



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

DANILO RODRIGUES PEREIRA

TÉCNICAS PARA ANÁLISE DE DADOS DE ESPECTROSCOPIA MULTIVOXEL DE
PRÓTONS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA: ESTUDO APLICADO EM
ESPECTROS ADQUIRIDOS NA SUBSTÂNCIA BRANCA E NO HIPOCAMPO EM
PACIENTES COM ESCLEROSE SISTÊMICA

CAMPINAS

2021

DANILO RODRIGUES PEREIRA

TÉCNICAS PARA ANÁLISE DE DADOS DE ESPECTROSCOPIA MULTIVOXEL DE PRÓTONS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA: ESTUDO APLICADO EM ESPECTROS ADQUIRIDOS NA SUBSTÂNCIA BRANCA E NO HIPOCAMPO EM PACIENTES COM ESCLEROSE SISTÊMICA

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. SIMONE APPENZELLER

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO DANILO RODRIGUES PEREIRA, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. SIMONE APPENZELLER

CAMPINAS

2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

P414t Pereira, Danilo Rodrigues, 1984-
Técnicas para análise de dados de espectroscopia multivoxel de prótons por ressonância magnética : estudo aplicado em espectros adquiridos na substância branca e no hipocampo em pacientes com esclerose sistêmica / Danilo Rodrigues Pereira. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Simone Appenzeller.

Coorientador: Leticia Rittner.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Espectroscopia de ressonância magnética. 2. Escleroderma sistêmico. 3. Substância branca. 4. Hipocampo. I. Appenzeller, Simone, 1974-. II. Rittner, Leticia, 1972-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Techniques for analysis of proton magnetic resonance spectroscopic imaging data : a study using spectra acquired in the white matter and hippocampus in patients with systemic sclerosis

Palavras-chave em inglês:

Magnetic resonance spectroscopy

Scleroderma, Systemic

White matter

Hippocampus

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Simone Appenzeller [Orientador]

Mariana Pinheiro Bento

Cristiane Kayser Veiga da Silva

Eduardo Ferreira Borba Neto

Fabiano Reis

Data de defesa: 12-11-2021

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-3646-7246>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/0492144789074887>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

DANILO RODRIGUES PEREIRA

ORIENTADORA: PROFA. DRA. SIMONE APPENZELLER

COORIENTADORA: PROFA. DRA. LETICIA RITTNER

MEMBROS TITULARES:

1. PROFA. DRA. SIMONE APPENZELLER

2. DRA. MARIANA PINHEIRO BENTO

3. DRA. CRISTIANE KAYSER VEIGA DA SILVA

4. DR. EDUARDO FERREIRA BORBA NETO

5. PROF. DR. FABIANO REIS

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 12/11/2021

DEDICATÓRIA

À minha mãe (*in memoriam*), uma pessoa maravilhosa, batalhadora e mãe exemplar. Seus ensinamentos estarão sempre em meu coração.

AGRADECIMENTOS

Durante a realização deste trabalho, inúmeras pessoas foram importantes e me auxiliaram de forma direta ou indiretamente. Pessoas às quais serei profundamente grato e para as quais vou sempre manter profundo sentimento de gratidão e carinho:

Minha orientadora, prof^a Dra. Simone Appenzeller a quem admiro e como exemplo pessoal e profissional. Agradeço muito pela confiança e pela oportunidade de realizar esse projeto de pesquisa. Sou extremamente grato e feliz por ter feito parte da sua equipe de pesquisa.

Minha coorientadora, prof^a Dra. Leticia Rittner que me fez apaixonar pela área de Processamento de Imagens Médicas e Neurociências. Gostaria de agradecer todos seus ensinamentos, motivação, dedicação e paciência nesse longo período que trabalhamos juntos.

A equipe do Laboratório de Imagens Médicas e Computação (*Medical Image Computing Lab - MICLab*) da FEEC/Unicamp, liderados pelos professores Dr. Roberto Lotufo e Dra. Leticia Rittner.

Minha esposa Leonora Covre Lazdenas, agradeço todo seu amor, paciência e por estar sempre meu lado em todos os momentos.

Minha família: minha mãe Lucimar (*in memoriam*), meu pai Milton, meu irmão Edmilson e minha irmã Deise.

Os amigos do Laboratório de Reumatologia de FCM/Unicamp, em especial Renan Bazuco e Ana Carolina Londe.

Os amigos que conquistei durante a pós-graduação: Roberto Medeiros de Souza, Mariana Bento, Mariana Pereira, William Garcia Herrera, Irene Fantini, Livia Rodrigues, Giovana Cover, Gustavo Pinheiro, Diedre Carmo, Juliana Fontolan, Juliane Macedo, Mariana Freschi, Jaqueline Amorim, Jessica Vivaldo, Luciana Ramalho, Brunno Campos, Thiago Junqueira, Katyane Servelhere, Kauê Tartarotti, prof. Dr. Fernando Cendes, prof. Dr. Li Li Min, prof. Dr. Marcondes Cavalcante França, prof. Dr. Richard Frayne e Tiffany Bell.

À Faculdade de Ciências Médicas FCM/UNICAMP, pela excelente estrutura que oferece aos estudantes, pesquisadores e funcionários.

À Faculdade de Ciências Aplicadas FCA/Unicamp pelo suporte durante a realização desse projeto de doutorado.

Por fim, agradeço à Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, pela oportunidade e apoio. Serei eternamente grato pela oportunidade de estudar em uma excelente universidade e reconhecida mundialmente.

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

Introdução: A Esclerose Sistêmica (ES) é uma doença crônica, multisistêmica, caracterizada pelo espessamento e fibrose da pele e de órgãos internos, bem como anormalidades funcionais e estruturais de pequenos vasos, ativação do sistema imunológico e autoimunidade. O acometimento de sistema nervoso central (SNC) em pacientes com ES permanece pouco estudado e técnicas avançadas de ressonância magnética podem contribuir para melhor entendimento das manifestações de SNC na ES. A espectroscopia por ressonância magnética (ERM) é uma técnica não-invasiva para quantificação de compostos químicos (metabólitos), que permite obter informações neuroquímicas dos tecidos cerebrais, que possibilita analisar as alterações metabólicas em doenças neurológicas, autoimunes e tumores cerebrais.

Objetivos: Desenvolver novas técnicas para melhorar à análise, visualização, seleção de espectros de interesse e controle de qualidade dos dados adquiridos pela técnica de espectroscopia multivoxel por ressonância magnética. Adicionalmente, investigar alterações metabólicas na região supraventricular posterior e atrofia hipocampal em pacientes com esclerose sistêmica e determinar se existem associações com características clínicas, laboratoriais e de tratamento.

Métodos: Desenvolvemos uma metodologia para análise, visualização e controle de qualidade de dados de espectroscopia multivoxel por ressonância magnética em diferentes regiões do cérebro. A metodologia foi implementada em uma ferramenta computacional utilizando a linguagem de programação Python e com as principais funcionalidades: co-registro entre imagem estrutural e grade de espectros; análise baseada no conteúdo da imagem estrutural; seleção de espectros de interesse; e quantificação e mapa metabólico.

Resultados: Através da ferramenta foi possível identificar e selecionar automaticamente espectros com baixa qualidade espectral. Nos estudos clínicos (37 pacientes e 37 controles), observamos redução de NAA/Cr na região supraventricular posterior em pacientes quando comparados aos controles, associada ao comprometimento cognitivo, presença de enxaqueca, uso de prednisona e metotrexato durante o tratamento. O estudo de acompanhamento (*follow-up*) mostrou um aumento em Cho/Cr, associada à gravidade da doença,

queixas de memória, sintomas de ansiedade, uso de corrente de losartana e bromoprida. Também observamos redução em NAA/Cr no hipocampo em pacientes quando comparados aos controles, associados a comprometimento cognitivo, scores de MoCA, sintomas de ansiedade, presença de enxaqueca, queixas de memória e uso de imunossupressor durante o tratamento e correlacionado com a redução do hipocampo.

Conclusões: O desenvolvimento da ferramenta computacional possibilitou eficiência na análise dos dados e permitiu analisar alterações metabólicas em diferentes regiões do cérebro em pacientes com esclerose sistêmica.

Palavras-chave: Espectroscopia por ressonância magnética, esclerose sistêmica, substância branca, hipocampo.

ABSTRACT

Introduction: Systemic Sclerosis (SSc) is a chronic, multisystem disease, characterized by thickening and fibrosis of the skin and internal organs, as well as produced abnormalities and occurrences of small vessels, activation of the immune system and autoimmunity. Involvement of the central nervous system (CNS) in patients with SSc and advanced magnetic resonance techniques may contribute to better understanding of the CNS manifestations in SSc. Magnetic resonance spectroscopy (MRS) is a non-invasive technique used for quantification of chemical compounds (metabolites), which allows obtaining neurochemical information from brain tissues, which makes it possible to analyze how metabolic changes in diseases neurological, autoimmune and brain tumors.

Objectives: Develop new techniques to improve for analysis, visualization, selection of spectra of interest and quality control of data acquired by the technique of multivoxel magnetic resonance spectroscopy. Additionally, to investigate metabolic changes in the posterior supraventricular region and hippocampal atrophy in patients with systemic sclerosis and to determine if there are associations with clinical, laboratory and treatment characteristics.

Methods: We developed a methodology for analysis, visualization and quality control of MRSI data in different brain regions. The methodology was implemented in a computational tool using the Python programming language and with the main features: co-registration between anatomical image and grid of spectra; anatomical image content analysis; selection of spectra of interest; and quantification and metabolic map.

Results: Through the computational tool it was possible to automatically identify and select spectra with low spectral quality. In clinical studies (37 patients and 37 controls), we observed a reduction in NAA/Cr in the posterior supraventricular region in patients when compared to controls, associated with cognitive impairment, presence of migraine, use of prednisone and methotrexate during treatment. The follow-up study showed an increase in Cho/Cr, associated with disease severity, memory complaints, anxiety symptoms, current use of losartan and bromopride. We also observed a reduction in NAA/Cr in the hippocampus in patients compared to healthy controls, associated with cognitive impairment, anxiety symptoms, presence of migraine, memory complaints and use of immunosuppressants during treatment

and correlated with a reduction of the total hippocampus.

Conclusion: The development of the computational tool enabled efficient data analysis and allowed the analysis of metabolic changes in different regions of the brain in patients with systemic sclerosis.

Keywords: Magnetic resonance spectroscopy, systemic sclerosis, white matter, hippocampus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Espectros adquiridos do mesmo sujeito saudável. O volume de interesse (VOI) foi posicionado na região supraventricular posterior. À esquerda: Espectro adquirido com tempo de eco curto contendo os picos dos principais metabólitos. À direita: Espectro obtido com tempo de eco longo (direita) e visualização dos picos apenas dos metabólitos: NAA, Cr e Cho. Figura adaptada. ³⁵	29
Figura 2 - Ilustração das mudanças nas concentrações dos metabólitos NAA, Cr, Cho e ml, que ocorrem em sujeitos saudáveis, entre os primeiros dias de vida até a fase adulta. Figura adaptada. ³²	33
Figura 3 – Visão geral da ferramenta computacional e os principais módulos. ¹⁰⁵	42
Figura 4 – Módulo de interface do usuário (<i>user interface</i>): tela inicial da ferramenta computacional. ¹⁰³	43
Figura 5 – Visão geral do módulo <i>Processing Pipeline</i>	43
Figura 6 - Visão geral do módulo <i>Co-registration MRI / MRSI</i>	44
Figura 7 - Máscaras binárias de segmentação de tecidos cerebrais geradas através do software volBrain.....	45
Figura 8 - Seleção de espectros de interesse baseados em 2 diferentes técnicas: (a) Métricas de qualidade espectral (SNR, FWHM e CRLB). Em azul, espectros selecionados utilizando os valores $SNR > 10$; $FWHM < 10$, $CRLB < 50$; e (b) Similaridade usando correlação de Pearson. Em azul, espectros selecionados utilizando o valor de coeficiente ($r > 0,7$).....	47
Figura 9 – Tela principal da ferramenta computacional contendo as seguintes seções: a) <i>Co-registration MRI/MRSI</i> : Registro entre a imagem estrutural (MRI) e a grade de espectros (MRSI) adquirida no hipocampo esquerdo; b) <i>Metabolic map</i> : Distribuição espacial do metabólito TNAA, configurado com 75% de opacidade; c) <i>Spectra</i> : Visualização de um espectro da grade; e d) <i>Mask</i> : registro entre imagem estrutural, grade de espectros e máscara de segmentação do hipocampo.	49
Figura 10 - Registro entre imagem estrutural e a grade de espectros (63 espectros) posicionada no hipocampo direito.	51

Figura 11 - Registro entre imagem estrutural e a grade de espectros (63 espectros) posicionada no hipocampo esquerdo.....	51
Figura 12 - Registro entre imagem estrutural e a grade de espectros (208 espectros) posicionada no hipocampo (bilateral).....	52
Figura 13 - Registro entre imagem estrutural e grade de espectros (208 espectros) posicionada na região supraventricular posterior.....	52
Figura 14 - Registro entre imagem estrutural e grade do espectro (<i>single-voxel</i>) posicionado na região supraventricular posterior.....	52
Figura 15 – Registro entre a imagem estrutural, máscara binária de segmentação de substância branca gerada pelo <i>software</i> volBrain e grade dos espectros (208 espectros), posicionada na região supraventricular posterior.	53
Figura 16 - Registro entre a imagem estrutural, máscara binária de segmentação de substância cinzenta gerada pelo <i>software</i> volBrain e grade dos espectros (208 espectros), posicionada na região supraventricular posterior.	53
Figura 17 - Registro entre a imagem estrutural, máscara binária de segmentação de líquido cefalorraquidiano gerada pelo <i>software</i> volBrain e grade dos espectros (208 espectros), posicionada na região supraventricular posterior.	54
Figura 18 - Exemplo de uma das possíveis análises de conteúdo da imagem de ressonância magnética. A grade de espectros (208 espectros) foi adquirida da região supraventricular posterior. Esquerda: máscaras de tecido cerebral (GM, WM e CSF) gerada pelo <i>software</i> volBrain e utilizadas para a análise do conteúdo do VOI delimitado pela grade de espectros (retângulo preto). Direita: lista de alguns espectros do VOI e a respectiva porcentagem de tecidos cerebrais contidos em cada espectro.....	54
Figura 19 – Registro entre a imagem estrutural, máscara binária de segmentação do hipocampo gerada pelo <i>software</i> volBrain e grade dos espectros, posicionada na região do hipocampo (bilateral).	55
Figura 20 - Exemplo de uma das possíveis análises de conteúdo da imagem de ressonância magnética. A grade de espectros (208 espectros) foi adquirida na região do hipocampo (bilateral). Esquerda: máscaras do hipocampo direito e esquerdo	

(amarelo), gerada pelo *software* volBrain e utilizadas para a análise do conteúdo do VOI (retângulo branco); A direita: lista de espectros e a porcentagem de sobreposição com o hipocampo.....55

Figura 21 - Registro entre a imagem estrutural, máscara binária de segmentação do hipocampo gerada pelo *software* volBrain e grade dos espectros, posicionada na região do hipocampo esquerdo.56

Figura 22 - Exemplo de uma das possíveis análises de conteúdo da imagem de ressonância magnética. A grade de espectros (208 espectros) foi adquirida na região do hipocampo esquerdo. Esquerda: máscaras do hipocampo direito e esquerdo (amarelo) gerada pelo *software* volBrain e utilizadas para a análise do conteúdo do VOI (retângulo branco); A direita: lista de espectros e a porcentagem de sobreposição com o hipocampo.....56

Figura 23 – Espectros adquiridos na região supraventricular superior. Em azul, são os espectros considerados com boa qualidade espectral, selecionados usando métricas de qualidade espectral ($SNR > 10$, $CRLB < 50$ e $FWHM < 10$).57

Figura 24 – Espectros adquiridos na região supraventricular superior. Em azul, os espectros considerados boa qualidade espectral, selecionados através da técnica de similaridades de espectros usando Correlação de Pearson ($r > 0,7$).58

