaging. Rapid NMR imaging using low flip-angle pulses. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*. 1986;67(2):258-266.
33. Hennig J, Nauerth A, Friedburg H. RARE imaging: A fast imaging method for clinical MR. *Magn Reson Med*. 1986;3(6):823-833.
34. Hennig J, Friedburg H. Clinical applications and methodological developments of the RARE technique. *Magnetic Resonance Imaging*. 1988;6(4):391-395.
35. Mansfield P. Multi-planar image formation using NMR spin echoes. *J Phys C: Solid State Phys*. 1977;10(3):L55-L58.
36. Meiboom S, Gill D. Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times. *Rev Sci Instrum*. 1958;29(8):688.
37. Mulkern R. Phase-encode order and its effect on contrast and artifact in single-shot RARE sequences. *Med Phys*. 1991;18(5):1032.
38. Block W, Pauly J, Nishimura D. RARE spiral T2-weighted imaging. *Magnetic Resonance in Medicine*. 1997;37(4):582-590.
39. Williams S. In vivo NMR spectroscopy: Principles and techniques, R.A. de Graaf, Wiley, Chichester, 1998, Hardback £120 ISBN 0-471-98365-9. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 1999;35(2):201.
40. Castillo MK, Wock L. Clinical Applications of Proton Magnetic Resonance Spectroscopy in the Evaluation of Common Intracranial Tumors. *Topics in Magnetic Resonance Imaging*. 1999;10(2):104-113.
41. Klose U. Measurement sequences for single voxel proton MR spectroscopy. *European Journal of Radiology*. 2008;67(2):194-201.

42. Tkáč IGruetter R. Methodology of  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy of the human brain at very high magnetic fields. *Appl Magn Reson*. 2005;29(1):139-157.
43. Tkac I, Starcuk Z, Choi I, Gruetter R. In vivo  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy of rat brain at 1 ms echo time. *Magnetic Resonance in Medicine*. 1999;41(4):649-656.
44. van der Graaf M. In vivo magnetic resonance spectroscopy: basic methodology and clinical applications. *European Biophysics Journal*. 2009;39(4):527-540.
45. Jansen J, Backes W, Nicolay K, Kooi M.  $^1\text{H}$  MR Spectroscopy of the Brain: Absolute Quantification of Metabolites 1. *Radiology*. 2006;240(2):318-332.
46. Hajek MDezortova M. Introduction to clinical in vivo MR spectroscopy. *European Journal of Radiology*. 2008;67(2):185-193.
47. Panigrahy A, Nelson M, Blüml S. Magnetic resonance spectroscopy in pediatric neuroradiology: clinical and research applications. *Pediatr Radiol*. 2009;40(1):3-30.
48. Bottomley P, Foster T, Darrow R. Depth-resolved surface-coil spectroscopy (DRESS) for in Vivo  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$ , and  $^{13}\text{C}$  NMR. *Journal of Magnetic Resonance* (1969). 1984;59(2):338-342.
49. Jackson A. Quantitative MRI of the brain: measuring changes caused by disease . By P Tofts, pp. xvi+633, 2003 (John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK) £175.00 ISBN 0-470-84721-2. *The British Journal of Radiology*. 2005;78(925):87-87.
50. Munoz Maniega S, Cvorov V, Armitage P, Marshall I, Bastin M, Wardlaw J. Choline and Creatine Are Not Reliable Denominators for Calculating Metabolite Ratios in Acute Ischemic Stroke. *Stroke*. 2008;39(9):2467-2469.
51. Drost D, Riddle W, Clarke G. Proton magnetic resonance spectroscopy in the brain: Report of AAPM MR Task Group #9. *Medical Physics*. 2002;29(9):2177-2197.
52. Govindaraju V, Young K, Maudsley A. Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR in Biomedicine*. 2000;13(3):129-153.
53. Pouwels PFrahm J. Regional metabolite concentrations in human brain as determined by quantitative localized proton MRS. *Magnetic Resonance in Medicine*. 1998;39(1):53-60.
54. Berridge Mlrvine R. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*. 1989;341(6239):197-205.
55. Brand A, Richter-Landsberg C, Leibfritz D. Multinuclear NMR Studies on the Energy Metabolism of Glial and Neuronal Cells. *Developmental Neuroscience*. 1993;15(3-5):289-298.
56. Michaelis T, Merboldt K, Bruhn H, Hänicke W, Frahm J. Absolute concentrations of metabolites in the adult human brain in vivo: quantification of localized proton MR spectra. *Radiology*. 1993;187(1):219-227.
57. Kreis R, Ernst T, Ross B. Absolute Quantitation of Water and Metabolites in the Human Brain. II. Metabolite Concentrations. *Journal of Magnetic Resonance, Series B*. 1993;102(1):9-19.
58. Klunk W, Xu C, Panchalingram K, McClure R, Pettegrew J. Quantitative  $^1\text{H}$  and  $^{31}\text{P}$  MRS of PCA extracts of postmortem Alzheimer's disease brain. *Neurobiology of Aging*. 1996;17(3):349-357.
59. VAN ZIJL PBARKER P. Magnetic Resonance Spectroscopy and Spectroscopic Imaging for the Study of Brain Metabolism. *Ann NY Acad Sci*. 1997;820(1 Imaging Brain):75-96.
60. Peet A, Lateef S, MacPherson L, Natarajan K, Sgouros S, Grundy R. Short echo time  $^1\text{H}$  magnetic resonance spectroscopy of childhood brain tumours. *Childs Nerv Syst*. 2006;23(2):163-169.
61. Albers M, Krieger M, Gonzalez-Gomez I, Gilles F, McComb J, Nelson M et al. Proton-decoupled  $^{31}\text{P}$  MRS in untreated pediatric brain tumors. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2004;53(1):22-29.
62. Calvar J, Meli F, Romero C, Yáñez M, Martinez A, Lambre H et al. Characterization of brain tumors by MRS, DWI and Ki-67 labeling index. *J Neurooncol*. 2005;72(3):273-280.

63. Rudkin T, Arnold D. Proton Magnetic Resonance Spectroscopy for the Diagnosis and Management of Cerebral Disorders. *Arch Neurol.* 1999;56(8):919.
64. Kaldis P, Hemmer W, Zanolla E, Holtzman D, Wallimann T. 'Hot Spots' of Creatine Kinase Localization in Brain: Cerebellum, Hippocampus and Choroid Plexus. *Developmental Neuroscience.* 1996;18(5-6):542-554.
65. Ilyin S, Sonti G, Molloy G, Plata-Salamán C. Creatine kinase-B mRNA levels in brain regions from male and female rats. *Molecular Brain Research.* 1996;41(1-2):50-56.
66. Wang Y, Li S. Differentiation of metabolic concentrations between gray matter and white matter of human brain by *in vivo* <sup>1</sup>H magnetic resonance spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine.* 1998;39(1):28-33.
67. Wang Y, Li S. Differentiation of metabolic concentrations between gray matter and white matter of human brain by *in vivo* <sup>1</sup>H magnetic resonance spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine.* 1998;39(1):28-33.
68. Rothman D, Behar K, Hetherington H, Shulman R. Homonuclear <sup>1</sup>H double-resonance difference spectroscopy of the rat brain *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1984;81(20):6330-6334.
69. Pan J, Mason G, Pohost G, Hetherington H. Spectroscopic imaging of human brain glutamate by water-suppressed J-refocused coherence transfer at 4.1 T. *Magnetic Resonance in Medicine.* 1996;36(1):7-12.
70. Mason G, Pan J, Ponder S, Twieg D, Pohost G, Hetherington H. Detection of brain glutamate and glutamine in spectroscopic images at 4.1 T. *Magnetic Resonance in Medicine.* 1994;32(1):142-145.
71. Gruetter R, Weisdorf S, Rajanayagan V, Terpstra M, Merkle H, Truwit C et al. Resolution Improvements *in vivo* <sup>1</sup>H NMR Spectra with Increased Magnetic Field Strength. *Journal of Magnetic Resonance.* 1998;135(1):260-264.
72. van Zijl P, Moonen C. *In situ* changes in purine nucleotide and n-acetyl concentrations upon inducing global ischemia in cat brain. *Magnetic Resonance in Medicine.* 1993;29(3):381-385.
73. van Zijl P, Moonen C. *In situ* changes in purine nucleotide and n-acetyl concentrations upon inducing global ischemia in cat brain. *Magnetic Resonance in Medicine.* 1993;29(3):381-385.
74. Martinez-Hernandez A, Bell K, Norenberg M. Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science.* 1977;195(4284):1356-1358.
75. Chamuleau R, Bosman D, Bovée W, Luyten P, Den Hollander J. What the clinician can learn from MR glutamine/glutamate assays. *NMR in Biomedicine.* 1991;4(2):103-108.
76. Ross B, Danielsen E, Bluml S. Proton Magnetic Resonance Spectroscopy: The New Gold Standard for Diagnosis of Clinical and Subclinical Hepatic Encephalopathy?. *Dig Dis.* 1996;14(1):30-39.
77. Birken D, Oldendorf W. N-Acetyl-L-Aspartic acid: A literature review of a compound prominent in <sup>1</sup>H-NMR spectroscopic studies of brain. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* 1989;13(1):23-31.
78. Pouwels P, Frahm J. Differential distribution of NAA and NAAG in human brain as determined by quantitative localized proton MRS. *NMR in Biomedicine.* 1997;10(2):73-78.
79. Tsai G, Coyle J. N-Acetylaspartate in neuropsychiatric disorders. *Progress in Neurobiology.* 1995;46(5):531-540.
80. Brulatout S, Méric P, Loubinoux I, Borredon J, Corrèze J, Roucher P et al. A One-Dimensional (Proton and Phosphorus) and Two-Dimensional (Proton) *In Vivo* NMR Spectroscopic Study of Reversible Global Cerebral Ischemia. *Journal of Neurochemistry.* 2002;66(6):2491-2499.
81. Stefano N, Matthews P, Arnold D. Reversible decreases in N-acetylaspartate after acute brain injury. *Magnetic Resonance in Medicine.* 1995;34(5):721-727.
82. Drost D. Localized Phosphorus <sup>31</sup>P Magnetic Resonance Spectroscopy in Chronic Schizophrenic Patients and Normal Controls. *Arch Gen Psychiatry.* 1991;48(6):578.