Figura 25 - Comparações dos valores das concentrações médias dos metabólitos NAA, Cr e Cho obtidos pela quantificação do espectro médio adquirido no hipocampo esquerdo, utilizando os seguintes critérios de seleção de espectros de interesse: Em laranja (a): todos os espectros; em rosa (b): apenas espectros com boa qualidade espectral usando $SNR > 10$, $CRLB < 50$ e $FWHM < 10$; em azul (c): espectros similares ao espectro central (Correlação de Pearson ($r > 0,5$); e em verde (d): apenas espectros pertencente a região do hipocampo esquerdo (parcialmente ou totalmente).58

Figura 26 - Comparações dos valores das concentrações dos metabólitos NAA, Cr e Cho, obtidos pela quantificação do espectro médio adquirido no hipocampo direito. Em laranja (a): todos os espectros; em rosa (b): apenas espectros com boa qualidade espectral ($SNR > 10$, $CRLB < 50$ e $FWHM < 10$); em azul (c): espectros similares ao espectro central (Correlação de Pearson ($r > 0,5$); e em verde (d):

apenas espectros pertencentes a região do hipocampo direito (parcialmente ou totalmente).59

Figura 27 - Comparações dos valores das concentrações dos metabólitos NAA, Cr e Cho, obtidos pela quantificação do espectro médio adquirido no hipocampo bilateral. Em laranja (a): todos os espectros; em rosa (b): apenas espectros com boa qualidade espectral (SNR > 10, CRLB < 50 e FWHM < 10); em azul (c): espectros similares ao espectro central (Correlação de Pearson ($r > 0,7$)); e em verde (d): apenas espectros pertencentes a região do hipocampo direito (parcialmente ou totalmente).59

Figura 28 - Comparações dos valores das concentrações dos metabólitos, obtidas pela quantificação do espectro médio adquirido na região supraventricular posterior. Em laranja (a): todos os espectros; em rosa (b): apenas espectros com boa qualidade espectral (SNR > 10, CRLB < 50 e FWHM < 10); e em azul (c): espectros similares ao espectro central (Correlação de Pearson ($r > 0,7$)).60

Figura 29 – Comparações entre os valores das concentrações dos metabólitos, obtidas pela quantificação: .SPAR/SDAT (todos os espectros) e .RAW (espectro médio – espectros selecionados usando Correlação de Pearson – $r > 0,5$).60

Figura 30 - Comparações entre os valores das concentrações dos metabólitos, obtidas pela quantificação: .SPAR/SDAT (todos os espectros) e .RAW (espectro médio – espectros selecionados usando Correlação de Pearson – $r > 0,5$).61

Figura 31 - Comparações entre os valores das concentrações dos metabólitos, obtidas pela quantificação: .SPAR/SDAT (todos os espectros) e .RAW (espectro médio – espectros selecionados usando Correlação de Pearson – $r > 0,7$).61

Figura 32 – Resultado da quantificação do espectro médio (.RAW) através do *software* TARQUIN. Espectros adquiridos no hipocampo (bilateral) e selecionados usando a técnica de similaridade (Correlação de Pearson - $r > 0,5$).....62

Figura 33 - Resultado da quantificação do espectro médio (.RAW) através do *software* TARQUIN. Espectros adquiridos no hipocampo (esquerdo) e selecionados usando a técnica de similaridade (Correlação de Pearson – $r > 0,5$).....62

Figura 34 - Distribuição espacial do metabolito NAA na região supraventricular posterior.63

Figura 35 - Distribuição espacial do metabolito Colina (Cho) na região do hipocampo (bilateral).63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação dos níveis de concentrações de metabólitos adquiridos na região supraventricular posterior entre pacientes com ES e controles.....	66
Tabela 2 - Comparação dos níveis de concentrações de metabólitos adquiridos no hipocampo (bilateral) entre pacientes com ES e controles	69
Tabela 3 - Comparação dos medidas volumétricas dos subcampos do hipocampo entre 37 pacientes com ES e 37 controles.....	70
Tabela 4 - Comparação das medidas volumétricas do hipocampo dos pacientes com ES e controles	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

¹H-MRS: do inglês, *proton magnetic resonance spectroscopy* (espectroscopia de prótons por ressonância magnética)

¹H-MRSI: do inglês, *proton magnetic resonance spectroscopic imaging* (espectroscopia multivoxel de prótons por ressonância magnética)

AVC: Acidente Vascular Cerebral

BAI: do inglês, *Beck's Anxiety Inventories* (Inventário de ansiedade de Beck)

BDI: do inglês, *Beck's Depression* (Inventário de depressão de Beck)

Cho: do inglês, choline (colina)

CSI: *Chemical shift imaging*

Cr: do inglês, creatine (creatina)

CRLB: *Cramér-Rao Lower Bounds*

CSF: do inglês, *cerebrospinal fluid* (líquido cefalorraquidiano ou líquido)

DFT: do inglês, *Discrete Fourier Transform* (Transformada Discreta de Fourier)

ERM: Espectroscopia por Ressonância Magnética

ES: Esclerose Sistêmica

FOV: do inglês, *field of view*

FWHM: *full width at half maximum*

Glu: do inglês *glutamate* (glutamato)

Gln: do inglês *glutamine* (glutamina)

Glx: *glutamine-glutamate complex*

GM: do inglês, *grey matter* (substância cinzenta)

jMUI: *Java based Magnetic Resonance User Interface*

Lac: do inglês *lactate* (lactato)

LcModel: *Linear Combination of MODEL spectra*

ml: do inglês *myo-inositol* (mio-inositol)

MoCA: *Montreal Cognitive Assessment*

MR: do inglês, *magnetic resonance* (ressonância magnética)

MRI: do inglês, *magnetic resonance imaging* (imagem por ressonância magnética)

MRS: do inglês, *magnetic resonance spectroscopy* (espectroscopia por ressonância magnética)

MRSI: do inglês, *magnetic resonance spectroscopic imaging* (imagens espectroscópicas)

NAA: do inglês, *N-acetylaspartate* (N-acetilaspártato)

NIfTI: *Neuroimaging Informatics Technology Initiative*

PRESS: *Point RESolved Spectroscopy*

ROI: do inglês, *region-of-interest* (região de interesse)

SSc: do inglês, *systemic sclerosis* (esclerose sistêmica)

SV: do inglês, *single-voxel* (voxel único)

SNR: do inglês, *signal to noise ratio* (razão sinal-ruído)

TARQUIN: *Totally Automatic Robust Quantitation in NMR*

TE: tempo de eco

TR: tempo de repetição

VOI: do inglês, *volume-of-interest* (volume de interesse)

WM: do inglês, *white matter* (substância branca)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1 Esclerose Sistêmica	23
1.1.1 Manifestações no Sistema Nervoso Central	24
1.2 Espectroscopia por Ressonância Magnética	26
1.2.1 Técnicas de aquisição dos dados	27
1.2.2 Espectro	28
1.2.3 Ferramentas para análise e quantificação	30
1.2.4 Principais neurometabólitos	31
2. OBJETIVOS	35
2.1 Geral	35
2.2 Específicos	35
3. METODOLOGIA	36
3.1 Tipo do estudo	36
3.2 Termo de consentimento	36
3.3 Seleção dos pacientes e controles da pesquisa	36
3.4 Dados clínicos, laboratoriais e tratamentos	37
3.5 Dados demográficos e características clínicas	38
3.6 Avaliação cognitiva de Montreal (MoCA)	38
3.7 Avaliação de sintomas de depressão (Inventário de Beck – BDI)	39
3.8 Avaliação de sintomas de ansiedade (Inventário de Beck – BAI)	39
3.9 Protocolo de aquisição (MRI e ¹ H-MRSI)	39
3.10 Segmentação dos tecidos cerebrais	40
3.11 Segmentação do hipocampo	41
3.12 Desenvolvimento de software	41
3.13 Análise estatísticas	50
4. RESULTADOS	51
4.1 Experimentos utilizando a ferramenta computacional	51

4.2 Estudos Clínicos	64
5. DISCUSSÃO GERAL	74
6. CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS	82
ANEXOS	98
Anexo 1: Documentos de aprovação no Comitê de Ética da Unicamp	98
Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	106
Anexo 3 - Avaliação Cognitiva de Montreal (MoCA)	111
Anexo 4 - Inventário de Depressão de Beck (BDI).....	112
Anexo 5 – Inventário de Ansiedade de Beck (BAI)	114

1. INTRODUÇÃO

Com os avanços das tecnologias relacionadas à ressonância magnética (RM), novas técnicas avançadas de neuroimagem surgiram aos longos dos últimos anos, nas quais podemos destacar: imagem por ressonância magnética, imagem de tensor de difusão, perfusão por ressonância magnética e espectroscopia por ressonância magnética.¹

Essas técnicas atualmente são utilizadas em pesquisas e também em estudos clínicos em diversas áreas da neurociências: identificação e classificação de tumores e lesões cerebrais; anormalidades cerebrais; aneurisma; acidente vascular encefálico (AVC); alterações estruturais, funcionais e metabólicas do cérebro; e também no diagnóstico e melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos em doenças neurodegenerativas, neurológicas, autoimunes e reumatológicas.¹

1.1 Esclerose Sistêmica

A Esclerose Sistêmica (ES) é uma doença crônica, multisistêmica, caracterizada pelo espessamento e fibrose da pele e de órgãos internos, bem como anormalidades funcionais e estruturais de pequenos vasos, ativação do sistema imunológico e autoimunidade.^{1,2} O grau de acometimento cutâneo subdivide a esclerose sistêmica em dois subtipos clínicos: limitado (comprometimento cutâneo distal aos cotovelos e joelhos) e difuso (acometimento proximal aos cotovelos e joelhos e comprometimento de tronco).³ O envolvimento multisistêmico da ES incluindo articulações, rins, pulmões, coração, o trato gastrointestinal, extensão do acometimento cutâneo e o envolvimento visceral são responsáveis pela diminuição da expectativa^{2,4,5} e qualidade de vida^{6,7}. Considerando algumas complicações, como ulcerações digitais, contraturas articulares, artrite, refluxo gastresofágico e fenômeno de Raynaud, a doença é também associada a sintomas crônicos de dor.⁸⁻¹⁰ Aproximadamente 75% dos pacientes com ES referem sintomas crônicos de dor, em geral, refratários ao tratamento. Níveis elevados de sintomas de depressão são encontrados em pacientes com doenças crônicas e sua prevalência é maior que a encontrada na população sadia.¹¹ Sofrimento

emocional, insatisfação com a vida, maior utilização do sistema de saúde e aumento de morbidade e mortalidade, estão associados a quadros depressivos nesses pacientes. Um número crescente de evidências sugere que os distúrbios de humor além de ser consequência da doença crônica, também exerce influência na saúde física, através de vias fisiológicas (distúrbios autonômicos e alterações da resposta imune), comportamentais, cognitivas e sociais.¹¹ Devido a baixa aderência ao tratamento, juntamente com hábitos prejudiciais à saúde e o maior isolamento social são prevalentes em pacientes com distúrbios de humor¹²⁻¹⁴. Sintomas psiquiátricos, incluindo ansiedade e depressão, foram relatados como consequência do tempo de doença em pacientes com ES. Os pacientes com ES têm maior risco de depressão devido à dor crônica, fadiga, insatisfação com a aparência, e incapacidade funcional.^{9,15}

1.1.1 Manifestações no Sistema Nervoso Central

O acometimento de sistema nervoso central (SNC) em pacientes com ES era considerado infrequente e, muitas vezes, secundário a hipertensão arterial, uremia, disfunção pulmonar e corticoterapia. Entretanto, acidentes vasculares cerebrais transitórios, isquêmicos e hemorragia cerebral foram descritas como consequências primárias da ES.¹⁶⁻²⁰ Apesar de um aspecto importante em doenças do colágeno, o acometimento do SNC na ES permanece pouco estudado, sendo sua prevalência e intensidade alvo de discussões. Evidências recentes suportam que o acometimento do SNC na ES não é incomum e pode ser assintomático e independente do tempo de doença.

Estudos com pacientes apresentando esclerodermia em “dente de sabre” identificaram, em exames de imagem por ressonância magnética, acometimento de substância branca.²¹⁻²² Em estudo de Sardanelli et al. (2005), foram avaliadas 14 mulheres com ES (24 a 74 anos e duração de doença entre 1- 12 anos), evidenciou-se 170 lesões (\geq a 2mm diâmetro) no grupo de pacientes e 13 no grupo controle ($p=0,011$).¹³ As lesões descritas nos pacientes com ES predominam em substância branca, subcorticais ou em regiões profundas do cérebro e são prioritariamente supratentoriais. Nos estudos de Mohammed et al. (2010 e 2011) lesões acima de 5 mm foram

identificadas exclusivamente em pacientes com ES quanto comparados ao grupo controle e estavam relacionadas a um acometimento vascular mais intenso (pacientes com Raynaud ativo apesar de tratamento com bloqueadores de canal de cálcio e/ou sildenafil). O acometimento infratentorial, de maneira similar, aconteceu somente no grupo de pacientes com ES e não no grupo controle. Apenas as lesões acima de 5 mm foram associadas a sintomas de SNC, como cefaleia, desmaios, depressão e convulsões e não houve relação entre a presença de lesões com o tempo de doença, idade, doença vascular pulmonar, doença intersticial pulmonar, grau de acometimento da pele, ou medicação.^{23,24} O número, tamanho e distribuição das lesões descritas na ES sugerem anormalidades em territórios supridos por ramos vasculares menores e perfurantes.²⁵⁻²⁷

Evidências crescentes ratificam que o acometimento vascular do SNC não é incomum e que ele pode ser assintomático e independe do tempo de doença.^{23,24} A etiologia das lesões é atribuída, pela maioria dos autores, à deposição de imunocomplexos afetando a vasculatura intracraniana, causando doença oclusiva. A patogênese dessas anormalidades cerebrais pode ser explicada por diferentes mecanismos, que podem agir individualmente ou em conjunto. O primeiro mecanismo envolve reações não-imunológicas, com atividade mediada celular, e produção de autoanticorpos. O segundo mecanismo é vascular, com alterações nas células endoteliais e na membrana basal, causando uma microangiopatia não inflamatória da vasa vasorum, uma tendência a agregação plaquetária, e lesão isquêmica do SNC consequente. O terceiro mecanismo envolve alterações do metabolismo do colágeno, proliferação de populações específicas de fibroblastos e invasão do tecido e fibrose.^{23,24}

Ao contrário dos casos de Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) e de vasculites, elevada incidência de acometimento clínico e subclínico do SNC foi largamente documentada e nos quais este acometimento denota uma doença mais grave e uma linha de tratamento mais agressiva; nas lesões da ES, a implicação clínica e prognóstico permanecem desconhecidos pela falta de estudos de longo prazo. Por fim, complicações cardiovasculares decorrentes de alterações prevalentes em nossa população, como dislipidemia e síndrome

metabólica, podem contribuir para as alterações de SNC na ES e carecem de estudos para sua comprovação.²⁴

1.2 Espectroscopia por Ressonância Magnética

A ressonância magnética (RM) foi descoberta em 1946 simultaneamente pelos vencedores do Prêmio Nobel de Física (1952) por Edward Mills Purcell, da Harvard University, e Felix Bloch, da Universidade de Stanford. Em 1991, Richard Robert Ernst recebeu o Nobel de Química, devido aos seus contributos para a RM de alta resolução e essas contribuições permitiram avanços na área da química através do desenvolvimento da espectroscopia ressonância magnética nuclear e na medicina com imagem por ressonância magnética (do inglês, *Magnetic Resonance Imaging, MRI*).²⁸

Espectroscopia por ressonância magnética (do inglês, *Magnetic Resonance Spectroscopy, MRS*) é uma técnica não-invasiva, usada na identificação e quantificação de compostos químicos, geralmente aminoácidos (metabólitos) com concentrações de 1-13 milimolar (mM). Segundo a literatura, o primeiro experimento no cérebro humano usando MRS foi realizado entre 1987 e 1988.^{28,29}

MRS utiliza as propriedades magnéticas de alguns núcleos atômicos: ¹³C, ³¹P e ¹⁹F, entretanto o ¹H é o mais utilizado devido à sua abundância em tecidos biológicos e maior sensibilidade de sinal.³⁰

Atráves da ¹H-MRS é possível obter informações neuroquímicas dos tecidos cerebrais, que permite analisar as alterações metabólicas em uma variedade de doenças neurológicas³¹⁻³⁴, reumáticas autoimunes³⁵ e tumores cerebrais³⁶⁻³⁸. Durante a análise dos valores de concentrações de metabólitos obtidas pela MRS, é fundamental que seja levado em considerações fatores como: parâmetros de aquisição, prontuário médico dos indivíduos e região do cérebro analisada.^{28,29}

Nos últimos anos, muitos esforços vêm sendo aplicados e novas ferramentas e metodologias estão sendo desenvolvidas pela comunidade científica, com o objetivo de melhorar a análise, visualização, controle de qualidade e melhor interpretação dos dados espectroscópicos, para que de fato, a ¹H-MRS possa ser largamente utilizada em ambientes clínicos.³⁹

1.2.1 Técnicas de aquisição dos dados

A aquisição dos dados em ^1H -MRS é considerada muitas vezes, uma tarefa complexa e desafiadora, devido à problemas de sensibilidade à movimento, inadequada supressão de água, contaminação por sinais indesejados, baixa razão sinal/ruído e outros artefatos comumente encontrados.⁴⁰

Quase sempre a aquisição começa após a formação da imagem estrutural (MRI), afim de usá-la como referência para o posicionamento do volume de interesse (VOI) na região do tecido ou estrutura cerebral onde serão adquiridos os espectros.

As técnicas de aquisição dos dados são classificadas em 2 grupos: voxel único (do inglês, *SVS - Single Voxel Spectroscopy*) e ou imagens espectroscópicas (do inglês *MRSI - Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging* ou *CSI - Chemical Shift Imaging*).

Na técnica SVS, a aquisição resulta em um único espectro, de alta qualidade e boa homogeneidade do campo magnético. Uma vantagem dessa técnica está relacionada ao curto tempo de aquisição, em torno de 2-5 minutos. Por outro lado, na aquisição dos dados usando MRSI, o VOI é dividido em vários voxels menores possibilitando a aquisição de um conjunto de espectros simultaneamente. A vantagem da técnica MRSI é permitir analisar a distribuição espacial dos metabólitos (mapa metabólico) na região de interesse. O tempo de aquisição dos dados em MRSI varia entre 10-15 minutos.

Os longos tempos de aquisição em MRSI, dificultam a aplicabilidade clínica devido ao desconforto do paciente, aumento de custos e artefatos de movimentos. Estratégias de aquisição mais rápidas podem resolver essas limitações e poderia aumentar a adoção de MRSI, com alterações mínimas aos atuais protocolos de aquisição de imagens anatômicas (MRI).^{41,42}

Cada técnica tem suas vantagens e desvantagens, e a escolha da técnica a ser utilizada, vai depender do propósito do estudo; tipo da doença e/ou tumores cerebrais; e também determinada região do cérebro (tecido ou estrutura) na qual se pretende analisar as alterações bioquímicas.

1.2.2 Espectro

Os princípios físicos da espectroscopia por ressonância magnética (MRS) são semelhantes aos da formação da imagem estrutural (MRI), entretando, ao invés de imagem estrutural, o sinal adquirido pelo equipamento (*scanner*) de ressonância magnética é transformado em um sinal contendo picos em diferentes frequências. O sinal adquirido é comumente representado por um gráfico, também chamado de espectro. Os metabólitos são representados por picos, distribuídos em diferentes frequências. A área do pico com base na altura e largura, é proporcional ao número relativo de prótons. Esta área é diretamente proporcional à concentração do metabólito³². O eixo horizontal (x) do espectro representa o deslocamento químico, ou seja, a frequência de ressonância de um núcleo em relação ao núcleo de referência. O eixo vertical (y) exibe a amplitude relativa do sinal, indicando a concentração do metabólito, expressa em partes por milhão (ppm). A escala de ppm simplesmente reflete a magnitude das intensidades de campo magnético típicas usadas para MRS, que está na ordem de 10^6 ou um milhão de Hertz (Hz). Esta propriedade permite uma padronização da atribuição de metabólitos independentemente da intensidade do campo que o espectro foi adquirido. O pico do metabólito N-acetil-aspartato (NAA) sempre aparece na frequência 2.02 ppm, independente se o sinal foi medido em um equipamento de ressonância magnética de 1,5T, 3T, 7T ou superior. Para aplicações clínicas, o metabólito mio-inositol (mi) é o único metabólito onde a atribuição e aparência espectral podem mudar devido a força do campo magnético.⁴³

a) *Short x Long TE*

¹H-MRS pode ser obtida utilizando diferentes tempos de eco (curto ou longo), que resulta em espectros distintos (Fig. 1).^{30,32,44} Protocolos de aquisição com longos tempos de eco (*Long TE* \approx 135-288 ms) detectam apenas os principais neurometabólitos: NAA, Cr e Cho. Usando tempo de eco curto (*Short TE* \approx 20-35 ms), permite-se detectar linhas espectrais de um número maior de metabólitos (por exemplo, mio-inositol (mi), glutamina/glutamato, lactato, GABA).⁴³ Portanto, a escolha do parâmetro por

tempo de eco (TE) curto ou longo, vai depender dos metabólitos de interesse do estudo clínico ou experimento.

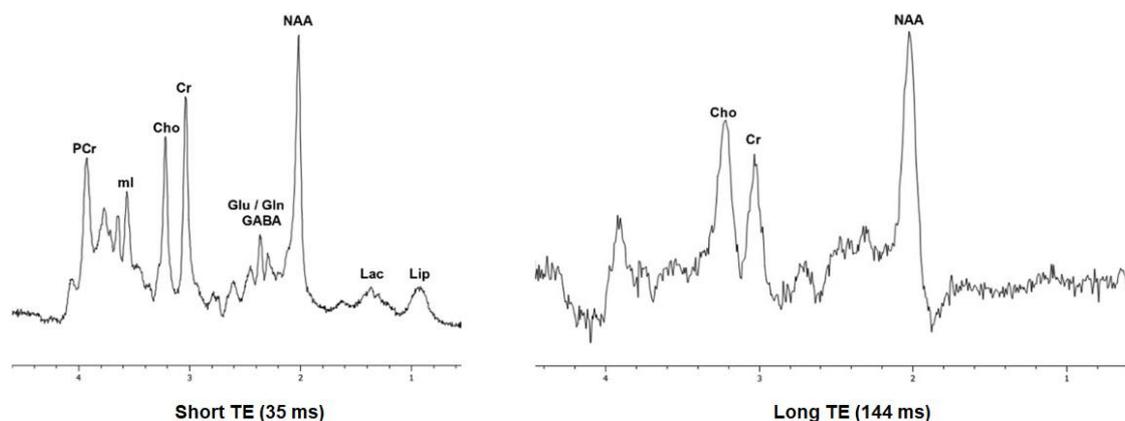


Figura 1 - Espectros adquiridos do mesmo sujeito saudável. O volume de interesse (VOI) foi posicionado na região supraventricular posterior. À esquerda: Espectro adquirido com tempo de eco curto contendo os picos dos principais metabólitos. À direita: Espectro obtido com tempo de eco longo (direita) e visualização dos picos apenas dos metabólitos: NAA, Cr e Cho. Figura adaptada.³⁵

b) Influência de *hardware* e *software* entre os fabricantes de equipamentos de ressonância magnética

Um estudo recente, analisou dados de espectroscopia (*single-voxel*) por ressonância magnética ^1H -MRS do cérebro de 296 participantes saudáveis (homens e mulheres) de diferentes países. Os voxels foram posicionados na mesma região e mesmo parâmetros de aquisição em todos os participantes (lobo parietal medial; *short TE* = 35ms; e VOI = 30 x 30 x 30 mm³) utilizando 3 diferentes fabricantes de *scanners* de RM de 3T (GE, Philips e Siemens). O estudo demonstrou que os níveis de concentração dos metabólitos quantificados tiveram variância total entre de 0 a 27%.⁴⁵

Portanto, é recomendável que análises comparativas de concentrações de metabólitos sejam realizadas apenas através de dados de espectroscopia por ressonância magnética, adquiridos pelo mesmo fabricante de *scanner* de RM, pelo fator que podem existir variações dos valores de concentrações dos metabólitos, adquiridos em diferentes tipos de *scanner*, e essas variações podem prejudicar a análise e interpretação dos resultados.

c) Influência do campo magnético

Na última década, dados de ^1H -MRS utilizando scanner de RM de 1,5T e 3T começou a ser usado rotineiramente para exames clínicos. Os espectros adquiridos utilizando scanners de RM com 3T tem uma melhor qualidade espectral (melhor relação-sinal-ruído) e curto tempo de aquisição, quando comparado à espectros adquiridos usando *scanners* de RM de 1,5T.^{30,32,33}

O crescente interesse na ressonância magnética de alta resolução (acima de 3T), está relacionado à melhora nos resultados clínicos no que diz respeito aos aspectos morfológicos, bem como funcionais e metabólicos.⁴⁶⁻⁴⁸ O aumento da relação sinal-ruído e maior resolução em comparação com *scanners* de RM convencionais, permitem obter imagens com mais detalhes anatômicos e também dados espectroscópicos com mais qualidade espectral. Uma melhor resolução espacial aumenta a distância entre os picos, tornando mais fácil distinguir entre eles³². Este aspecto é importante, particularmente para ressonâncias de *spins* dos metabólitos como glutamato, glutamina e mio-inositol. No entanto, a largura da linha dos metabólitos também aumenta no campo magnético mais alto por causa de um tempo de relaxamento T2 acentuadamente aumentado.^{30,32}

Estudos recentes demonstraram que utilizando campo magnético de alta resolução⁴⁶⁻⁴⁹, é possível obter espectros com alta qualidade espectral e a também obter valores de concentrações dos metabólitos mais precisos, o que permitirá o estudo de alterações neuroquímicas no cérebro com mais detalhes em diversos tipos de doenças neurológicas.

1.2.3 Ferramentas para análise e quantificação

Inúmeras ferramentas de pré-pós processamento, análise, visualização, controle de qualidade e quantificação de dados MRS/MRSI são encontradas na literatura.⁵⁰⁻⁶⁸ No entanto, principalmente devido à sua indisponibilidade (desenvolvidos localmente pelos grupos de pesquisas), dificuldade de instalação, interface gráfica não amigável e falta de documentação detalhada, essas ferramentas ainda não estão sendo amplamente utilizadas em rotinas clínicas.

Entretanto, algumas dessas ferramentas se destacam, sendo

consideradas padrão ouro e são amplamente aceitas atualmente dentro da comunidade científica de MRS: LCModel (*Linear Combination of MODEL spectra*⁵⁰), jMRUI (*Java based Magnetic Resonance User Interface*⁵⁷) e TARQUIN (*Totally Automatic Robust Quantitation in NMR*)⁵⁸.

O LCModel é o software gratuito e mais utilizado na análise e quantificação de dados MRS/MRSI *in vivo* ou *in vitro*. A ideia principal desta ferramenta é que alguns metabólitos ressonam em diferentes frequências do espectro. Dessa forma, o método define funções específicas para cada metabólito, as quais podem ser combinadas linearmente para ajustar os dados.

O software jMRUI é gratuito e permite o processamento de dados MRS/MRSI usando vários métodos (AMARES - *Advanced Method for Accurate, Robust, and Efficient Spectral Fitting*, AQSES – *Automated Quantitation of Short Echotime MRS Spectra*, and QUEST – *quantitation based on QUantum ESTimation*).

TARQUIN é uma ferramenta de análise para determinar automaticamente as quantidades de moléculas presentes nos dados de MRS/MRSI e tem os seguintes recursos: Gratuito para usar e modificar sob a licença GPL; fornece quantificação rápida e de dados MRS/MRSI de diversos fabricantes e formatos (DICOM, Siemens, Philips, GE, Varian, Bruker e ASCII format); disponível para os sistemas operacionais Windows, Linux e Mac OS; e inclui uma interface gráfica (GUI) e interface de linha de comando (*prompt*) para análises individuais e em lote.

1.2.4 Principais neurometabólitos

Diferentes metabólitos podem ser detectados com espectroscopia de ressonância magnética e seus papéis biológicos podem ser usados para fornecer uma visão fisiopatológica para diagnóstico e monitoramento de tratamento de diversos tipos de doenças. O conhecimento sobre os níveis de concentrações dos neurometabolitos adquiridos nos tecidos durante o envelhecimento normal^{30,31,34} é um pré-requisito para a identificação e análise das alterações metabólicas cerebrais causadas por processos neurodegenerativos³². Vários metabolitos podem ser identificados através da técnica de MRS e alguns são bastante usados em estudos clínicos: N-acetil-

aspartato (NAA), colina (Cho), creatina e fosfocreatina (tCr), glutamato (Glu) e glutamina (Gln), mio-inositol (ml)⁴².

- **N-acetil-aspartato (NAA):** Considerado um biomarcador da integridade das células neuronais,^{31,32,69} o NAA é um aminoácido presente no cérebro em altas concentrações e é encontrado nos neurônios. Ausência ou diminuição da concentração de NAA é um sinal de perda ou degradação neuronal⁶. Destruição neuronal de neoplasias, tumores e lesões na substância branca resultam em diminuição na concentração de NAA. O NAA produz o maior pico no espectro (2.02 ppm) e sua concentração diminui na maioria dos distúrbios do sistema nervoso central (SNC) em adultos.^{30,69,70} As mudanças na concentração do NAA com o envelhecimento normal ainda não são totalmente compreendidas.⁷¹

- **Creatina (Cr)** é encontrada principalmente no cérebro, músculos e sangue e considerado biomarcador de sistemas energéticos e intracelulares. O pico da Cr no espectro é atribuído em 3.02 ppm. Este pico representa uma combinação de moléculas contendo creatina e fosfocreatina. Cr é relativamente constante em todo o cérebro e sua concentração é relativamente estável e não apresenta mudanças com a idade e nem em uma grande variedade de patologias. Cr é considerada uma referência interna e os resultados são apresentados na proporção (metabólito / Cr).^{30,32,33} Em estudos clínicos, recomenda-se usar Cr para corrigir artefatos e variações de intensidades de sinal durante devido à falta de homogeneidade do campo magnético.

- **Cholina (Cho):** é um marcador de renovação da membrana celular (síntese e degradação de fosfolípidios) refletindo a proliferação celular. O pico da Cho é atribuído a 3.22 ppm e representa a soma de colina e compostos contendo colina (por exemplo, fosfocolina). Em tumores cerebrais, os níveis de Cho são correlacionados com o grau de malignidade refletindo celularidade. Aumento de Cho pode ser observado no infarto (de gliose ou dano isquêmico à mielina) ou inflamação (proliferação glial). Por esta razão, Cho é considerado inespecífico.³²

- **Glutamato-glutamina (Glx)** é um importante neurotransmissor excitatório e também desempenha um papel no ciclo redox. Glx tem picos complexos de glutamato, glutamina e ácido g-aminobutírico (GABA) atribuídos

em 2.05 e 2.50ppm respectivamente. Elevada concentração de Glx é encontrada em algumas doenças, como encefalopatia hepática.^{30,32}

- **Mio-inositol (ml):** é um açúcar com pico na frequência 3.56 ppm e é considerado um marcador glial porque é principalmente sintetizado em células gliais, quase apenas em astrócitos. O metabolito ml pode representar um produto de degradação da mielina. Altas concentrações de ml ocorrem com proliferação de células gliais ou com aumento do tamanho das células gliais, como encontrado na inflamação. Os níveis de ml são elevados na gliose, astrocitose e doença de Alzheimer.³²

a) Mudanças nos níveis de concentrações relacionadas à idade

Existem diversos estudos clínicos demonstrando que os níveis de concentrações dos metabólitos do cérebro se alteram ao longo dos anos em sujeitos saudáveis.^{30,32,71-81} Durante os 2-3 primeiros anos de desenvolvimento do cérebro, os níveis dos metabólitos variam principalmente devido ao processo de mielinização.⁷⁰ Os níveis de metabolito mio-inositol (ml) em recém-nascidos são altos, mas normalmente se estabilizam entre 4 e 6 meses. Os níveis de concentração do NAA e Cho são baixos, mas aumenta nos primeiros 2 anos de vida (Fig. 2).