83. Stanley J, Williamson P, Drost D, Rylett R, Carr T, Malla A et al. An In Vivo Proton Magnetic Resonance Spectroscopy Study of Schizophrenia Patients. *Schizophrenia Bulletin*. 1996;22(4):597-609.
84. Wittsack H, Kugel H, Roth B, Heindel W. Quantitative measurements with localized<sup>1</sup>H MR spectroscopy in children with Canavan's disease. *J Magn Reson Imaging*. 1996;6(6):889-893.
85. Wittsack H, Kugel H, Roth B, Heindel W. Quantitative measurements with localized<sup>1</sup>H MR spectroscopy in children with Canavan's disease. *J Magn Reson Imaging*. 1996;6(6):889-893.
86. Marcus K, Astrakas L, Zurakowski D, Zarifi M, Mintzopoulos D, Poussaint T et al. Predicting survival of children with CNS tumors using proton magnetic resonance spectroscopic imaging biomarkers. *Int J Oncol*. 2007;.
87. Sappey-Marinier D, Calabrese G, Fein G, Hugg J, Biggins C, Weiner M. Effect of Photic Stimulation on Human Visual Cortex Lactate and Phosphates Using <sup>1</sup>H and <sup>31</sup>P Magnetic Resonance Spectroscopy. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 1992;12(4):584-592.
88. Posse S, Dager S, Richards T, Yuan C, Ogg R, Artru A et al. In vivo measurement of regional brain metabolic response to hyperventilation using magnetic resonance: Proton echo planar spectroscopic imaging (PEPSI). *Magnetic Resonance in Medicine*. 1997;37(6):858-865.
89. Ross B. Biochemical considerations in<sup>1</sup>H spectroscopy. Glutamate and glutamine; Myo-inositol and related metabolites. *NMR in Biomedicine*. 1991;4(2):59-63.
90. Cudalbu C, Cavassila S, Ratiney H, Grenier D, Briguet A, Graveron-Demilly D. Estimation of metabolite concentrations of healthy mouse brain by magnetic resonance spectroscopy at 7 T. *Comptes Rendus Chimie*. 2006;9(3-4):534-538.
91. Yang SYang Y. Measurement of Glutathione (GSH) from Optimized-Echo-Time STEAM Spectra at 3T. *NeuroImage*. 2009;47:S164.
92. Sergii G. Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Focal Intracranial Lesions: Role in Clinical Practice. *Journal of Cancer Prevention & Current Research*. 2015;2(5).
93. Roberts E. Gamma-aminobutyric acid. *Scholarpedia*. 2007;2(10):3356.
94. Rothman D. Studies of metabolic compartmentation and glucose transport using in vivo MRS. *NMR in Biomedicine*. 2001;14(2):149-160.
95. Tkáč I, Henry P, Andersen P, Keene C, Low W, Gruetter R. Highly resolved in vivo <sup>1</sup>H NMR spectroscopy of the mouse brain at 9.4 T. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2004;52(3):478-484.
96. Dissection of Rodent Brain Regions - Springer [Internet]. [link.springer.com](http://link.springer.com). 2011 [cited 24 March 2016]. Available from: [http://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-61779-111-6\\_2](http://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-61779-111-6_2)
97. Oliveira H. Doença de Machado-Joseph (SCA3): O contributo da genética para a prática clínica. Tese de Mestrado. Faculdade de Medicina. Universidade do Porto. 2010.
98. Whaley N, Fujioka S, Wszolek Z. Autosomal dominant cerebellar ataxia type I: A review of the phenotypic and genotypic characteristics. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2011;6(1):33.
99. Ventura M. Doença de Machado-Joseph: Análise da Região 3'UTR do Gene ATXN3. Tese de Mestrado. Universidade dos Açores. 2011.
100. Sequeiros J, Coutinho P. Epidemiology and clinical aspects of Machado- Joseph disease. *Adv Neurol*. 1993;61:139-53.
101. Schmahmann J. The cerebellar cognitive affective syndrome. *Brain*. 1998;121(4):561-579.
102. Rüb U, Brunt E, Deller T. New insights into the pathoanatomy of spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease). *Current Opinion in Neurology*. 2008;21(2):111-116.

103. Tokumaru A, Kamakura K, Maki T, Murayama S, Sakata I, Kaji T et al. Magnetic Resonance Imaging Findings of Machado–Joseph Disease: Histopathologic Correlation. *Journal of Computer Assisted Tomography*. 2003;27(2):241-248.
104. Hall H, Cuellar-Baena S, Dahlberg C, In't Zandt R, Denisov V, Kirik D. Magnetic resonance spectroscopic methods for the assessment of metabolic functions in the diseased brain. *Curr Top Behav Neurosci*. 2012;11:169-198.
105. Guerrini L. Brainstem neurodegeneration correlates with clinical dysfunction in SCA1 but not in SCA2. A quantitative volumetric, diffusion and proton spectroscopy MR study. *Brain*. 2004;127(8):1785-1795.
106. Wang P, Chen H, Wu H, Lirng J, Wu Y, Soong B. Association between Proton Magnetic Resonance Spectroscopy Measurements and CAG Repeat Number in Patients with Spinocerebellar Ataxias 2, 3, or 6. *PLoS ONE*. 2012;7(10):e47479.
107. Ferguson K. Magnetic resonance spectroscopy and cognitive function in healthy elderly men. *Brain*. 2002;125(12):2743-2749.
108. Henriksen O. In vivo quantitation of metabolite concentrations in the brain by means of proton MRS. *NMR in Biomedicine*. 1995;8(4):139-148.
109. Schmitz-Hubsch T, du Montcel S, Baliko L, Berciano J, Boesch S, Depondt C et al. Scale for the assessment and rating of ataxia: Development of a new clinical scale. *Neurology*. 2006;66(11):1717-1720.
110. Griffin J, Cemal C, Pook M. Defining a metabolic phenotype in the brain of a transgenic mouse model of spinocerebellar ataxia 3. *Physiol Genomics*. 2003;.
111. Rub U, de Vos RA, Brunt ER, et al. Spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3): thalamic neurodegeneration occurs independently from thalamic ataxin-3 immunopositive neuronal intranuclear inclusions. *Brain Pathol* 2006;16(3):218-227.
112. Hirano S, Shinotoh H, Arai K, et al. PET study of brain acetylcholinesterase in cerebellar degenerative disorders. *Mov Disorders*. 2008;23(8):1154-1160.
113. Herlidou-Memê S, Constans JM, Carsin B, et al. MRI texture analysis on texture test objects, normal brain and intracranial tumors. *Magn Reson Imaging*. 2003;21:989-993.
114. Etchebehere EC, Cendes F, Lopes-Cendes I, et al. Brain singlephoton emission computed tomography and magnetic resonance imaging in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol*. 2001;58:1257- 1263.
115. Horimoto Y, MatsumotoM, Yuasa H, et al. Brainstem in Machado- Joseph disease: atrophy or small size? *Eur J Neurol*. 2008;15102- 15105.
116. Taniwaki T, Sakai T, Kobayashi T, et al. Positron emission tomography (PET) in Machado-Joseph disease. *J Neurol Sci*. 1997;145:63-67.
117. Braga-Neto P, Dutra LA, Pedroso JL, Felicio AC, Alessi H, Santos-Galduroz RF. Cognitive deficits in Machado– Joseph disease correlate with hypoperfusion of visual system areas. *Cerebellum*. 2012;11:1037–1044.
118. Braga-Neto P, Pedroso JL, Alessi H, Dutra LA, Felicio AC, Minett T. Cerebellar cognitive affective syndrome in Machado Joseph disease: core clinical features. *Cerebellum*. 2012;11:549–556.
119. Lopes TM, D'Abreu A, França MC Jr. Widespread neuronal damage and cognitive dysfunction in spinocerebellar ataxia type 3. *J Neurol*. 2013;260:2370– 2379.
120. Kawai Y, Takeda A, Abe Y, Washimi Y, Tanaka F, Sobue G. Cognitive impairments in Machado\_Joseph disease. *Arch Neurol*. 2004;61:1757–1760.
121. Imon Y, Katayama S, Kawakami H, Murata Y, Oka M, Nakamura S. A necropsied case of Machado–Joseph disease with a hyperintense signal of transverse pontine fibres on long TR sequences of magnetic resonance images. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1998; 64:140–141.
122. Lee YC, Liu CS, Wu HM, Wang PS, Chang MH, Soong BW. The 'hot cross bun' sign in the patients with spinocerebellar ataxia. *Eur J Neurol*. 2009;16:513–516.
123. Murata Y, Yamaguchi S, Kawakami H, Imon Y, Maruyama H, Sakai T, Kazuta T, Ohtake T, Nishimura M, Saida T, Chiba S, Oh-i T, Nakamura S. Characteristic