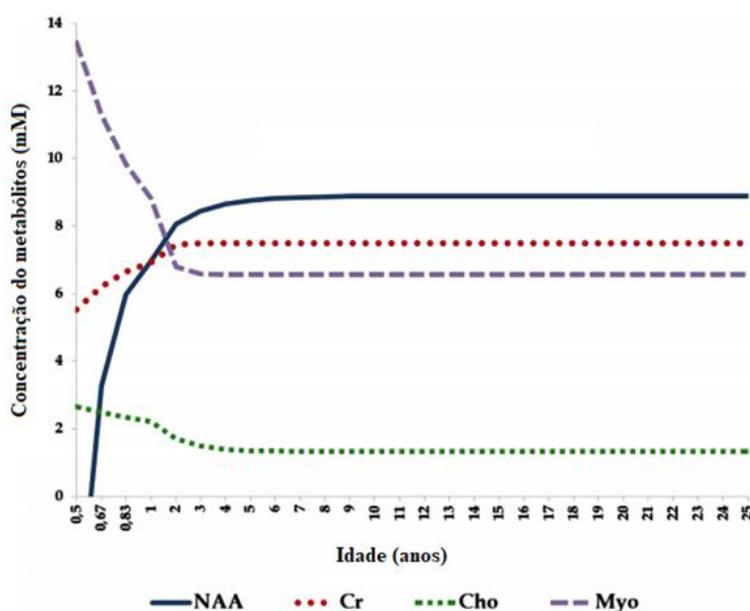


Figura 2 - Ilustração das mudanças nas concentrações dos metabólitos NAA, Cr, Cho e Myo, que ocorrem em sujeitos saudáveis, entre os primeiros dias de vida até a fase adulta. Figura adaptada.³²

b) Níveis de concentrações na substância branca e substância cinzenta

Estudos clínicos em sujeitos pediátrico e adultos, observaram diferenças na concentração de alguns metabólitos adquiridos na substância cinzenta e na substância branca.^{74,80,82-84} Os resultados obtidos pela maioria desses estudos, encontraram maior concentração de NAA, Cr e ml na substância cinzenta em comparação a substância branca. A concentração média de colina total (tCho) foi significativamente maior na substância branca em comparação com a substância cinzenta.

c) Níveis de concentrações no hipocampo

Mudanças nos níveis de concentrações dos metabólitos, relacionadas à idade foram relatadas por vários estudos. No entanto, a maioria desses estudos, foram realizados em regiões do cérebro que não são particularmente conhecidas por um envolvimento no funcionamento da memória declarativa, como por exemplo o hipocampo. Alguns estudos encontrados na literatura,^{75,85,86} analisaram as alterações metabólicas no hipocampo em sujeitos saudáveis e demonstraram que a concentração das razões NAA/Cr e Cho/Cr diminuíram significativamente com o avançar da idade e sem efeito significativo por sexo e gênero.

Até o momento, não existe estudo na literatura sobre alterações metabólicas no hipocampo em pacientes com Esclerose Sistêmica utilizando a técnica de espectroscopia por ressonância magnética. Entretanto, podemos encontrar os estudos que analisam as alterações dos neurometabólitos em algumas doenças como Alzheimer^{87,88} e Epilepsia.^{89,90}

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Desenvolver novas técnicas para melhorar as estimativas das concentrações de metabólitos, análise, visualização, controle de qualidade e seleção de espectros de interesse adquiridos pela técnica de espectroscopia multivoxel por ressonância magnética.

2.2 Específicos

- Desenvolver uma metodologia para análise e visualização dos dados de espectroscopia multivoxel adquiridas em diferentes regiões do cérebro.
- Identificar e selecionar automaticamente espectros com baixa qualidade espectral através de métricas de qualidade espectral e similaridade usando Correlação de Pearson.
- Implementar as técnicas de análise e controle de qualidade de espectros em uma ferramenta computacional de fácil uso e código aberto.
- Investigar alterações metabólicas na substância branca em pacientes com esclerose sistêmica, utilizando ^1H -MRSI e determinar se existem associações com características clínicas, laboratoriais e de tratamento.
- Investigar alterações metabólicas e volume hipocampal em pacientes com esclerose sistêmica utilizando MRI e ^1H -MRSI, e determinar se existem associações com características clínicas, laboratoriais e de tratamento.

3. METODOLOGIA

3.1 Tipo do estudo

Trata-se de um estudo longitudinal composto de grupo de pacientes e controles (Anexo 1).

3.2 Termo de consentimento

Todos os pacientes e voluntários foram previamente informados e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCM – UNICAMP (CAAE: 80872917.4.0000.5404 e Parecer nº 2.514.166) (Anexo 2).

3.3 Seleção dos pacientes e controles da pesquisa

O presente trabalho, trata-se de um estudo longitudinal que inclui 37 pacientes consecutivos com esclerose sistêmica (ES) e 37 controles saudáveis, acompanhados no ambulatório de Reumatologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

Os pacientes com esclerose sistêmica foram selecionados de acordo com os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

- **Critério de inclusão:**

1. Pacientes com diagnóstico de ES segundo os critérios do ACR e acompanhados rotineiramente no ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP;
2. Maiores de 18 anos;
3. Concordaram em participar do projeto e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

- **Critério de exclusão:**

1. Presença de marca passo, cliques metálicos, implantes ferromagnéticos, síndrome de sobreposição, hipertensão arterial sistêmica, *diabetes mellitus*, acidente vascular cerebral prévio;
2. Pacientes com claustrofobia ou que não conseguiram realizar o exame de ressonância magnética.
3. Impossibilidade de fornecer consentimento livre e esclarecido.

Foram selecionados controles saudáveis e maiores de 18 anos, recrutados da comunidade local e conhecidos dos pacientes e os critérios de exclusão foram os mesmos utilizados nos pacientes.

Um total de 37 voluntários foram incluídos no estudo, com idade e sexo similar ao grupo de pacientes. Estes voluntários realizaram todas as avaliações clínicas, preencheram os questionários, fizeram o exame de RM e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP e foram acompanhados por pelo menos 1 ano.

3.4 Dados clínicos, laboratoriais e tratamentos

Os históricos médicos, características clínicas e sorológicas de cada paciente foram revisados em prontuários médicos. As variáveis incluídas foram a idade de início da doença (definida como a idade em que os primeiros sintomas claramente atribuíveis à ES ocorreram), a idade no diagnóstico (definida como a idade em que os pacientes preencheram a classificação de ES) e a duração da doença (definida como a manifestação inicial claramente atribuível à ES até o dia das aquisições da imagem de ressonância magnética e ¹H-MRSI).

Todas as manifestações clínicas cumulativas e características laboratoriais foram obtidas na consulta inicial por meio de revisão cuidadosa do prontuário. As seguintes manifestações clínicas foram analisadas: Gravidade da doença (geral, vascular, pele, trato gastrointestinal, pulmão, coração e esôfago), fenômeno de Raynaud, úlceras digitais (UD), cicatrizes, dedos inchados, acro-osteólise, calcinose, telangiectasia, pericárdio efusão, miopatia,

radiculopatia, dor de cabeça, enxaqueca, convulsões, acidente vascular cerebral, memória e queixas de insônia.

O uso e as doses atuais de corticosteroides e outros medicamentos imunossupressores foram registrados e a presença de autoanticorpos.

Os indivíduos com critérios preliminares foram avaliados por um reumatologista (TNA, SA) que realizou um exame neurológico e clínico. A atividade da doença foi avaliada pelo índice de atividade de Valentine⁹¹ e a gravidade da doença foi avaliada pelo índice de gravidade de Medsger.⁹²

3.5 Dados demográficos e características clínicas

A duração média da doença no início do estudo foi de 13 anos (variação de 3 a 22 anos, DP = 5,09) e 15 anos (variação de 3 a 22 anos, DP = 5,58) no grupo (*follow-up*). No momento da entrada no estudo, 26 (70,27%) pacientes com ES tinham sintomas de ansiedade [pontuação média do BAI = 14,22 (DP = 12,21)] e 21 (35,6%) com ES tinham sintomas depressivos [pontuação média do BDI = 13,25 (DP = 8,99)] A pontuação média de MoCA⁹³ no início do estudo foi [pontuação = 20,24 (SD = 3,99)].

3.6 Avaliação cognitiva de Montreal (MoCA)

Os pacientes e grupo controle foram submetidos à avaliação cognitiva Montreal – MoCA (Anexo 3), no mesmo dia que foram realizados os exames de MRI e MRSI. O teste de MoCA é um instrumento de breve de rastreio para deficiência cognitiva que acessa diferentes domínios cognitivos e que possui 48 metodologias de aplicação bem determinada e rígida. O teste MoCA é subdividido em: Atenção/concentração, funções executivas, memória, linguagem, habilidades viso-construtivas, conceituação, cálculo e orientação temporal e espacial são avaliadas. O tempo total de aplicação do teste MoCA é de aproximadamente de 10 minutos. O score total é de 30 pontos; sendo que scores maiores ou iguais a 26 foram considerados normais.^{94, 95}

3.7 Avaliação de sintomas de depressão (Inventário de Beck – BDI)

Os pacientes e controles responderam ao inventário de depressão de Beck-BDI (Anexo 4) que foi aplicado no mesmo dia do exame de MRI. O BAI contém 21 itens (grupos de afirmações). Cada grupo avalia aspectos relacionados a atitudes e sintomas encontrados em quadros depressivos (tristeza, pessimismo, sensação de fracasso e culpa, falta de satisfação, indecisão, sensação de punição, autodepreciação, autoacusações, crises de choro, irritabilidade, retração social, distorção da imagem corporal, inibição para o trabalho, distúrbio de sono, fadiga, perda de apetite e peso, preocupação somática, diminuição de libido e ideias suicidas). Os valores somados resultam em *score* total que pode variar entre 0 a 63 pontos, classificando os sintomas depressivos em: ausentes (0-13 pontos), leves (14 -19 pontos), moderados (20 a 28 pontos) e graves (29 a 63 pontos).^{96,97}

3.8 Avaliação de sintomas de ansiedade (Inventário de Beck – BAI)

Os pacientes e grupo controle responderam ao inventário de ansiedade de Beck – BAI (Anexo 5) que foi aplicado no mesmo dia do exame de MRI. O BAI é bastante utilizado em estudos clínicos e também em pesquisas para medir os sintomas de ansiedade em indivíduos. A escala BAI foi criada para analisar a gravidade dos sintomas de ansiedade. O BAI é composto por 21 itens (questões afirmativas) que descrevem os sintomas mais frequentes e comuns em quadros de ansiedade. As questões são referentes a semana anterior a data do teste e para cada sintoma. O valor de escala varia entre 0 (ausência do sintoma de ansiedade) a 3 (desconforto intenso). Os valores obtidos somados resultam em um *score* total (entre 0 a 63 pontos), classificando os sintomas: ausentes (0-7 pontos), leves (8 -15), moderados (16-25) e graves (26-63).⁹⁸

3.9 Protocolo de aquisição (MRI e ¹H-MRSI)

Para a aquisição das imagens estruturais (MRI) e espectroscopia multivoxel por ressonância magnética (¹H-MRSI) foi utilizado equipamento de

RM (3T Philips Achieva), instalado na Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

a) Imagem estrutural: Ponderada em T1 (aquisições tridimensionais obtidas no plano sagital), voxel isotrópico de 1mm^3 , ângulo de excitação de 90° , tempo de repetição: 22 msec, tempo de eco 9 msec, 180 fatias sagitais, matriz 256×220 pixels e FOV = $240 \times 240\text{mm}$.

b) Espectroscopia: Espectros adquiridos na região supraventricular superior: volume de interesse (VOI) $\approx 100,52 \times 84,74 \times 16\text{mm}$; grade de 16×13 : totalizando 208 espectros) e Hipocampo (bilateral): VOI $\approx 116,65 \times 79,60 \times 16\text{mm}$; grade de 16×13 : 208 espectros, e hipocampo (esquerdo e direito): VOI $\approx 60,00 \times 40,00 \times 10\text{mm}$; grade de 7×9 : totalizando 63 espectros), *Long TE*: 144ms e TR: 2000ms e sequência PRESS (*Point RESolved Spectroscopy*) Essa área foi previamente analisada por meio de imagens ponderadas em T1. Antes da aquisição, um *shimming* localizado no VOI, foi realizado para garantir a homogeneidade de campo adequada seguido pelo ajuste de supressão de água. Buscou-se posicionar o VOI sempre em sentido antero-medial, evitando adjacências ósseas e líquido.

Após 48 meses os exames de imagem e espectroscopia por ressonância magnética e espectroscopia foram repetidos nos pacientes e controles.

3.10 Segmentação dos tecidos cerebrais

Imagens ponderadas em T1 foram pré-processadas usando o método disponível no *software* chamado *volBrain*⁹⁹. O *volBrain* contém pipelines avançados para fornecer automaticamente informações volumétricas das imagens de RM do cérebro em diferentes escalas. O pipeline chamado *volBrain* é responsável por fornecer os valores dos volumes dos principais tecidos da cavidade intracraniana. Ele também fornece informações de volume de algumas áreas macroscópicas, como hemisférios cerebrais, cerebelo e tronco cerebral. Adicionalmente, a segmentação automática da estrutura subcortical é realizada e os volumes relacionados e mapas de rótulos são fornecidos.

3.11 Segmentação do hipocampo

O HIPS é um pipeline de *volBrain* para segmentação do hipocampo e seus subcampos, que, de acordo com a literatura, é superior às aplicações Freesurfer¹⁰⁰, SPM e FSL para segmentação do hipocampo e tálamo.¹⁰¹ Esse método é baseado no protocolo proposto por Winterburn¹⁰² e o protocolo sugerido por Yushkevich.¹⁰³ O resultado final do pipeline HIPS é uma máscara binária do hipocampo segmentado em cinco subcampos: CA1, CA2/3, CA4/DG, SR-SL-SM e *Subiculum*.

3.12 Desenvolvimento de software

Nesse trabalho de doutorado, desenvolvemos uma ferramenta computacional (*toolbox*), chamada de *Python-based toolbox for analysis, visualization and selection of spectra of magnetic resonance spectroscopic imaging* – que foi utilizada nos experimentos e estudos clínicos, para analisar dados de espectroscopia multivoxel por ressonância magnética em diferentes regiões do cérebro.

A *toolbox* foi desenvolvida em parceria com o Laboratório de Computação em Imagens Médicas (*Medical Image Computing Lab / MICLab*) da Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação (FEEC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

A ferramenta computacional é código aberto (*open-source*) implementada usando a linguagem de programação Python/Numpy¹⁰⁴ e biblioteca Tkinter, e que permitirá executá-la em diferentes tipos de sistemas operacionais como Windows, Linux e Mac OS. Todo o código-fonte e documentação ficará disponível para *download* em um repositório no GitHub do MICLab.

A versão atual, os seguintes tipos de arquivos suportados são:

- Imagem estrutural (formato DICOM)
- Espectroscopia (Philips SDAT / SPAR)
- Máscaras binárias de segmentação, no formato NIFTI (*volBrain* ou Freesurfer).

A ferramenta computacional desenvolvida possui processamentos e cálculos complexos, que incluem desde o co-registro entre a imagem estrutural (MRI) e a grade de espectros (MRSI) até métodos avançados, que foram desenvolvidos durante o doutorado e apresentados e publicados em congressos.^{105,106} Diante disso, decidimos desenvolver a ferramenta de forma modular (Fig. 3), visando maior flexibilidade, facilidade para manutenção e também permitir a inclusão novos módulos de maneira simples.

3.12.1 Módulos

Os principais módulos na versão atual são: (a) *User Interface*; (b) *Processing Pipeline*; e (c) *Results Dashboard*.

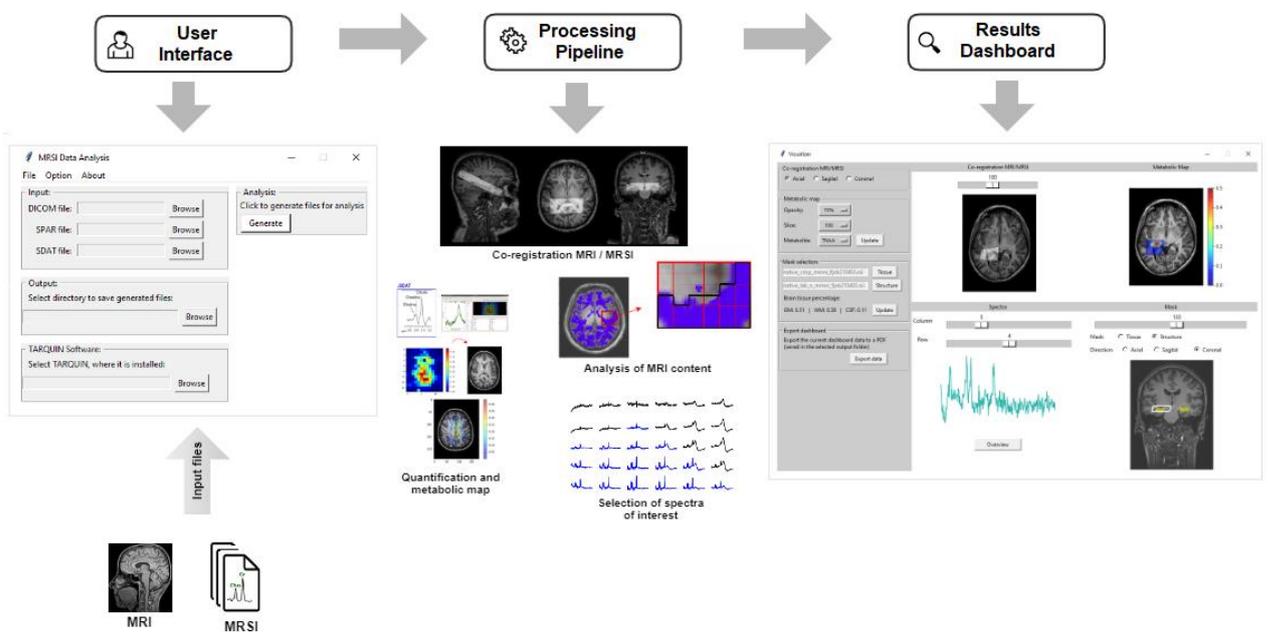


Figura 3 – Visão geral da ferramenta computacional e os principais módulos.¹⁰⁵

a) *User Interface*

O módulo de interface do usuário (*user interface*) é a tela inicial da *toolbox* (Fig. 4), que permite ao usuário selecionar todos os arquivos de entrada a serem analisados (imagem estrutural e espectroscopia). O usuário também deve informar: diretório de saída (onde todos os dados gerados serão salvos) e também caminho completo do *software* TARQUIN, responsável pela quantificação do metabólito.

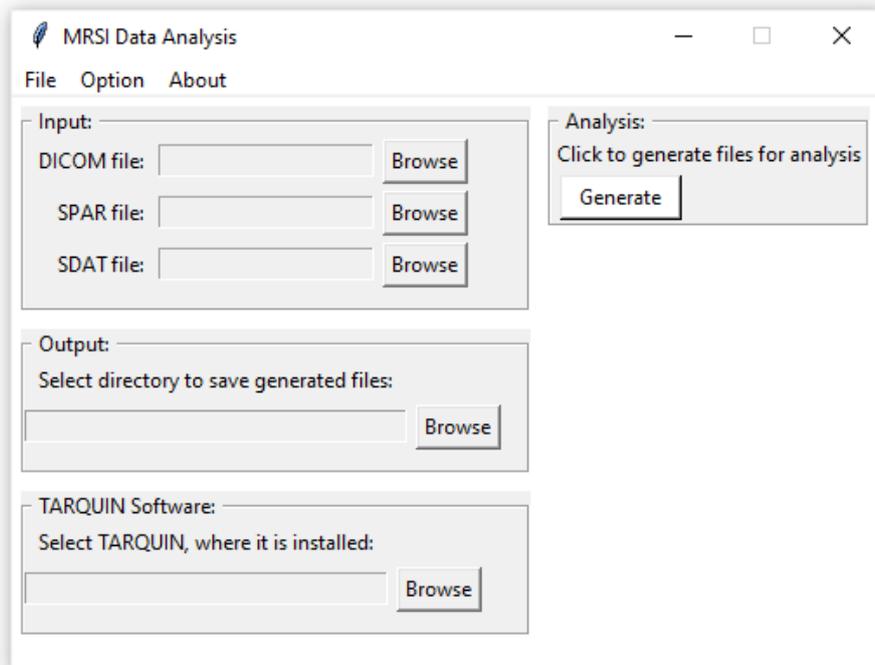


Figura 4 – Módulo de interface do usuário (*user interface*): tela inicial da ferramenta computacional.¹⁰³

b) Processing Pipeline

É o módulo principal do ferramenta computacional e contém 4 partes: (I) Co-registration MRI / MRSI, (II) Analyses MRI content, (III) Selection of spectra e (IV) Quantification and metabolic map (Fig. 6)

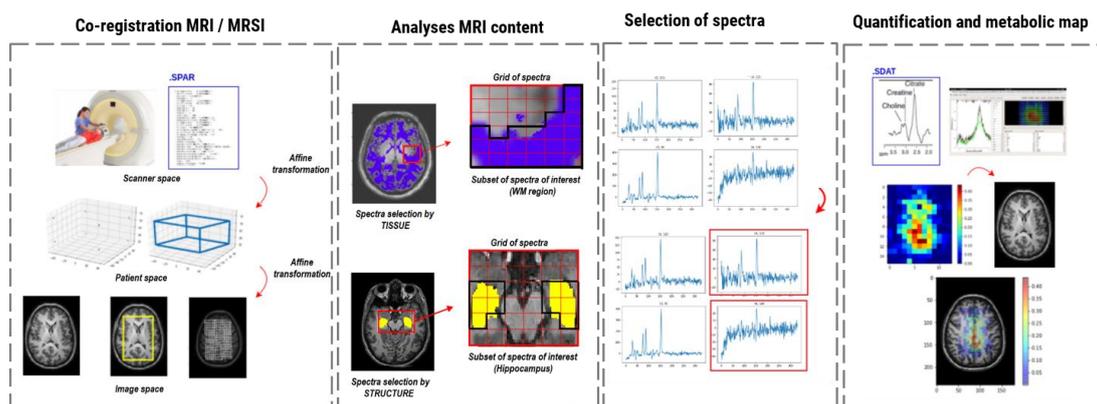


Figura 5 – Visão geral do módulo *Processing Pipeline*.

I) Co-registration MRI / MRSI

Normalmente, uma aquisição de MRS do cérebro inicia-se logo após a formação da imagem estrutural (MRI). A MRI é usada como referência para o

posicionamento da grade de espectros (VOI) na região de interesse. Após a aquisição, os dados contendo as informações sobre os espectros, são armazenados em diferentes formatos de arquivos, dependendo do fabricante do equipamento de ressonância magnética, os formatos mais comuns são: DICOM MRS, Siemens IMA, Siemens RDA, Siemens TWIX, Philips SDAT/SPAR, GE P-files, Varian, Bruker e ASCII file. Extrair as informações armazenadas no cabeçalho desses arquivos, foi possível posicionar corretamente o VOI no espaço de coordenadas da MRI. Normalmente o VOI tem o formato de um paralelepípedo e as suas coordenadas são armazenadas no arquivo no espaço de coordenadas do *scanner*. Através de transformações afins (*affine transformation*), foi possível converter as coordenadas que estão no espaço do *scanner* para o espaço de coordenadas do paciente (Fig. 5).

Essa etapa tem como objetivo delimitar na imagem estrutural, a região de onde serão extraídas as informações sobre os tecidos ou estruturas cerebrais e, adicionalmente, podemos validar se a grade dos espectros foi posicionada corretamente na região de interesse, pois quase sempre o posicionamento do VOI na imagem é feito de forma manual pelo operador do *scanner* de MR.

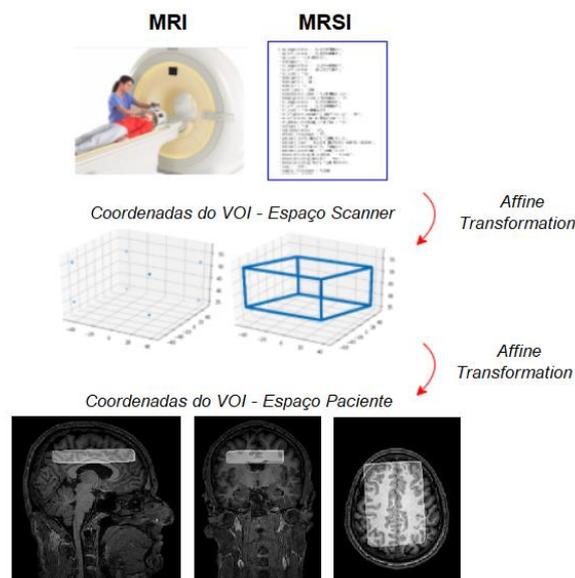


Figura 6 - Visão geral do módulo *Co-registration MRI / MRSI*.

II) Analyses MRI content

Esse módulo tem como objetivo obter informações sobre os tecidos cerebrais contidos na região de onde os espectros foram adquiridos. Na MRSI, quase sempre, a região selecionada contém diferentes tipos de tecidos (volume parcial) e outros compostos químicos, que poderá prejudicar na análise e interpretação dos resultados da quantificação dos metabólitos.

Usando a imagem estrutural (MRI), as máscaras binárias de segmentação de tecidos (Fig. 6) e estruturas cerebrais formam geradas. Nesse trabalho, usamos o software gratuito volBrain, porém as máscaras podem ser geradas por outras ferramentas, como por exemplo o Freesurfer. No final dessa etapa, será calculado as porcentagens relativas de tecidos cerebrais (GM, WM e CSF) contida em cada voxel e também a porcentagem de estruturas cerebrais.

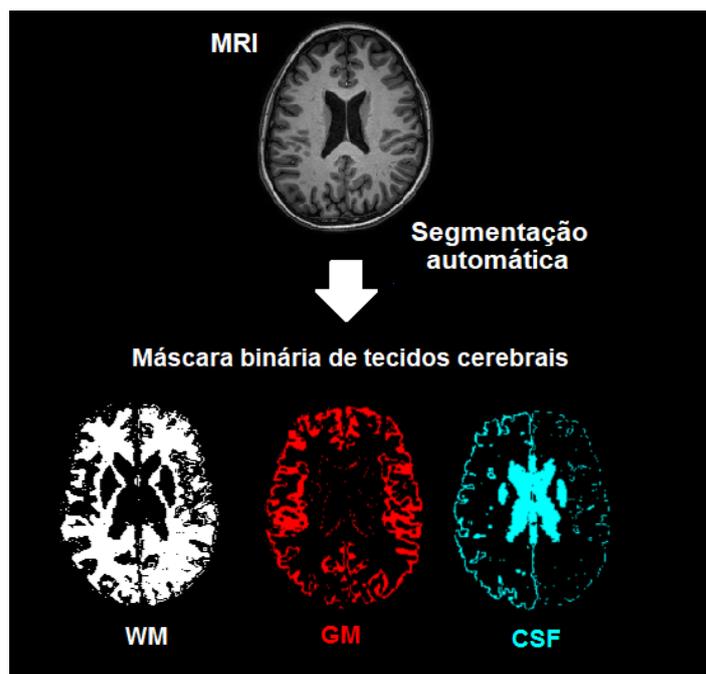


Figura 7 - Máscaras binárias de segmentação de tecidos cerebrais geradas através do software volBrain.

Em seguida, é feito o registro entre a imagem estrutural, VOI dos espectros e a máscara binária de segmentação de cada tipo de tecido cerebral. As porcentagens relativas de tecidos presentes na região de onde são adquiridos os espectros foram calculadas dividindo o número de voxels do VOI dos espectros atribuídos a uma determinada classe de tecidos (N_{GM} , N_{WM} e

N_{CSF}) pelo número total de voxels da imagem estrutural na região que foram adquiridos os espectros. (Equação. 3.1).

$$\begin{aligned} PR_{GM} &= \frac{N_{GM}}{N_{GM} + N_{WM} + N_{CSF}} \\ PR_{WM} &= \frac{N_{WM}}{N_{GM} + N_{WM} + N_{CSF}} \\ PR_{CSF} &= \frac{N_{CSF}}{N_{GM} + N_{WM} + N_{CSF}} \end{aligned} \quad (3.1)$$

onde, N_{GM} , N_{WM} e N_{CSF} são o número de voxels da grade de espectros pertencentes à GW, WM e CSF respectivamente e PR_{GM} , PR_{WM} e PR_{CSF} são as porcentagens relativas de tecidos presentes na grade de espectros.

Assim como na análise baseada em porcentagem de tecidos cerebrais (GM, WM e CSF), para calcular a porcentagens relativas de estrutura cerebral em cada voxel do VOI, é necessário obter a máscara binária de segmentação da estrutura cerebral de interesse.

III) Selection of spectra of interest

Através da técnica de aquisição MRSI, podemos adquirir um conjunto de espectros em uma mesma aquisição. Entretanto, alguns desses espectros podem ser removidos da análise, por exemplo: Espectros adquiridos fora do tecido ou da estrutura cerebral de interesse; voxel adquiridos em regiões com altas concentrações de CSF (contaminação por CSF), espectros com baixa qualidade espectral (ruidosos) gerados por artefatos durante a aquisição.

O objetivo dessa etapa é fazer a seleção de um subconjunto de espectros de interesse através de 2 diferentes abordagens: métricas de qualidade espectral (SNR, FWHM e CRLB) e; agrupamento de espectros semelhantes usando Correlação de Pearson (Fig. 7).

Após a quantificação dos metabólitos, o software fornece os valores das métricas de qualidade espectral (SNR, FWHM e CRLB) em para cada espectro do VOI. Diante desses valores, é possível identificar os espectros com baixa qualidade espectral e eliminá-los da análise.

Quanto maior o SNR, melhor a qualidade da aquisição. Já um menor

valor de FWHM indica picos mais estreitos, portanto, melhor definição e separação entre os metabólitos compostos de forma mais precisa. Já um valor baixo de CRLB indica que a visibilidade dos picos do metabólito no espectro é boa.^{107,108} Ainda não há consenso na literatura sobre valores de referência para esses parâmetros de qualidade espectral (SNR, FWHM e CRLB). Em geral, alguns estudos clínicos apenas descrevem os valores mínimos e máximo. Em nossos experimentos, os espectros com os valores: $SNR > 10$; $FWHM < 10$, $CRLB < 50$ foram considerados com alta qualidade espectral.^{107,108}

Para selecionar um subconjunto de espectros similares ao espectro central, usamos o coeficiente de correlação de Pearson.^{109,110} A principal vantagem dessa abordagem, é que não é necessário quantificar os espectros para fazer a identificação dos espectros com baixa qualidade espectral. Todos os espectros são processados usando Transformada Discreta de Fourier (do inglês, *Discrete Fourier Transform - DFT*) e em seguida, o espectro central é usado como referência e o coeficiente de correlação de Person (r) entre cada espectro e o espectro de referência é calculado. Todos os espectros com um coeficiente (r) acima de um determinado valor são selecionados. Em nossos experimentos, os *thresholds* utilizados foram: região supraventricular superior ($r > 0,7$) e hipocampo ($r > 0,5$).

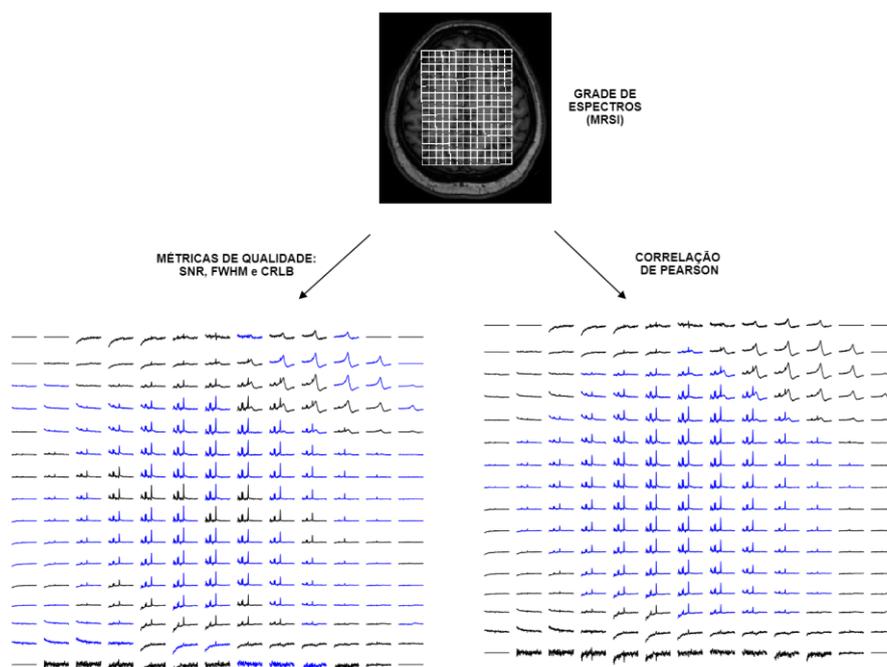


Figura 8 - Seleção de espectros de interesse baseados em 2 diferentes técnicas: (a) Métricas de qualidade espectral (SNR, FWHM e CRLB). Em azul, espectros selecionados utilizando os

valores $SNR > 10$; $FWHM < 10$, $CRLB < 50$; e (b) Similaridade usando correlação de Pearson. Em azul, espectros selecionados utilizando o valor de coeficiente ($r > 0,7$).