- magnetic resonance imaging findings in Machado–Joseph disease. *Arch Neurol.*1998; 55:33–37;
124. Yamada S, Nishimiya J, Nakajima T, Taketazu F. Linear high-intensity area along the medial margin of the internal segment of the globus pallidus in Machado–Joseph disease patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.*2005;76:573–575.
  125. Klockgether T, Skalej M, Wedekind D, Luft AR, Welte D, Schulz JB, Abele M, Burk K, Laccone F, Brice A, Dichgans J. Autosomal dominant cerebellar ataxia type I. MRI-based volumetry of posterior fossa structures and basal ganglia in spinocerebellar ataxia types 1, 2 and 3. *Brain.* 1998; 121(Pt 9):1687–1693.
  126. Soong BW, Liu RS. Positron emission tomography in asymptomatic gene carriers of Machado–Joseph disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.*1998; 64(4):499–504.
  127. Chang L, Ernst T, Poland R, Jenden D. In vivo proton magnetic resonance spectroscopy of the normal aging human brain. *Life Sciences.* 1996;58(22):2049-2056.
  128. Bitar R, Leung G, Perng R, Tadros S, Moody A, Sarrazin J et al. MR Pulse Sequences: What every Radiologist Want to Know but is Afraid to Ask1. *RadioGraphics.*2006;26(2):513-537.
  129. Nogueira M. Box plot e diagrama ramos e folhas - Gráficos de estatística Ferramentas da Qualidade [Internet].Ebah.com.br.2016 .[citado a 14 Abril 2016]. Disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAABPqEAI/box-plot-diagrama-ramos-folhas>
  130. Tkac I, Dubinsky J, Keene C, Gruetter R, Low W. Neurochemical changes in Huntington R6/2 mouse striatum detected by in vivo<sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Journal of Neurochemistry.* 2006;100(5):1397-1406.
  131. Soares DLaw M. Magnetic resonance spectroscopy of the brain: review of metabolites and clinical applications. *Clinical Radiology.* 2009;64(1):12-21.

## Capítulo 7 - Anexo 1

**Tabela 1 - Valores das medições volumétricas nos 2 grupos da amostra para as 3 regiões de interesse**

Teste estatístico		
ROI		Volumes
Estriado	<i>Mann-Whitney U</i>	76.500
	<i>Wilcoxon W</i>	196.500
	Z	-1.244
	Sig. assintótica	.214
	Sig. exacta	.217
Hipocampo	<i>Mann-Whitney U</i>	101.000
	<i>Wilcoxon W</i>	206.000
	Z	-.175
	Sig. assintótica	.861
	Sig. exacta	.880
PFC	<i>Mann-Whitney U</i>	85.000
	<i>Wilcoxon W</i>	190.000
	Z	-.873
	Sig. assintótica	.383
	Sig. exacta	.400

**Tabela 2 - Valores do volume cerebral em cada região de interesse tendo em conta o género**

ROI	Grupo		Género	N	Mean rank
Estriado	WT	Volumes	M	6	7.83
			F	8	7.25
			Total	14	
	MJD	Volumes	M	4	7.50
			F	11	8.18
			Total	15	
Hipocampo	WT	Volumes	M	6	7.00
			F	8	7.88
			Total	14	
	MJD	Volumes	M	4	9.50
			F	11	7.45
			Total	15	
PFC	WT	Volumes	M	6	6.67
			F	8	8.13

	MJD	Volumes	Total	14	
			M	4	8.50
			F	11	7.82
			Total	15	

**Tabela 3 - Valores de volume cerebral em cada região de interesse tendo em conta o género**

Teste estatísticos			
ROI	Grupo		Volumes
Estriado	WT	<i>Mann-Whitney U</i>	22.000
		<i>Wilcoxon W</i>	58.000
		Z	-.258
		Sig. assintótica	.796
		Sig. exacta	.852
	MJD	<i>Mann-Whitney U</i>	20.000
		<i>Wilcoxon W</i>	30.000
		Z	-.261
		Sig. assintótica	.794
		Sig. exacta	.851
Hipocampo	WT	<i>Mann-Whitney U</i>	21.000
		<i>Wilcoxon W</i>	42.000
		Z	-.387
		Sig. assintótica	.699
		Sig. exacta	.755
	MJD	<i>Mann-Whitney U</i>	16.000
		<i>Wilcoxon W</i>	82.000
		Z	-.783
		Sig. assintótica	.433
		Sig. exacta	.489
PFC	WT	<i>Mann-Whitney U</i>	19.000
		<i>Wilcoxon W</i>	40.000
		Z	-.645
		Sig. assintótica	.519
		Sig. exacta	.573
	MJD	<i>Mann-Whitney U</i>	20.000
		<i>Wilcoxon W</i>	86.000
		Z	-.261
		Sig. assintótica	.794
		Sig. exacta	.851

**Tabela 4 - Correlação entre valores de volume cerebral em cada região de interesse tendo em conta a idade**

Correlações						
ROI	Grupo			Volumes	Idades	
Estriado	WT	Correlação de Spearman	Volumes	Coefficiente de correlação	1.000	.492
				Sig.	.	.062
				N	14	14
			Idades	Coefficiente de correlação	.492	1.000
				Sig.	.062	.
				N	14	14
	MJD	Correlação de Spearman	Volumes	Coefficiente de correlação	1.000	.212
				Sig.	.	.449
				N	15	15
			Idades	Coefficiente de correlação	.212	1.000
				Sig.	.449	.
				N	15	15
Hip	WT	Correlação de Spearman	Volumes	Coefficiente de correlação	1.000	.128
				Sig.	.	.662
				N	14	14
			Idades	Coefficiente de correlação	.128	1.000
				Sig.	.662	.
				N	14	14
	MJD	Correlação de Spearman	Volumes	Coefficiente de correlação	1.000	.595*
				Sig.	.	.025
				N	15	15
			Idades	Coefficiente de correlação	.595*	1.000
				Sig.	.025	.
				N	15	15
PFC	WT	Correlação de Spearman	Volumes	Coefficiente de correlação	1.000	.329
				Sig.	.	.251
				N	14	14
			Idades	Coefficiente de correlação	.329	1.000
				Sig.	.251	.
				N	14	14
	MJD	Correlação de Spearman	Volumes	Coefficiente de correlação	1.000	-.472
				Sig.	.	.075
				N	15	15
			Idades	Coefficiente de correlação	-.472	1.000
				Sig.	.075	.
				N	15	15

\*. A correlação é significativa para valores de 0,05.