- ***Mean spectrum***

Após a seleção do subconjunto de espectros de interesse usando uma das duas abordagens (métricas de qualidade espectral ou correlação de Pearson), será possível quantificar cada espectro separadamente ou pela média dos espectros (o espectro médio). Os valores do espectro médio são armazenados num arquivo no formato .RAW. O formato RAW é suportado por diversos tipos de software de quantificação como por exemplo, o LCMoel e o TARQUIN e o jMRUI.

IV) Quantification and metabolic map

A quantificação dos metabólitos é obtida com integração com o software TARQUIN, inicializado automaticamente pela ferramenta, recebendo os dados espectrais e os parâmetros de aquisição necessário para quantificação. Como resultado, é gerado um arquivo CSV contendo a quantificação dos principais metabólitos. Usando as informações contida no CVS, é gerada a visualização do mapa metabólico registrado à imagem anatômica, proporcionando uma análise qualitativa e permitindo a observação da distribuição espacial de concentrações ou proporções de metabólitos individuais.

c) Results Dashboard

Após a execução dos módulos *User Interface e Processing Pipeline* (Fig. 3), alguns resultados são exibidos na tela *Results Dashbord* (Fig. 9). Para facilitar a interpretação dos resultados, a tela foi dividida nas seguintes seções:

- ***Co-registration MRI/MRSI:*** Visualização do registro entre a imagem estrutural (MRI) e a grade de espectros (MRSI) em todas as fatias da imagem e também pelas vistas (axil, coronal e sagital).
- ***Metabolic map:*** Distribuição espacial (mapa metabólito) de um determinado metabólito, sobreposto em uma determinada fatia da imagem estrutural, selecionada previamente pelo usuário.

- **Spectra:** Visualização de todos os espectros individualmente, ou todos os espectros do VOI (botão 'Overview').
- **Mask selection e mask:** Visualização do registro entre a imagem estrutural, grade de espectros e máscara de segmentação (tecido ou estrutura cerebral). O usuário poderá navegar facilmente por todas as fatias da imagem e também pelas vistas (axil, coronal e sagital).
- **Export dashboard:** Salvar em formato PDF todas as informações exibidas no *dashboard*. Como a ferramenta ainda não tem integração com nenhum banco de dados, essa funcionalidade será útil para salvar as informações para análise futuras.



Figura 9 – Tela principal da ferramenta computacional contendo as seguintes seções: a) *Co-registration MRI/MRSI*: Registro entre a imagem estrutural (MRI) e a grade de espectros (MRSI) adquirida no hipocampo esquerdo; b) *Metabolic map*: Distribuição espacial do metabólito TNAa, configurado com 75% de opacidade; c) *Spectra*: Visualização de um espectro da grade; e d) *Mask*: registro entre imagem estrutural, grade de espectros e máscara de segmentação do hipocampo.

3.13 Análise estatísticas

As características demográficas e clínicas foram apresentadas em média, mediana e desvio-padrão (DP) para as variáveis contínuas; por frequências e percentuais para variáveis categóricas, utilizando o teste de normalidade *Shapiro-Wilk*. As comparações entre as variáveis foram realizadas com o teste *t* de *Student* para dados paramétricos ou o teste de *Mann-Whitney* para variáveis contínuas não-paramétricas. O Teste *t* para amostras pareadas foi utilizado para determinar diferenças das concentrações de metabólitos entre os pacientes e controles no tempo 1 e 2 (*follow-up*). O intervalo médio entre as aquisições imagens de ressonância magnética (MRI) e a espectroscópica por ressonância magnética (MRSI) entre o tempo 1 e 2 foi de 48 meses. Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos. Todas as análises foram realizadas com *software* estatístico SPSS, versão 25.0.

4. RESULTADOS

4.1 Experimentos utilizando a ferramenta computacional

Todos os resultados gerados em cada módulo da ferramenta computacional são armazenados em um diretório previamente selecionado pelo usuário e alguns desses resultados são mostrados nas seções a seguir (Fig. 10 – 35).

a) *Co-registration (MRI/MRSI)*

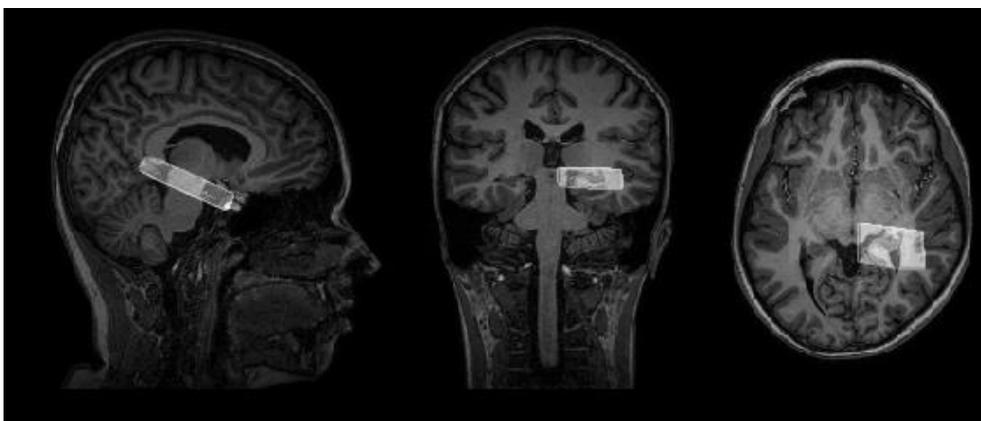


Figura 10 - Registro entre imagem estrutural e a grade de espectros (63 espectros) posicionada no hipocampo direito.

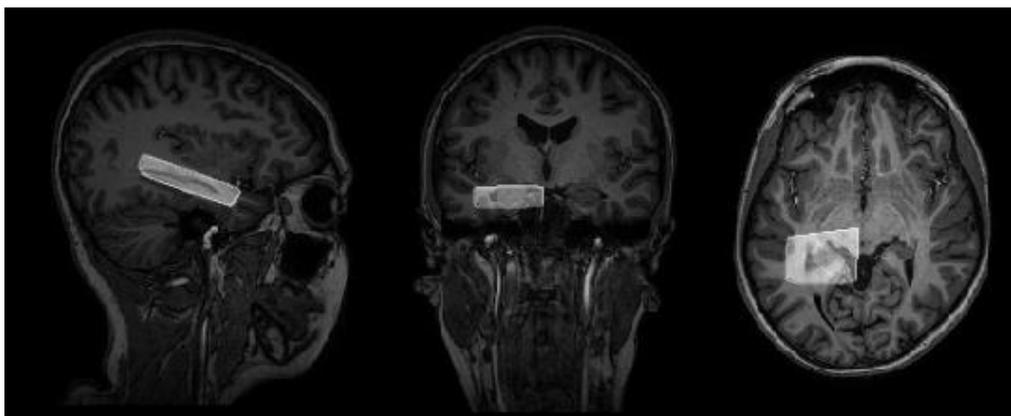


Figura 11 - Registro entre imagem estrutural e a grade de espectros (63 espectros) posicionada no hipocampo esquerdo.

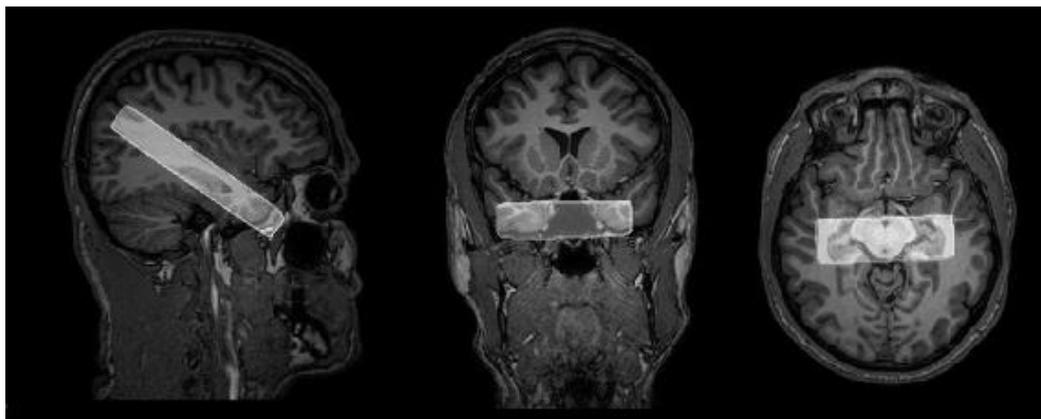


Figura 12 - Registro entre imagem estrutural e a grade de espectros (208 espectros) posicionada no hipocampo (bilateral).

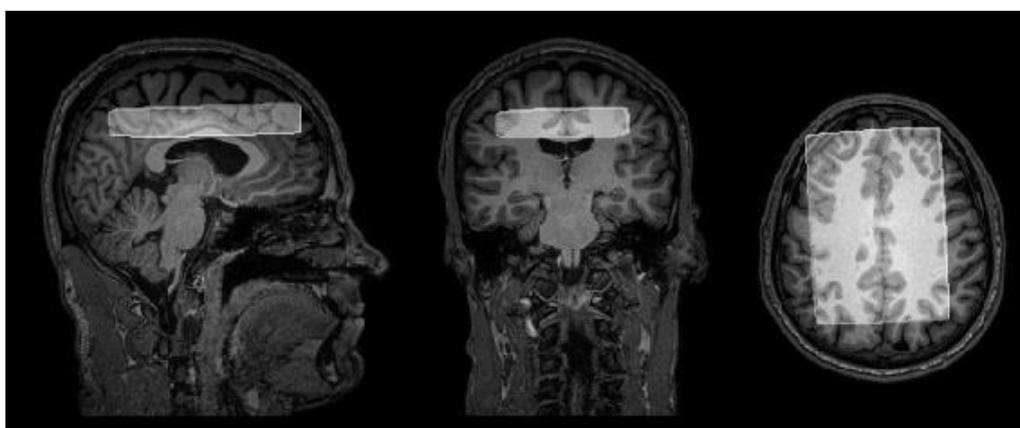


Figura 13 - Registro entre imagem estrutural e grade de espectros (208 espectros) posicionada na região supraventricular posterior.

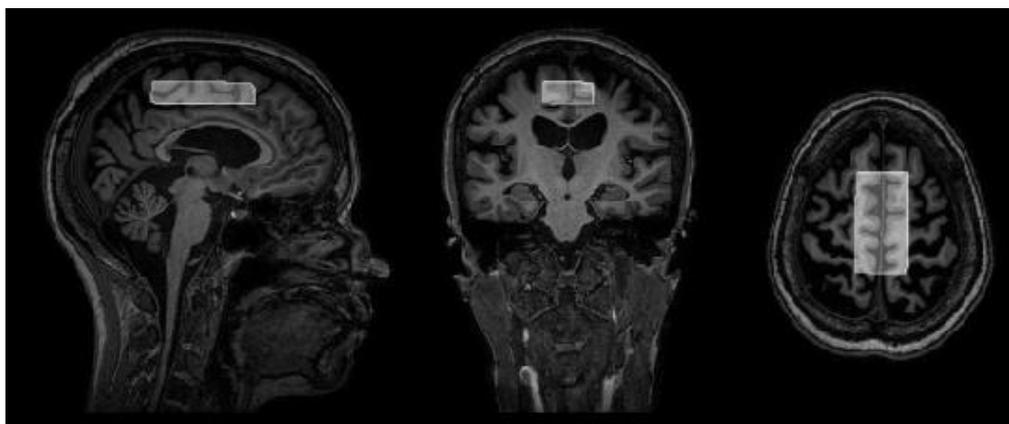


Figura 14 - Registro entre imagem estrutural e grade do espectro (*single-voxel*) posicionado na região supraventricular posterior.

b) Analysis of MRI content

- **Tecidos Cerebrais (WM, GM e CSF)**

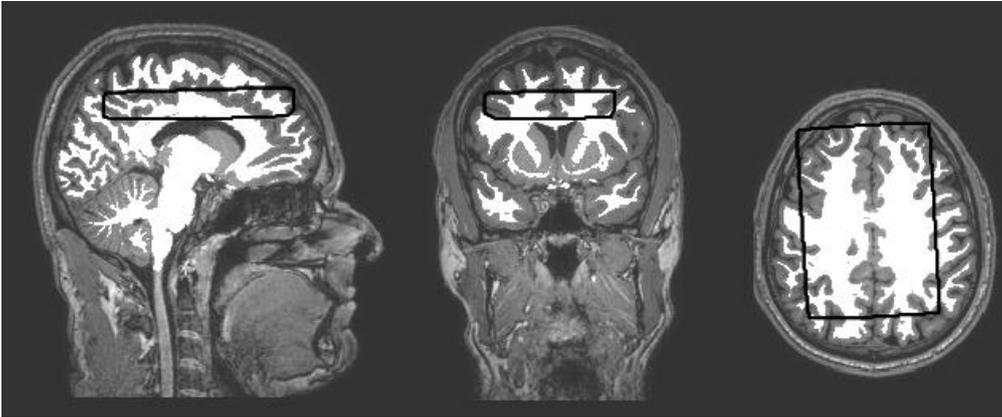


Figura 15 – Registro entre a imagem estrutural, máscara binária de segmentação de substância branca gerada pelo *software* volBrain e grade dos espectros (208 espectros), posicionada na região supraventricular posterior.

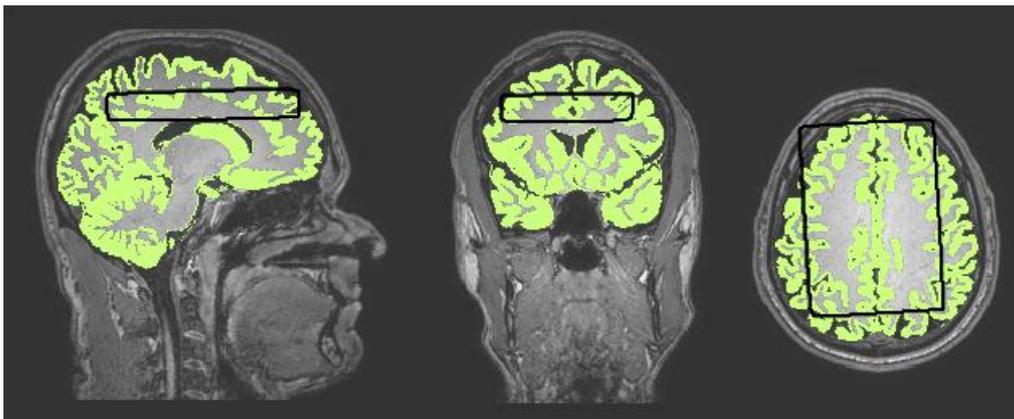


Figura 16 - Registro entre a imagem estrutural, máscara binária de segmentação de substância cinzenta gerada pelo *software* volBrain e grade dos espectros (208 espectros), posicionada na região supraventricular posterior.