**Tabela 5 - Valores do volume cerebral nas 3 regiões de interesse tendo em conta a idade (2 classes, menos de 75 dias e igual ou superior a 75 dias).**

Testes estatísticos			
ROI	Grupo		Volumes
Estriado	MJD	<i>Mann-Whitney U</i>	10.000
		<i>Wilcoxon W</i>	55.000
		Z	-2.003
		Sig. assintótica	.045
		Sig. exacta	.050
Hipocampo	MJD	<i>Mann-Whitney U</i>	6.000
		<i>Wilcoxon W</i>	51.000
		Z	-2.475
		Sig. assintótica	.013
		Sig. exacta	.012
PFC	MJD	<i>Mann-Whitney U</i>	14.000
		<i>Wilcoxon W</i>	35.000
		Z	-1.532
		Sig. assintótica	.126
		Sig. exacta	.145
2 classes de idades (75 dias)			

**Tabela 6 - Valores de GABA, Glu e rácio GABA/Glu nos 2 grupos da amostra para as 3 regiões de interesse**

Teste estatístico				
ROI		GABA	Glu	Rácio Gaba/Glu
Estriado	<i>Mann-Whitney U</i>	66.000	82.000	100.000
	<i>Wilcoxon W</i>	171.000	187.000	220.000
	Z	-1.702	-1.004	-.218
	Sig. assintótica	.089	.315	.827
	Sig. exacta	.093	.331	.847
Hipocampo	<i>Mann-Whitney U</i>	103.000	103.000	72.000
	<i>Wilcoxon W</i>	208.000	208.000	192.000
	Z	-.087	-.087	-1.440
	Sig. assintótica	.930	.930	.150
	Sig. exacta	.949	.949	.158
PFC	<i>Mann-Whitney U</i>	88.000	92.000	93.000
	<i>Wilcoxon W</i>	193.000	197.000	213.000
	Z	-.742	-.567	-.524
	Sig. assintótica	.458	.570	.600

	Sig. exacta	.477	.591	.621
--	-------------	------	------	------

**Tabela 7 - Valores de GABA, Glu e rácio GABA/GLU em cada região de interesse tendo em conta o género.**

ROI	Grupo		Género	N	Mean rank
Estriado	WT	GABA	M	6	8.50
			F	8	6.75
			Total	14	
		Glu	M	6	8.50
			F	8	6.75
			Total	14	
		Rácio Gaba/Glu	M	6	7.83
			F	8	7.25
			Total	14	
	MJD	GABA	M	4	9.00
			F	11	7.64
			Total	15	
		Glu	M	4	9.75
			F	11	7.36
			Total	15	
Rácio Gaba/Glu		M	4	6.50	
		F	11	8.55	
		Total	15		
Hipocampo	WT	GABA	M	6	9.17
			F	8	6.25
			Total	14	
		Glu	M	6	10.83
			F	8	5.00
			Total	14	
		Racio Gaba Glu	M	6	7.17
			F	8	7.75
			Total	14	
	MJD	GABA	M	4	8.25
			F	11	7.91
			Total	15	
		Glu	M	4	8.25
			F	11	7.91
			Total	15	
Rácio Gaba/Glu		M	4	7.25	
		F	11	8.27	
		Total	15		

PFC	WT	GABA	M	6	7.17
			F	8	7.75
			Total	14	
		Glu	M	6	7.33
			F	8	7.63
			Total	14	
		Rácio Gaba/Glu	M	6	7.17
			F	8	7.75
			Total	14	
	MJD	GABA	M	4	8.75
			F	11	7.73
			Total	15	
		Glu	M	4	10.50
			F	11	7.09
			Total	15	
Rácio Gaba/Glu		M	4	6.25	
		F	11	8.64	
		Total	15		

**Tabela 8 - Valores de GABA, Glu e rácio GABA/GLU em cada região de interesse tendo em conta o género.**

Teste estatístico					
ROI	Grupo		GABA	Glu	Rácio Gaba/Glu
Estriado	WT	<i>Mann-Whitney U</i>	18.000	18.000	22.000
		<i>Wilcoxon W</i>	54.000	54.000	58.000
		Z	-.775	-.775	-.258
		Sig. assintótica	.439	.439	.796
		Sig. exacta	.491	.491	.852
	MJD	<i>Mann-Whitney U</i>	18.000	15.000	16.000
		<i>Wilcoxon W</i>	84.000	81.000	26.000
		Z	-.522	-.914	-.783
		Sig. assintótica	.602	.361	.433
		Sig. exacta	.661	.412	.489
Hipocampo	WT	<i>Mann-Whitney U</i>	14.000	4.000	22.000
		<i>Wilcoxon W</i>	50.000	40.000	43.000
		Z	-1.291	-2.582	-.258
		Sig. assintótica	.197	.010	.796
		Sig. exacta	.228	.008	.852
	MJD	<i>Mann-Whitney U</i>	21.000	21.000	19.000
		<i>Wilcoxon W</i>	87.000	87.000	29.000

PFC		Z	-.131	-.131	-.392
		Sig. assintótica	.896	.896	.695
		Sig. exacta	.949	.949	.753
	WT	<i>Mann-Whitney U</i>	22.000	23.000	22.000
		<i>Wilcoxon W</i>	43.000	44.000	43.000
		Z	-.258	-.129	-.258
		Sig. assintótica	.796	.897	.796
		Sig. exacta	.852	.950	.852
		MJD	<i>Mann-Whitney U</i>	19.000	12.000
	<i>Wilcoxon W</i>		85.000	78.000	25.000
	Z		-.392	-1.306	-.914
	Sig. assintótica		.695	.192	.361
Sig. exacta	.753		.226	.412	

**Tabela 9 - Correlação entre valores de GABA, Glu e rácio GABA/Glu em cada região de interesse tendo em conta a idade**

Correlações								
ROI	Grupo			GABA	Glu	Rácio Gaba/Glu	Idades	
Estriado	WT	Correlação de Spearman	GABA	Coeficiente de correlação	1.000	.086	.873**	-.043
				Sig.	.	.771	.000	.884
				N	14	14	14	14
			Glu	Coeficiente de correlação	.086	1.000	-.389	-.421
				Sig.	.771	.	.169	.134
				N	14	14	14	14
			Rácio Gaba/Glu	Coeficiente de correlação	.873**	-.389	1.000	.135
				Sig.	.000	.169	.	.645
				N	14	14	14	14
	Idades	Coeficiente de correlação	-.043	-.421	.135	1.000		
		Sig.	.884	.134	.645	.		
		N	14	14	14	14		
MJD	Correlação de Spearman	GABA	Coeficiente de correlação	1.000	.829**	-.039	.710**	
			Sig.	.	.000	.889	.003	
			N	15	15	15	15	
		Glu	Coeficiente de correlação	.829**	1.000	-.486	.789**	

				Sig.	.000	.	.066	.000	
				N	15	15	15	15	
			Rácio Gaba/Glu	Coeficiente de correlação	-.039	-.486	1.000	-.427	
				Sig.	.889	.066	.	.112	
				N	15	15	15	15	
			Idades	Coeficiente de correlação	.710**	.789**	-.427	1.000	
				Sig.	.003	.000	.112	.	
				N	15	15	15	15	
Hipocampo	WT	Correlação de Spearman	GABA	Coeficiente de correlação	1.000	.332	.793**	-.523	
				Sig.	.	.246	.001	.055	
				N	14	14	14	14	
				Glu	Coeficiente de correlação	.332	1.000	-.174	-.257
			Sig.		.246	.	.553	.375	
			N		14	14	14	14	
				Rácio Gaba/Glu	Coeficiente de correlação	.793**	-.174	1.000	-.561*
			Sig.		.001	.553	.	.037	
			N		14	14	14	14	
				Idades	Coeficiente de correlação	-.523	-.257	-.561*	1.000
			Sig.		.055	.375	.037	.	
			N		14	14	14	14	
	MJD	Spearman's rho	GABA	Coeficiente de correlação	1.000	.950**	.800**	.796**	
				Sig.	.	.000	.000	.000	
				N	15	15	15	15	
				Glu	Coeficiente de correlação	.950**	1.000	.636*	.777**
			Sig.		.000	.	.011	.001	
			N		15	15	15	15	
				Rácio Gaba/Glu	Coeficiente de correlação	.800**	.636*	1.000	.552*
			Sig.		.000	.011	.	.033	
			N		15	15	15	15	
			Idades	Coeficiente de correlação	.796**	.777**	.552*	1.000	
Sig.				.000	.001	.033	.		
N				15	15	15	15		

PFC	WT	Correlação de Spearman	GABA	Coeficiente de correlação	1.000	.574*	.815**	-.372
				Sig.	.	.032	.000	.191
				N	14	14	14	14
			Glu	Coeficiente de correlação	.574*	1.000	.108	-.410
				Sig.	.032	.	.714	.145
				N	14	14	14	14
			Rácio Gaba/Glu	Coeficiente de correlação	.815**	.108	1.000	-.327
				Sig.	.000	.714	.	.254
				N	14	14	14	14
			Idades	Coeficiente de correlação	-.372	-.410	-.327	1.000
				Sig.	.191	.145	.254	.
				N	14	14	14	14
	MJD	Correlação de Spearman	GABA	Coeficiente de correlação	1.000	.850**	.396	.592*
				Sig.	.	.000	.143	.020
				N	15	15	15	15
			Glu	Coeficiente de correlação	.850**	1.000	-.100	.632*
				Sig.	.000	.	.723	.012
				N	15	15	15	15
			Rácio Gaba/Glu	Coeficiente de correlação	.396	-.100	1.000	-.132
				Sig.	.143	.723	.	.639
				N	15	15	15	15
			Idades	Coeficiente de correlação	.592*	.632*	-.132	1.000
				Sig.	.020	.012	.639	.
				N	15	15	15	15
**. A correlação é significativa para valores de 0,01.								
*. A correlação é significativa para valores de 0,05.								