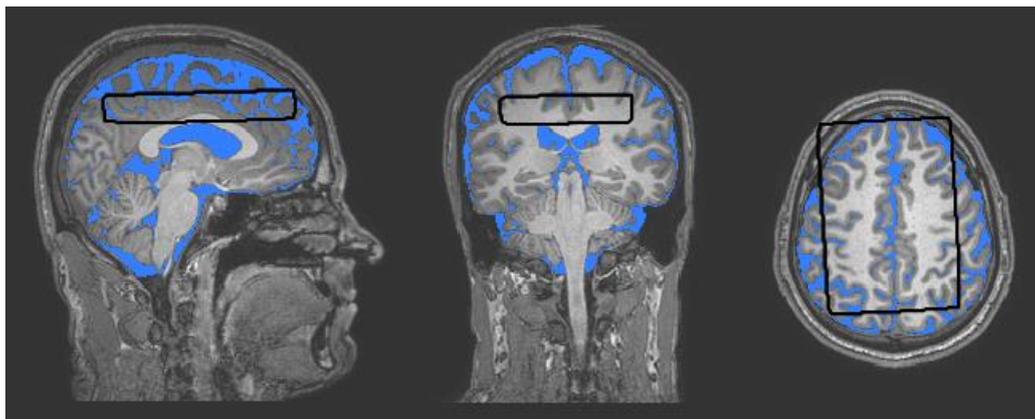


Figura 17 - Registro entre a imagem estrutural, máscara binária de segmentação de líquido cefalorraquidiano gerada pelo *software* volBrain e grade dos espectros (208 espectros), posicionada na região supraventricular posterior.

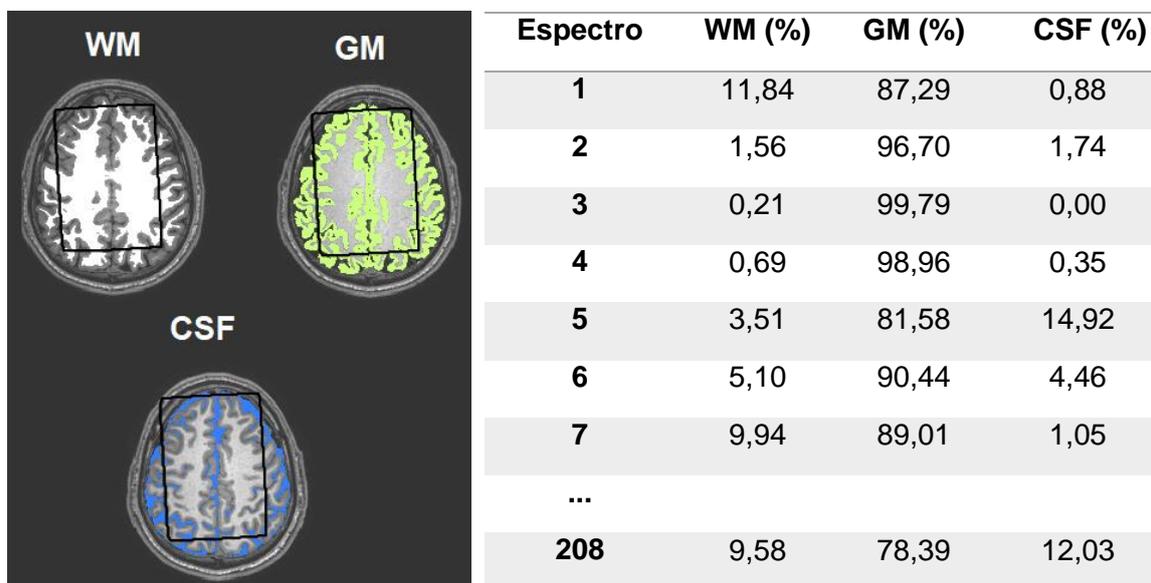
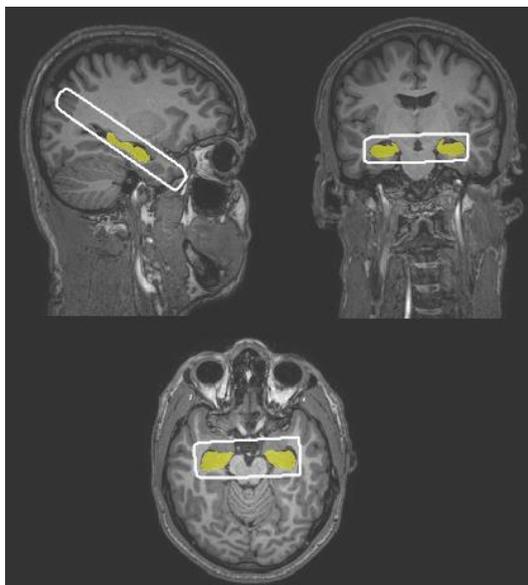


Figura 18 - Exemplo de uma das possíveis análises de conteúdo da imagem de ressonância magnética. A grade de espectros (208 espectros) foi adquirida da região supraventricular posterior. Esquerda: máscaras de tecido cerebral (GM, WM e CSF) gerada pelo *software* volBrain e utilizadas para a análise do conteúdo do VOI delimitado pela grade de espectros (retângulo preto). Direita: lista de alguns espectros do VOI e a respectiva porcentagem de tecidos cerebrais contidos em cada espectro.

- Estruturas Cerebrais (Hipocampo)



Figura 19 – Registro entre a imagem estrutural, máscara binária de segmentação do hipocampo gerada pelo *software* volBrain e grade dos espectros, posicionada na região do hipocampo (bilateral).



Espectro	Mascára Hipocampo (%)
1	0,00
2	0,00
3	0,00
...	...
35	12,18
36	5,06
37	36,86
...	...
208	0,00

Figura 20 - Exemplo de uma das possíveis análises de conteúdo da imagem de ressonância magnética. A grade de espectros (208 espectros) foi adquirida na região do hipocampo (bilateral). Esquerda: máscaras do hipocampo direito e esquerdo (amarelo), gerada pelo *software* volBrain e utilizadas para a análise do conteúdo do VOI (retângulo branco); A direita: lista de espectros e a porcentagem de sobreposição com o hipocampo.

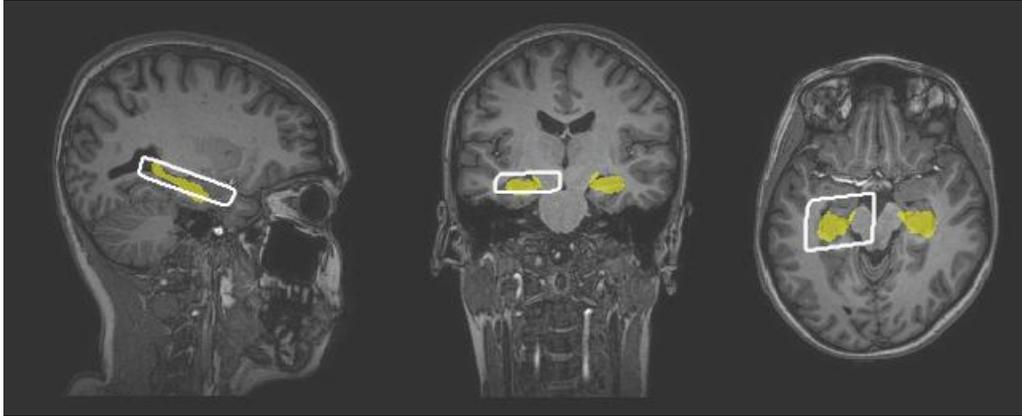


Figura 21 - Registro entre a imagem estrutural, máscara binária de segmentação do hipocampo gerada pelo *software* volBrain e grade dos espectros, posicionada na região do hipocampo esquerdo.

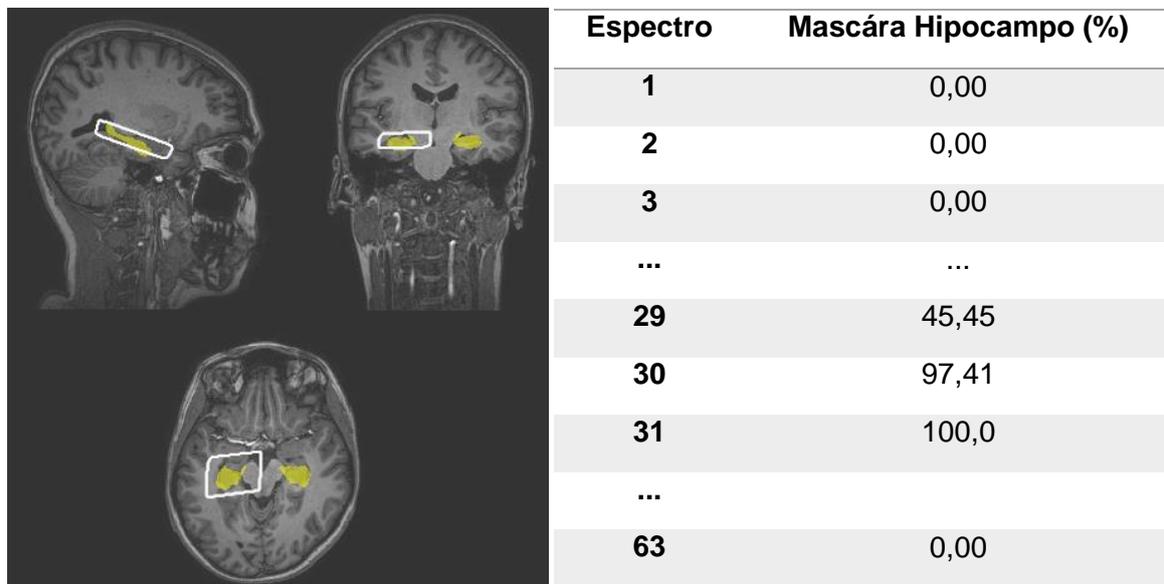


Figura 22 - Exemplo de uma das possíveis análises de conteúdo da imagem de ressonância magnética. A grade de espectros (208 espectros) foi adquirida na região do hipocampo esquerdo. Esquerda: máscaras do hipocampo direito e esquerdo (amarelo) gerada pelo *software* volBrain e utilizadas para a análise do conteúdo do VOI (retângulo branco); A direita: lista de espectros e a porcentagem de sobreposição com o hipocampo.

c) Selection of spectra of interest

Para a seleção de um conjunto de espectros de interesse (boa qualidade espectral), adotamos como base as métricas de qualidade espectral, usamos os seguintes valores: $SNR > 10$; $FWHM < 10$, $CRLB < 50$. Para o coeficiente de correlação de Pearson (r), adotamos $r = 0,7$ para regiões homogêneas e $r = 0,5$

para regiões não-homogêneas do cérebro.

As figuras 22 e 23 mostram um exemplo de uma seleção de espectros de interesse, usando as abordagens de métrica de qualidade espectral (SNR, FWHM e CRLB) e similaridade de espectros (Correlação de Pearson). A grade de espectros (208 espectros), foi adquirido de um mesmo sujeito.

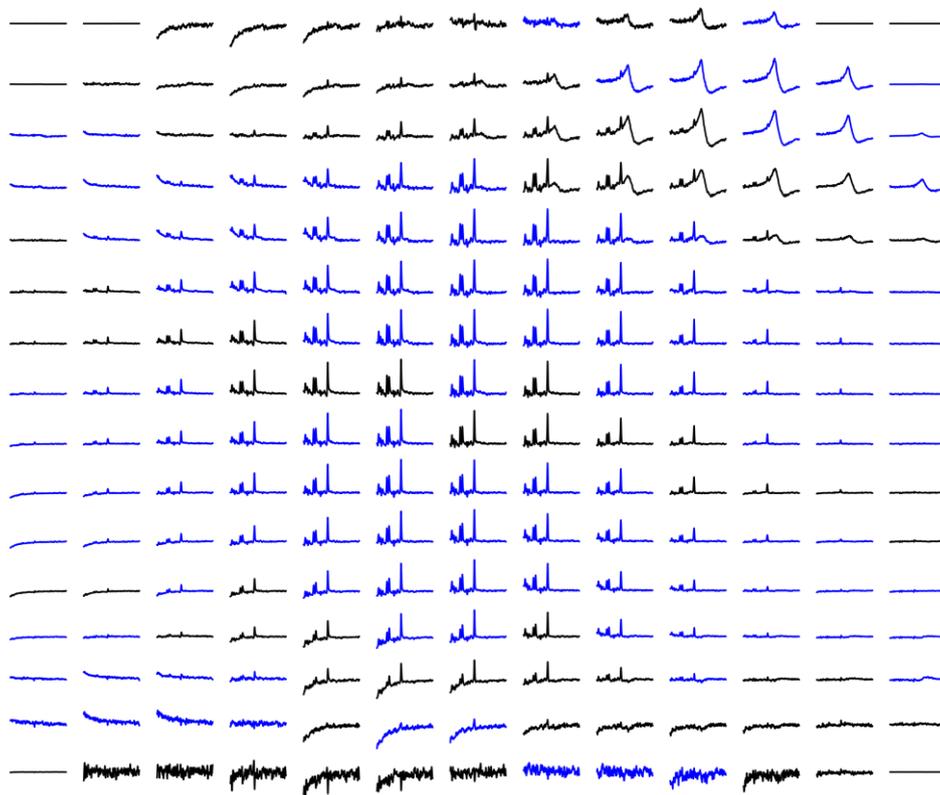


Figura 23 – Espectros adquiridos na região supraventricular superior. Em azul, são os espectros considerados com boa qualidade espectral, selecionados usando métricas de qualidade espectral ($SNR > 10$, $CRLB < 50$ e $FWHM < 10$).

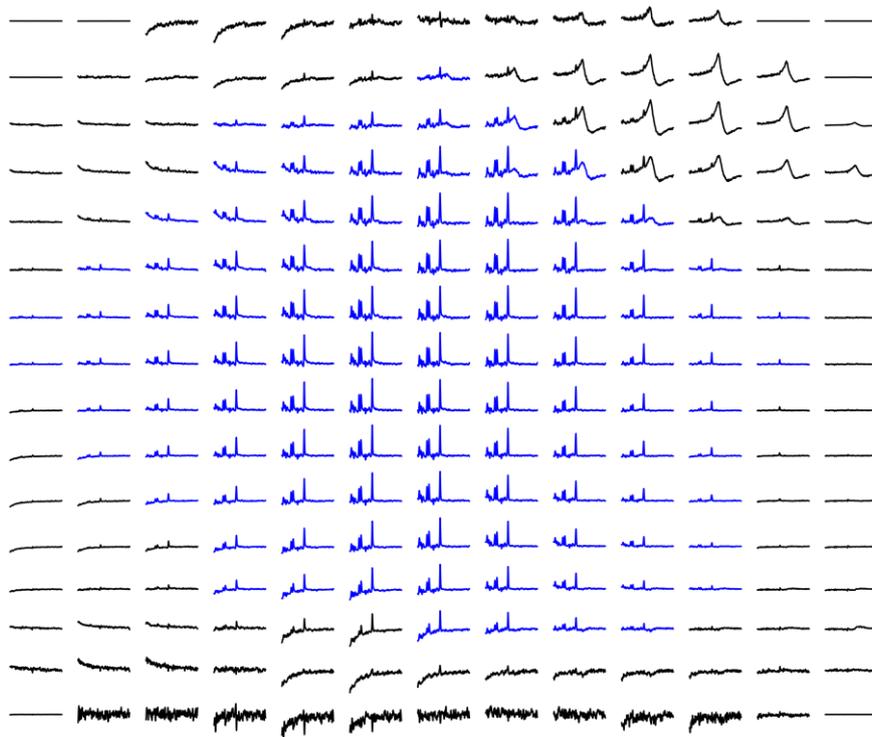


Figura 24 – Espectros adquiridos na região supraventricular superior. Em azul, os espectros considerados boa qualidade espectral, selecionados através da técnica de similaridades de espectros usando Correlação de Pearson ($r > 0,7$).

d) Mean spectrum

- **Concentrações médias obtidas através da quantificação do espectro médio**

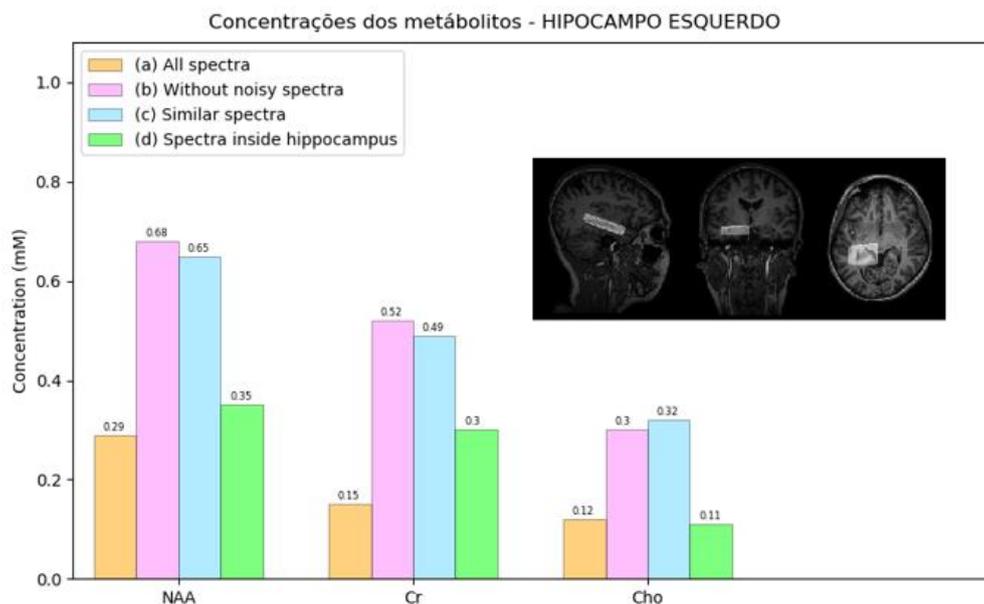


Figura 25 - Comparações dos valores das concentrações médias dos metabólitos NAA, Cr e Cho obtidos pela quantificação do espectro médio adquirido no hipocampo esquerdo, utilizando os seguintes critérios de seleção de espectros de interesse: Em laranja (a): todos os espectros; em rosa (b): apenas espectros com boa qualidade espectral usando $SNR > 10$, $CRLB < 50$ e

FWHM < 10 ; em azul (c): espectros similares ao espectro central (Correlação de Pearson ($r > 0,5$); e em verde (d): apenas espectros pertencente a região do hipocampo esquerdo (parcialmente ou totalmente).