**Tabela 10 - Valores de GABA, Glu e rácio GABA/Glu para as 3 regiões de interesse tendo em conta a idade (2 classes, menos de 75 dias e igual ou superior a 75 dias).**

ROI	Grupo		2 classes de idades (75 dias)	N	Mean rank
Estriado	WT	GABA	<75 dias	14	7.50
			=>75 dias	0	.00

		Glu	Total	14			
			<75 dias	14	7.50		
			=>75 dias	0	.00		
			Rácio Gaba/Glu	Total	14		
				<75 dias	14	7.50	
				=>75 dias	0	.00	
			MJD	GABA	<75 dias	9	5.00
					=>75 dias	6	12.50
					Total	15	
				Glu	<75 dias	9	5.00
					=>75 dias	6	12.50
					Total	15	
				Rácio Gaba/Glu	<75 dias	9	9.22
					=>75 dias	6	6.17
					Total	15	
Hipocampo			WT	GABA	<75 dias	14	7.50
					=>75 dias	0	.00
					Total	14	
	Glu			<75 dias	14	7.50	
				=>75 dias	0	.00	
				Total	14		
	Rácio Gaba/Glu	<75 dias		14	7.50		
		=>75 dias		0	.00		
		Total		14			
	MJD	GABA	<75 dias	9	5.00		
			=>75 dias	6	12.50		
			Total	15			
		Glu	<75 dias	9	5.00		
			=>75 dias	6	12.50		
			Total	15			
Rácio Gaba/Glu	<75 dias	9	6.00				
	=>75 dias	6	11.00				
	Total	15					
PFC	WT	GABA	<75 dias	14	7.50		
			=>75 dias	0	.00		
			Total	14			
		Glu	<75 dias	14	7.50		
			=>75 dias	0	.00		
			Total	14			
		Rácio Gaba/Glu	<75 dias	14	7.50		
			=>75 dias	0	.00		
			Total	14			

	MJD	GABA	Total	14	
			<75 dias	9	5.00
			=>75 dias	6	12.50
		Total	15		
		Glu	<75 dias	9	5.00
			=>75 dias	6	12.50
	Total		15		
	Rácio Gaba/Glu	<75 dias	9	7.89	
			=>75 dias	6	8.17
		Total	15		

**Tabela 11 - Valores de GABA, Glu e rácio GABA/Glu para as 3 regiões de interesse tendo em conta a idade (2 classes, menos de 75 dias e igual ou superior a 75 dias).**

Teste estatístico					
ROI	Grupo		GABA	Glu	Rácio Gaba/Glu
Estriado	MJD	<i>Mann-Whitney U</i>	.000	.000	16.000
		<i>Wilcoxon W</i>	45.000	45.000	37.000
		Z	-3.182	-3.182	-1.296
		Sig. assintótica	.001	.001	.195
		Sig. exacta	.000	.000	.224
Hipocampo	MJD	<i>Mann-Whitney U</i>	.000	.000	9.000
		<i>Wilcoxon W</i>	45.000	45.000	54.000
		Z	-3.182	-3.182	-2.121
		Sig. assintótica	.001	.001	.034
		Sig. exacta	.000	.000	.036
PFC	MJD	<i>Mann-Whitney U</i>	.000	.000	26.000
		<i>Wilcoxon W</i>	45.000	45.000	71.000
		Z	-3.182	-3.182	-.118
		Sig. assintótica	.001	.001	.906
		Sig. exacta	.000	.000	.955

**Tabela 12 - Correlação dos valores de GABA, Glu, rácio GABA/Glu e volume de cada região de interesse nos 2 grupos da amostra**

Correlações								
ROI	Grupo			GABA	Glu	Rácio Gaba/Glu	Volumes	
Estriado	WT	Correlação de Spearman	GABA	Coefficiente de correlação	1.000	.086	.873**	-.262

			Glu	Sig.	.	.771	.000	.366		
				N	14	14	14	14		
				Coeficiente de correlação	.086	1.000	-.389	-.231		
				Sig.	.771	.	.169	.427		
				N	14	14	14	14		
				Rácio Gaba/Glu	Coeficiente de correlação	.873**	-.389	1.000	-.134	
			Volumes	Sig.	.000	.169	.	.648		
				N	14	14	14	14		
				Coeficiente de correlação	-.262	-.231	-.134	1.000		
				Sig.	.366	.427	.648	.		
				N	14	14	14	14		
				MJD	Correlação de Spearman	GABA	Coeficiente de correlação	1.000	.829**	-.039
			Sig.				.	.000	.889	.362
			N				15	15	15	15
			Glu			Coeficiente de correlação	.829**	1.000	-.486	.132
						Sig.	.000	.	.066	.639
						N	15	15	15	15
			Rácio Gaba/Glu			Coeficiente de correlação	-.039	-.486	1.000	-.029
Sig.	.889	.066				.	.919			
N	15	15				15	15			
Volumes	Coeficiente de correlação	.254	.132			-.029	1.000			
	Sig.	.362	.639			.919	.			
	N	15	15			15	15			
Hipocampo	WT	Correlação de Spearman	GABA	Coeficiente de correlação	1.000	.332	.793**	-.235		
				Sig.	.	.246	.001	.418		
				N	14	14	14	14		

			Glu	Coeficiente de correlação	.332	1.000	-.174	-.244
				Sig.	.246	.	.553	.401
				N	14	14	14	14
			Rácio Gaba/Glu	Coeficiente de correlação	.793**	-.174	1.000	-.002
				Sig.	.001	.553	.	.994
				N	14	14	14	14
			Volumes	Coeficiente de correlação	-.235	-.244	-.002	1.000
				Sig.	.418	.401	.994	.
				N	14	14	14	14
	MJD	Correlação de Spearman	GABA	Coeficiente de correlação	1.000	.950**	.800**	.629*
				Sig.	.	.000	.000	.012
				N	15	15	15	15
			Glu	Coeficiente de correlação	.950**	1.000	.636*	.546*
				Sig.	.000	.	.011	.035
				N	15	15	15	15
Rácio Gaba/Glu			Coeficiente de correlação	.800**	.636*	1.000	.546*	
			Sig.	.000	.011	.	.035	
			N	15	15	15	15	
Volumes			Coeficiente de correlação	.629*	.546*	.546*	1.000	
			Sig.	.012	.035	.035	.	
			N	15	15	15	15	
PFC	WT	Correlação de Spearman	GABA	Coeficiente de correlação	1.000	.574*	.815**	.327
				Sig.	.	.032	.000	.253
				N	14	14	14	14
			Glu	Coeficiente de	.574*	1.000	.108	.112

				correlação				
				Sig.	.032	.	.714	.703
				N	14	14	14	14
			Rácio Gaba/Glu	Coeficiente de correlação	.815**	.108	1.000	.191
				Sig.	.000	.714	.	.513
				N	14	14	14	14
			Volumes	Coeficiente de correlação	.327	.112	.191	1.000
				Sig.	.253	.703	.513	.
				N	14	14	14	14
	MJD	Correlação de Spearman	GABA	Coeficiente de correlação	1.000	.850**	.396	-.204
				Sig.	.	.000	.143	.467
				N	15	15	15	15
			Glu	Coeficiente de correlação	.850**	1.000	-.100	-.096
				Sig.	.000	.	.723	.732
				N	15	15	15	15
			Rácio Gaba/Glu	Coeficiente de correlação	.396	-.100	1.000	-.139
				Sig.	.143	.723	.	.621
				N	15	15	15	15
			Volumes	Coeficiente de correlação	-.204	-.096	-.139	1.000
				Sig.	.467	.732	.621	.
				N	15	15	15	15
**. A correlação é significativa para valores de 0,01.								
*. A correlação é significativa para valores de 0,05.								

Tabela 13 - Valores de Aspartato nos 2 grupos da amostra para as 3 regiões de interesse

Teste estatístico		
Região de interesse		Asp
Hipocampo	Mann-Whitney U	17.000
	Wilcoxon W	72.000
	Z	-1.757

	Sig. assintótica	.079
	Sig. exacta	.088
PFC	<i>Mann-Whitney U</i>	27.000
	<i>Wilcoxon W</i>	118.000
	Z	-3.248
	Sig. assintótica	.001
	Sig. exacta	.001

**Tabela 14 - Valores de Aspartato em cada região de interesse tendo em conta o género**

ROI	Grupo		Género	N	Mean rank
Hipocampo	WT	Asp	M	4	7.00
			F	6	4.50
			Total	10	
	MJD	Asp	M	3	5.67
			F	4	2.75
			Total	7	
PFC	WT	Asp	M	5	6.80
			F	8	7.13
			Total	13	
	MJD	Asp	M	4	9.00
			F	11	7.64
			Total	15	

**Tabela 15 - Valores de Aspartato em cada região de interesse tendo em conta o género**

Teste estatístico			
ROI	Grupo		Asp
Hipocampo	WT	<i>Mann-Whitney U</i>	6.000
		<i>Wilcoxon W</i>	27.000
		Z	-1.279
		Sig. assintótica	.201
		Sig. exacta	.257
	MJD	<i>Mann-Whitney U</i>	1.000
		<i>Wilcoxon W</i>	11.000
		Z	-1.768
		Sig. assintótica	.077
		Sig. exacta	.114
PFC	WT	<i>Mann-Whitney U</i>	19.000
		<i>Wilcoxon W</i>	34.000
		Z	-.146
		Sig. assintótica	.884

		Sig. exacta	.943
	MJD	<i>Mann-Whitney U</i>	18.000
		<i>Wilcoxon W</i>	84.000
		Z	-.522
		Sig. assintótica	.602
		Sig. exacta	.661

**Tabela 16 - Correlação entre os valores de Aspartato em cada região de interesse tendo em conta a idade – Teste não paramétrico**

Correlações						
ROI	Grupo			Idades	Asp	
Hipocampo	WT	Correlação de <i>Spearman</i>	Idades	Coefficiente de correlação	1.000	.543
				Sig.	.	.105
				N	14	10
			Asp	Coefficiente de correlação	.543	1.000
				Sig.	.105	.
				N	10	10
	MJD	Correlação de <i>Spearman</i>	Idades	Coefficiente de correlação	1.000	.145
				Sig.	.	.756
				N	15	7
			Asp	Coefficiente de correlação	.145	1.000
				Sig.	.756	.
				N	7	7
PFC	WT	Correlação de <i>Spearman</i>	Idades	Coefficiente de correlação	1.000	.000
				Sig.	.	1.000
				N	14	13
			Asp	Coefficiente de correlação	.000	1.000
				Sig.	1.000	.
				N	13	13
	MJD	Correlação de <i>Spearman</i>	Idades	Coefficiente de correlação	1.000	.626*
				Sig.	.	.012
				N	15	15
			Asp	Coefficiente de correlação	.626*	1.000

				correlação		
				Sig.	.012	.
				N	15	15

\*. A correlação é significante para valores de 0,05.

**Tabela 17 - Valores de Aspartato para o hipocampo e PFC tendo em conta a idade (2 classes, menos de 75 dias e igual ou superior a 75 dias).**

ROI	Grupo		2 classes de idade (75 dias)	N	Mean rank
Hipocampo	WT	Asp	<75 dias	10	5.50
			=>75 dias	0	.00
			Total	10	
	MJD	Asp	<75 dias	5	3.40
			=>75 dias	2	5.50
			Total	7	
PFC	WT	Asp	<75 dias	13	7.00
			=>75 dias	0	.00
			Total	13	
	MJD	Asp	<75 dias	9	5.22
			=>75 dias	6	12.17
			Total	15	

**Tabela 18 - Valores de Aspartato para o hipocampo e PFC tendo em conta a idade (2 classes, menos de 75 dias e igual ou superior a 75 dias). Aplicação de Teste não paramétrico *Mann-Whitney U***

Teste estatístico			
ROI	Grupo		Asp
Hipocampo	MJD	<i>Mann-Whitney U</i>	2.000
		<i>Wilcoxon W</i>	17.000
		Z	-1.162
		Sig. assintótica	.245
		Sig. exacta	.381 <sup>b</sup>
PFC	MJD	<i>Mann-Whitney U</i>	2.000
		<i>Wilcoxon W</i>	47.000
		Z	-2.946
		Sig. assintótica	.003
		Sig. exacta	.002 <sup>b</sup>

**Tabela 19 - Correlação entre os valores de Aspartato no hipocampo e PFC tendo em conta o volume cerebral – Teste não paramétrico**

Correções						
ROI	Grupo			Volumes	Asp	
Hipocampo	WT	Correlação de Spearman	Volumes	Coefficiente de correlação	1.000	.018
				Sig.	.	.960
				N	14	10
			Asp	Coefficiente de correlação	.018	1.000
				Sig.	.960	.
				N	10	10
	MJD	Correlação de Spearman	Volumes	Coefficiente de correlação	1.000	.786*
				Sig.	.	.036
				N	15	7
			Asp	Coefficiente de correlação	.786*	1.000
				Sig.	.036	.
				N	7	7
PFC	WT	Correlação de Spearman	Volumes	Coefficiente de correlação	1.000	.247
				Sig.	.	.415
				N	14	13
			Asp	Coefficiente de correlação	.247	1.000
				Sig.	.415	.
				N	13	13
	MJD	Correlação de Spearman	Volumes	Coefficiente de correlação	1.000	-.204
				Sig.	.	.467
				N	15	15
			Asp	Coefficiente de correlação	-.204	1.000
				Sig.	.467	.
				N	15	15

\*. A correlação é significativa para valores de 0,05.

**Tabela 20 - Valores de Creatina total nos 2 grupos da amostra para as 3 regiões de interesse**

Teste estatístico		
Região de interesse		Cr_total
Estriado	Mann-Whitney U	76.000
	Wilcoxon W	181.000
	Z	-1.266
	Sig. assintótica	.206
	Sig. exacta	.217
Hipocampo	Mann-Whitney U	74.000
	Wilcoxon W	179.000

PFC	Z	-1.103
	Sig. assintótica	.270
	Sig. exacta	.285
	<i>Mann-Whitney U</i>	53.500
	<i>Wilcoxon W</i>	158.500
	Z	-2.248
	Sig. assintótica	.025
	Sig. exacta	.023

**Tabela 21 - Valores de Creatina total em cada região de interesse tendo em conta o género**

ROI	Grupo	Cr_total	Género	N	Mean rank
Estriado	WT	Cr_total	M	6	9.17
			F	8	6.25
			Total	14	
	MJD	Cr_total	M	4	11.00
			F	11	6.91
			Total	15	
Hipocampo	WT	Cr_total	M	6	11.17
			F	8	4.75
			Total	14	
	MJD	Cr_total	M	3	11.00
			F	11	6.55
			Total	14	
PFC	WT	Cr_total	M	6	8.17
			F	8	7.00
			Total	14	
	MJD	Cr_total	M	4	9.50
			F	11	7.45
			Total	15	

**Tabela 22 - Valores de Creatina total em cada região de interesse tendo em conta o género**

Teste estatístico			
ROI	Grupo		Cr_total
Estriado	WT	<i>Mann-Whitney U</i>	14.000
		<i>Wilcoxon W</i>	50.000
		Z	-1.291
		Sig. assintótica	.197
		Sig. exacta	.228
	MJD	<i>Mann-Whitney U</i>	10.000
		<i>Wilcoxon W</i>	76.000

Hipocampo		Z	-1.567
		Sig. assintótica	.117
		Sig. exacta	.138
	WT	<i>Mann-Whitney U</i>	2.000
		<i>Wilcoxon W</i>	38.000
		Z	-2.840
		Sig. assintótica	.005
		Sig. exacta	.003
		MJD	<i>Mann-Whitney U</i>
<i>Wilcoxon W</i>	72.000		
Z	-1.635		
Sig. assintótica	.102		
Sig. exacta	.126		
PFC	WT		<i>Mann-Whitney U</i>
		<i>Wilcoxon W</i>	56.000
		Z	-.516
		Sig. assintótica	.606
		Sig. exacta	.662
		MJD	<i>Mann-Whitney U</i>
	<i>Wilcoxon W</i>		82.000
	Z		-.783
			Sig. assintótica
		Sig. exacta	.489 <sup>b</sup>

**Tabela 23 - Correlação entre os valores de Creatina total nas 3 regiões de interesse tendo em conta a idade – teste não paramétrico**

Correlações						
ROI	Grupo			Idades	Cr_total	
Estriado	WT	Correlação de <i>Spearman</i>	Idades	Coefficiente de correlação	1.000	-.374
				Sig.	.	.188
				N	14	14
			Cr_total	Coefficiente de correlação	-.374	1.000
				Sig.	.188	.
				N	14	14
	MJD	Correlação de <i>Spearman</i>	Idades	Coefficiente de correlação	1.000	.739**
				Sig.	.	.002
				N	15	15
			Cr_total	Coefficiente de correlação	.739**	1.000
				Sig.	.002	.
				N	15	15
Hipocampo	WT	Correlação de <i>Spearman</i>	Idades	Coefficiente de correlação	1.000	.000
				Sig.	.	1.000

				N	14	14		
			Cr_total	Coeficiente de correlação	.000	1.000		
				Sig.	1.000	.		
				N	14	14		
	MJD	Correlação de Spearman	Idades	Coeficiente de correlação	1.000	.702**		
					Sig.	.	.005	
					N	15	14	
				Cr_total	Coeficiente de correlação	.702**	1.000	
					Sig.	.005	.	
					N	14	14	
PFC	WT	Correlação de Spearman	Idades	Coeficiente de correlação	1.000	-.081		
					Sig.	.	.783	
					N	14	14	
				Cr_total	Coeficiente de correlação	-.081	1.000	
					Sig.	.783	.	
					N	14	14	
		MJD	Correlação de Spearman	Idades	Coeficiente de correlação	1.000	.769**	
						Sig.	.	.001
						N	15	15
					Cr_total	Coeficiente de correlação	.769**	1.000
						Sig.	.001	.
						N	15	15

\*\* . A correlação é significativa para valores de 0,01.

**Tabela 24 - Valores de Creatina para as 3 regiões de interesse tendo em conta a idade (2 classes, menos de 75 dias e igual ou superior a 75 dias).**

ROI	Grupo		2 classes de idades (75 dias)	N	Mean rank
Estriado	WT	Cr_total	<75 dias	14	7.50
			=>75 dias	0	.00
			Total	14	
	MJD	Cr_total	<75 dias	9	5.00
			=>75 dias	6	12.50
			Total	15	
Hipocampo	WT	Cr_total	<75 dias	14	7.50
			=>75 dias	0	.00
			Total	14	
	MJD	Cr_total	<75 dias	8	4.50
			=>75 dias	6	11.50
			Total	14	
PFC	WT	Cr_total	<75 dias	14	7.50

			=>75 dias	0	.00
			Total	14	
	MJD	Cr_total	<75 dias	9	5.00
			=>75 dias	6	12.50
			Total	15	

**Tabela 25 - Valores de Creatina para as 3 regiões de interesse tendo em conta a idade (2 classes, menos de 75 dias e igual ou superior a 75 dias).**

Teste estatísticos			
ROI	Grupo		Cr_total
Estriado	MJD	<i>Mann-Whitney U</i>	.000
		<i>Wilcoxon W</i>	45.000
		Z	-3.182
		Sig. assintótica	.001
		Sig. exacta	.000
Hipocampo	MJD	<i>Mann-Whitney U</i>	.000
		<i>Wilcoxon W</i>	36.000
		Z	-3.098
		Sig. assintótica	.002
		Sig. exacta	.001
PFC	MJD	<i>Mann-Whitney U</i>	.000
		<i>Wilcoxon W</i>	45.000
		Z	-3.182
		Sig. assintótica	.001
		Sig. exacta	.000

**Tabela 26 - Correlação dos valores de Creatina total e volume de cada região de interesse nos 2 grupos da amostra – teste não paramétrico**

Correlações						
ROI	Grupo			Volumes	Cr_total	
Estriado	WT	Correlação de Spearman	Volumes	Coefficiente de correlação	1.000	-.468
				Sig.	.	.091
				N	14	14
		Cr_total	Coefficiente de correlação	-.468	1.000	
			Sig.	.091	.	
			N	14	14	
	MJD	Correlação de Spearman	Volumes	Coefficiente de correlação	1.000	.307
				Sig.	.	.265
				N	15	15
				Cr_total	Coefficiente de correlação	.307

				Sig.	.265	.
				N	15	15
Hipocampo	WT	Correlação de Spearman	Volumes	Coeficiente de correlação	1.000	-.270
				Sig.	.	.350
				N	14	14
			Cr_total	Coeficiente de correlação	-.270	1.000
				Sig.	.350	.
	MJD	Correlação de Spearman	Volumes	Coeficiente de correlação	1.000	.675**
				Sig.	.	.008
				N	15	14
			Cr_total	Coeficiente de correlação	.675**	1.000
				Sig.	.008	.
PFC	WT	Correlação de Spearman	Volumes	Coeficiente de correlação	1.000	.059
				Sig.	.	.840
				N	14	14
			Cr_total	Coeficiente de correlação	.059	1.000
				Sig.	.840	.
	MJD	Correlação de Spearman	Volumes	Coeficiente de correlação	1.000	-.232
				Sig.	.	.405
				N	15	15
			Cr_total	Coeficiente de correlação	-.232	1.000
				Sig.	.405	.
				N	15	15

\*\* A correlação é significativa para valores de 0,01.

Tabela 27 – Legenda mapa de cores

Perfeito	1
Forte	0,8 → 1
Moderado	0,5 → 0,8
Fraco	0,1 → 0,5
Ínfimo	0 → 0,1
Nulo	0
Ínfimo negativo	0 → -0,1
Fraco negativo	-0,1 → -0,5
Moderado negativo	-0,5 → -0,8
Forte negativo	-0,8 → -1
Perfeito	-1

**Tabela 28 – Mapa de cores grupo de controlo região do estriado**

	Ala	Asp	tCr	GABA	Glu	Glc	Gln	GPC	PCh	GSH	Ins	Lac	NAA	NAAG	Tau
Ala	Dark Red		Light Orange	Light Orange	Blue	Light Blue		Light Orange		Light Orange		Light Orange	Light Orange	Light Blue	Blue
Asp															
tCr	Light Orange		Dark Red	Light Orange	Light Orange	Red	Light Blue	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Blue	Light Orange	Light Orange	Light Orange
GABA	Light Orange		Light Orange	Dark Red	Light Orange	Light Orange	Light Blue	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange
Glu	Blue		Light Orange	Light Orange	Dark Red	Blue	Light Blue	Light Orange	Light Orange	Blue	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange
Glc	Light Blue		Red	Light Orange	Dark Red	Dark Red	Blue	Light Orange	Light Orange	Red	Light Orange	White	Dark Blue	Light Orange	Light Orange
Gln	Light Orange		Light Blue	Light Blue	Light Blue	Dark Red	Dark Red	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange
GPC	Light Orange		Light Orange	Light Orange	Light Orange	Blue	Light Orange	Dark Red	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Red	Light Orange	Light Orange	Light Orange
PCh	Light Orange		Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Dark Red	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange
GSH	Light Orange		Light Orange	Light Orange	Blue	Red	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Dark Red	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange
Ins	Light Orange		Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Dark Red	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange
Lac	Light Orange		Light Blue	Light Orange	Blue	White	Light Orange	Red	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Dark Red	Light Orange	Light Orange	Light Orange
NAA	Light Orange		Light Orange	Light Orange	Light Orange	Blue	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Dark Red	Light Orange	Light Orange
NAAG	Light Blue		Light Orange	Light Orange	Light Orange	White	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Dark Red	Light Orange
Tau	Light Blue		Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Dark Red

**Tabela 29 – Mapa de cores grupo de controlo região do hipocampo**

	Ala	Asp	tCr	GABA	Glu	Glc	Gln	GPC	PCh	GSH	Ins	Lac	NAA	NAAG	Tau
Ala	Dark Red	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Dark Red	Light Blue		Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange
Asp	Light Orange	Dark Red	Light Orange	Light Orange	Light Orange	White	Light Orange		Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Red	Light Orange
tCr	Light Orange	Light Orange	Dark Red	Light Orange	Red	Dark Red	Light Orange		Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange
GABA	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Dark Red	Light Orange	Dark Red	Light Orange		Light Orange	Blue	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange
Glu	Light Orange	Light Orange	Red	Light Orange	Dark Red	Dark Red	Light Orange		Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Red	Light Orange	Light Orange
Glc	Dark Red	White	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Dark Red		Dark Red	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Dark Red
Gln	Light Blue	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Dark Red	Dark Red		Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange
GPC															
PCh	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Dark Red	Light Orange		Dark Red	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange
GSH	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Dark Red	Light Orange		Light Orange	Dark Red	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange
Ins	Light Blue	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Dark Red	Light Orange		Light Orange	Light Orange	Dark Red	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange
Lac	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Dark Red	Light Orange		Light Orange	Light Orange	Light Orange	Dark Red	Light Orange	Light Orange	Light Orange
NAA	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Red	Dark Red	Light Orange		Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Dark Red	Light Orange	Light Orange
NAAG	Light Orange	Red	Light Orange	Light Orange	Light Orange	White	Light Orange		Light Orange	Light Orange	Light Orange	Dark Red	Light Orange	Dark Red	Light Orange
Tau	Light Orange	Light Orange	Red	Light Orange	Red	Dark Red	Light Orange		Light Orange	Light Orange	Red	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Dark Red

Tabela 30 – Mapa de cores grupo de controlo região do PFC

	Ala	Asp	tCr	GABA	Glu	Glc	Gln	GPC	PCh	GSH	Ins	Lac	NAA	NAAG	Tau
Ala	Dark Red	Light Red	Orange	Light Red	Orange	Dark Blue	Light Red	Dark Blue	Light Red	Light Blue	Light Red	Light Red	Light Red	Light Blue	Orange
Asp	Light Red	Dark Red	Light Red	Light Blue	Light Red	Light Blue	Light Red	Light Blue	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Dark Blue	Orange
tCr	Orange	Light Red	Dark Red	Light Red	Orange	Light Blue	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Blue	Dark Red
GABA	Light Red	Light Blue	Light Red	Dark Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red
Glu	Orange	Light Red	Orange	Light Red	Dark Red	Light Blue	Light Red	Light Blue	Orange	Light Blue	Light Red	Light Red	Light Red	Light Blue	Light Red
Glc	Dark Blue	Light Blue	Light Blue	Light Red	Light Blue	Dark Red	Light Blue	Dark Red	Light Blue	Orange	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Dark Red	Light Blue
Gln	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Blue	Dark Red	Dark Blue	Light Blue	Light Blue	Light Red	Light Red	Light Red	Dark Blue	Light Red
GPC	Dark Blue	Light Blue	Orange	Light Red	Light Blue	Dark Red	Dark Blue	Dark Red	Light Blue	Orange	Light Red	Light Blue	Light Blue	Dark Red	Dark Blue
PCh	Light Red	Orange	Light Red	Light Red	Orange	Light Blue	Light Red	Light Blue	Dark Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Dark Blue	Orange
GSH	Light Blue	Light Red	Light Red	Light Red	Light Blue	Orange	Light Red	Light Red	Light Red	Dark Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Blue	Light Red
Ins	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Blue	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Dark Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red
Lac	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Blue	Light Red	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Red	Dark Red	Light Red	Light Red	Light Red
NAA	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Blue	Light Red	Light Blue	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Dark Red	Light Red
NAAG	Light Blue	Dark Blue	Light Blue	Light Red	Light Blue	Dark Red	Dark Blue	Dark Red	Dark Blue	Light Blue	Light Red	Light Red	Light Red	Dark Red	Dark Blue
Tau	Orange	Orange	Dark Red	Light Red	Light Red	Light Blue	Light Red	Dark Blue	Orange	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Dark Red	Dark Red

Tabela 31 – Mapa de cores grupo MJD região do estriado

	Ala	Asp	tCr	GABA	Glu	Glc	Gln	GPC	PCh	GSH	Ins	Lac	NAA	NAAG	Tau
Ala	Dark Red	Light Red	Orange	Light Red	Orange	Dark Red	Orange	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Orange
Asp	Light Red	Dark Red	Dark Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Dark Blue	Light Red
tCr	Orange	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Orange	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Dark Red	Light Blue	Dark Red
GABA	Orange	Light Red	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Orange	Light Red	Dark Red	Light Red	Light Red	Light Red	Dark Red	Light Blue	Dark Red
Glu	Orange	Light Red	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Orange	Light Red	Dark Red	Light Red	Light Red	Light Red	Dark Red	Light Blue	Dark Red
Glc	Dark Red	Light Red	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Light Red	Dark Red	Light Red	Light Red	Light Red	Dark Red	Light Red	Dark Red
Gln	Orange	Orange	Orange	Light Red	Orange	Dark Red	Dark Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Blue	Orange
GPC	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red
PCh	Orange	Light Red	Orange	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Orange	Light Red	Dark Red	Light Red	Light Red	Light Red	Dark Red	Light Blue	Dark Red
GSH	Orange	Orange	Orange	Light Red	Dark Red	Dark Red	Orange	Light Red	Light Red	Dark Red	Light Red	Light Red	Light Red	Orange	Orange
Ins	Orange	Dark Red	Dark Red	Light Red	Orange	Dark Red	Orange	Light Red	Light Red	Light Red	Dark Red	Light Red	Dark Red	Light Blue	Dark Red
Lac	Orange	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Dark Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Light Red	Dark Red	Light Red	Light Blue	Orange
NAA	Orange	Light Red	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Orange	Light Red	Dark Red	Light Red	Light Red	Light Red	Dark Red	Light Blue	Dark Red
NAAG	Light Red	Dark Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Red	Light Blue	Light Red	Light Blue	Orange	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Dark Red	Light Blue
Tau	Orange	Light Red	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Orange	Light Red	Dark Red	Light Red	Light Red	Light Red	Dark Red	Light Blue	Dark Red

**Tabela 32 – Mapa de cores grupo MJD região do hipocampo**

	Ala	Asp	tCr	GABA	Glu	Glc	Gln	GPC	PCh	GSH	Ins	Lac	NAA	NAA G	Tau
Ala	Dark Red		Orange	Orange	Orange	Dark Red	Orange	Orange	Red	Red	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange
Asp															
tCr	Orange		Dark Red	Orange	Red	Dark Red	Orange	Orange	Red	Orange	Red	Orange	Orange	Light Orange	Red
GABA	Orange		Orange	Dark Red	Red	Dark Red	Orange	Red	Orange	Orange	Orange	Red	Orange	Orange	Orange
Glu	Orange		Red	Red	Dark Red	Blue	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Red	Orange	Orange
Glc	Dark Red		Dark Red	Dark Red	Blue	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Blue	Blue	Dark Red
Gln	Orange		Orange	Orange	Orange	Dark Red	Dark Red	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange
GPC	Orange		Orange	Red	Orange	Orange	Orange	Dark Red	Orange	Orange	Orange	Red	Orange	Orange	Light Orange
PCh	Red		Red	Orange	Orange	Dark Red	Orange	Orange	Dark Red	Orange	Red	Orange	Orange	Orange	Orange
GSH	Red		Orange	Orange	Orange	Dark Red	Orange	Orange	Dark Red	Dark Red	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange
Ins	Orange		Red	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Red	Orange	Dark Red	Orange	Orange	Light Orange	Red
Lac	Orange		Orange	Red	Orange	Dark Red	Orange	Red	Orange	Orange	Orange	Dark Red	Orange	Orange	Orange
NAA	Orange		Orange	Orange	Red	Blue	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Dark Red	Orange	Orange
NAA G	Orange		Light Orange	Orange	Orange	Blue	Orange	Orange	Orange	Orange	Light Orange	Orange	Orange	Dark Red	Light Orange
Tau	Orange		Red	Orange	Orange	Dark Red	Orange	Light Orange	Orange	Orange	Red	Orange	Orange	Light Orange	Dark Red

**Tabela 33 – Mapa de cores grupo MJD região do PFC**

	Ala	Asp	tCr	GABA	Glu	Glc	Gln	GPC	PCh	GSH	Ins	Lac	NAA	NAA G	Tau
Ala	Dark Red	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Blue	Light Orange	Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Orange	Light Blue	Light Orange
Asp	Light Orange	Dark Red	Orange	Orange	Orange	Light Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Light Orange	Light Orange	Orange	Orange	Orange
tCr	Light Orange	Orange	Dark Red	Red	Red	Red	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Light Orange	Red	Red	Orange
GABA	Light Orange	Orange	Red	Dark Red	Red	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Light Orange	Red	Light Orange	Orange
Glu	Light Orange	Orange	Red	Red	Dark Red	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Light Orange	Light Orange	Orange	Light Orange	Red
Glc	Light Blue	Light Orange	Red	Orange	Orange	Dark Red	Light Orange	Dark Red	Orange	Red	Orange	Light Orange	Red	Orange	Red
Gln	Light Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Light Orange	Dark Red	Orange	Orange	Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Orange	Light Orange
GPC	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Dark Red	Orange	Dark Red	Orange	Red	Light Orange	Light Orange	Red	Light Orange	Red
PCh	Light Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Dark Red	Orange	Orange	Light Orange	Orange	Orange	Orange
GSH	Light Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Red	Orange	Red	Orange	Dark Red	Orange	Light Orange	Orange	Orange	Orange
Ins	Light Orange	Light Orange	Orange	Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Orange	Orange	Dark Red	Light Orange	Orange	Orange	Light Orange
Lac	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Dark Red	Orange	Orange	Light Orange
NAA	Orange	Orange	Red	Red	Orange	Red	Light Orange	Red	Orange	Orange	Light Orange	Orange	Dark Red	Orange	Orange
NAA G	Light Blue	Orange	Red	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Orange	Orange	Light Orange	Light Orange	Orange	Dark Red	Light Orange
Tau	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Light Orange	Red	Red	Light Orange	Red	Orange	Orange	Light Orange	Light Orange	Orange	Light Orange	Dark Red