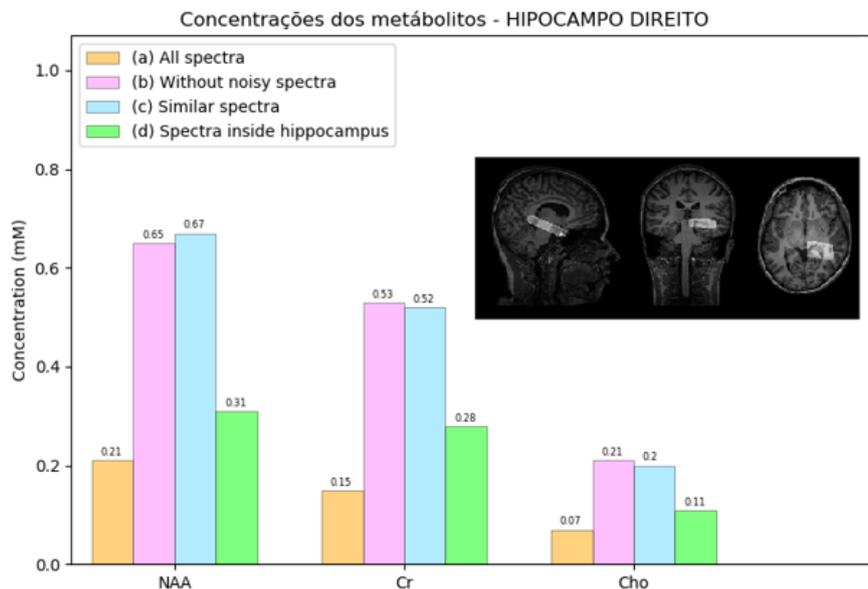


Figura 26 - Comparações dos valores das concentrações dos metabólitos NAA, Cr e Cho, obtidos pela quantificação do espectro médio adquirido no hipocampo direito. Em laranja (a): todos os espectros; em rosa (b): apenas espectros com boa qualidade espectral (SNR > 10, CRLB < 50 e FWHM < 10); em azul (c): espectros similares ao espectro central (Correlação de Pearson ($r > 0,5$); e em verde (d): apenas espectros pertencentes a região do hipocampo direito (parcialmente ou totalmente).

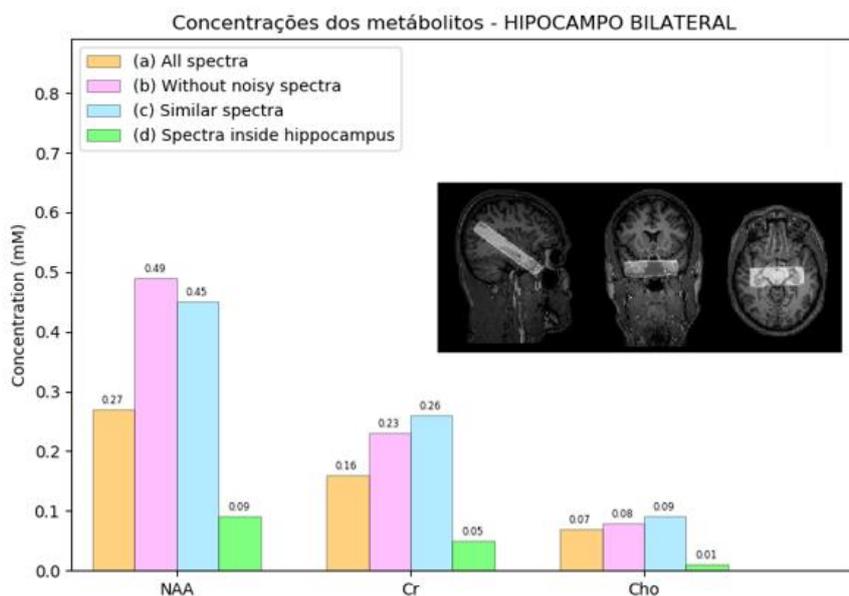


Figura 27 - Comparações dos valores das concentrações dos metabólitos NAA, Cr e Cho, obtidos pela quantificação do espectro médio adquirido no hipocampo bilateral. Em laranja (a): todos os espectros; em rosa (b): apenas espectros com boa qualidade espectral (SNR > 10, CRLB < 50 e FWHM < 10); em azul (c): espectros similares ao espectro central (Correlação de Pearson ($r > 0,7$); e em verde (d): apenas espectros pertencentes a região do hipocampo direito (parcialmente ou totalmente).

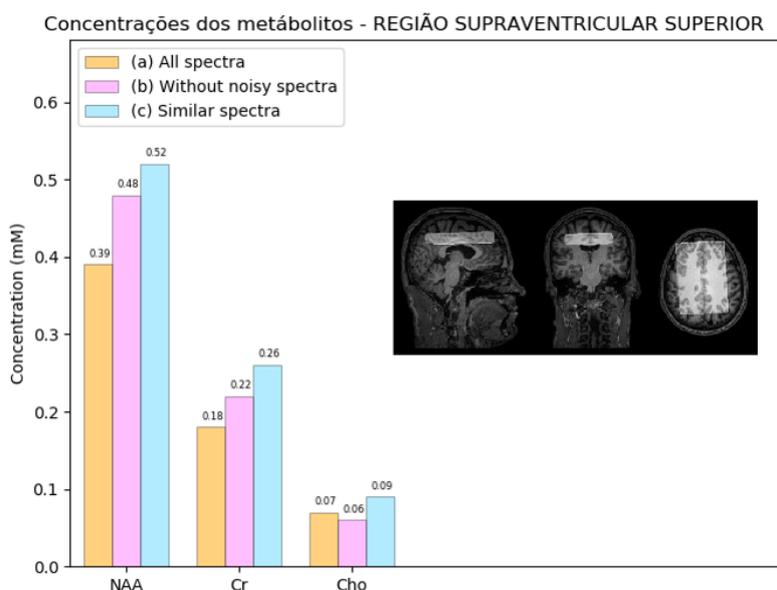


Figura 28 - Comparações dos valores das concentrações dos metabólitos NAA, Cr e Cho, obtidas pela quantificação do espectro médio adquirido na região supraventricular posterior. Em laranja (a): todos os espectros; em rosa (b): apenas espectros com boa qualidade espectral (SNR > 10, CRLB < 50 e FWHM < 10); e em azul (c): espectros similares ao espectro central (Correlação de Pearson ($r > 0,7$)).

- **Comparação entre as concentrações obtidas através da média das quantificações e o espectro médio**

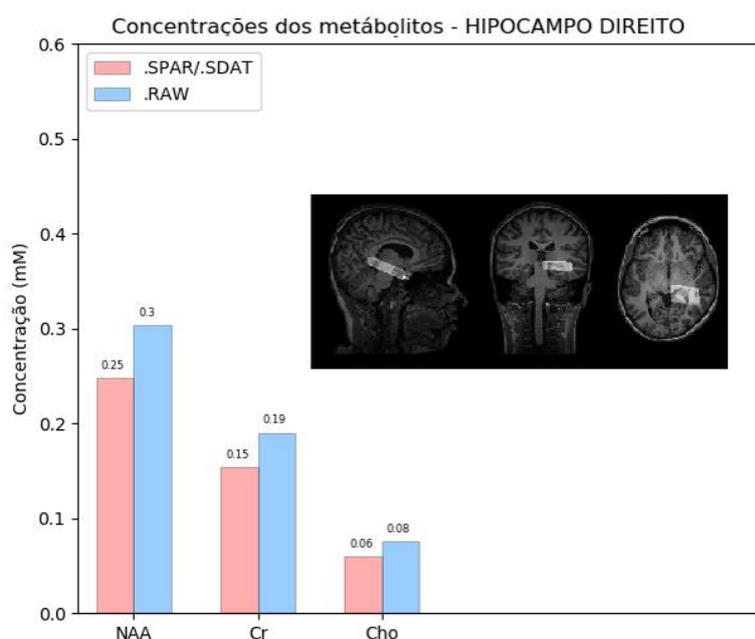


Figura 29 – Comparações entre os valores das concentrações dos metabólitos NAA, Cr e Cho, obtidas pela quantificação: .SPAR/SDAT (todos os espectros) e .RAW (espectro médio – espectros selecionados usando Correlação de Pearson – $r > 0,5$).

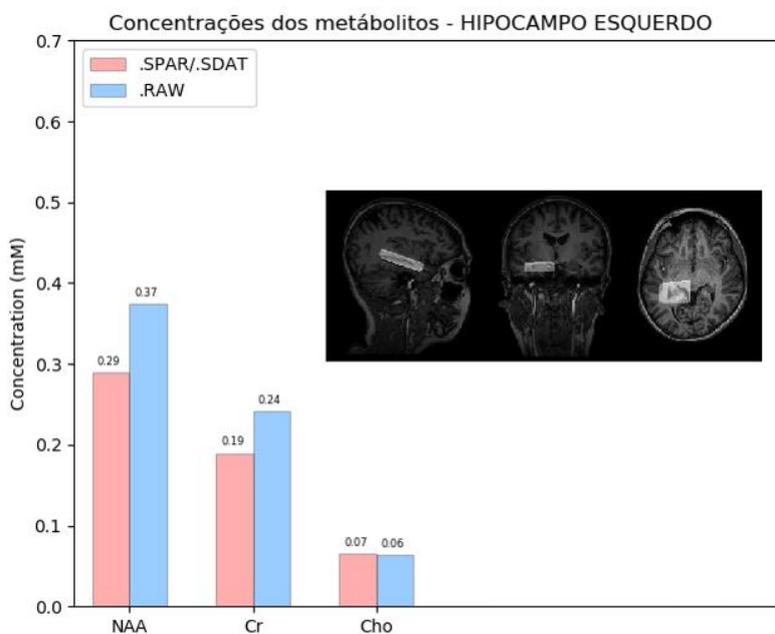


Figura 30 - Comparações entre os valores das concentrações dos metabólitos NAA, Cr e Cho, obtidas pela quantificação: .SPAR/.SDAT (todos os espectros) e .RAW (espectro médio – espectros selecionados usando Correlação de Pearson – $r > 0,5$).

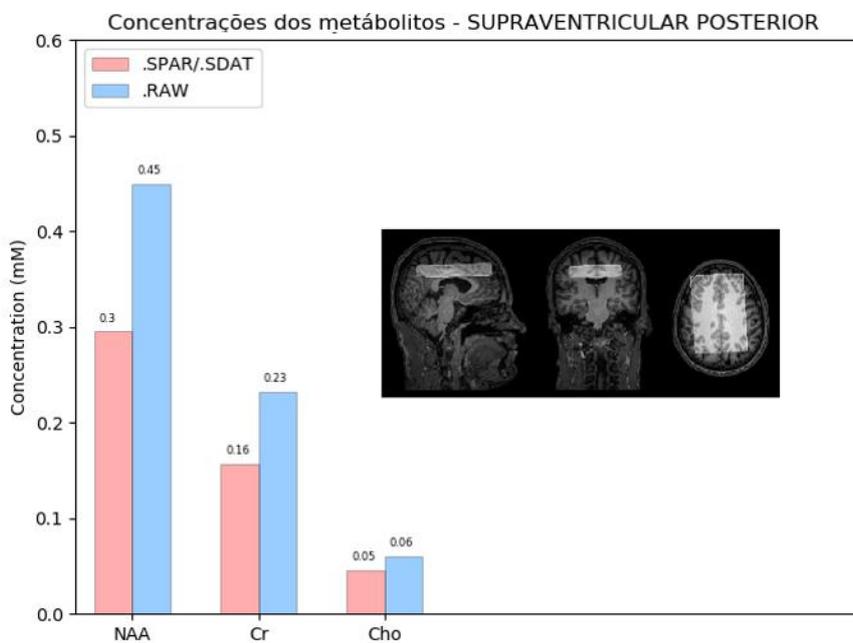


Figura 31 - Comparações entre os valores das concentrações dos metabólitos NAA, Cr e Cho, obtidas pela quantificação: .SPAR/.SDAT (todos os espectros) e .RAW (espectro médio – espectros selecionados usando Correlação de Pearson – $r > 0,7$).

sex abr 02 16:02:28 2021
TARQUIN version 4.3.10

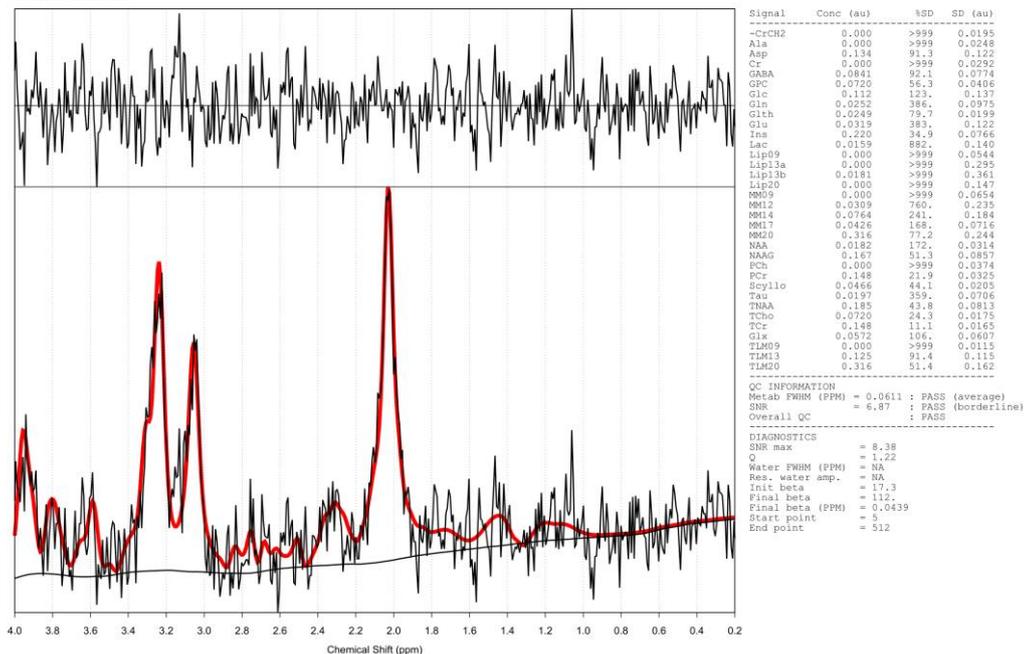


Figura 32 – Resultado da quantificação do espectro médio (.RAW) através do software TARQUIN. Espectros adquiridos no hipocampo (bilateral) e selecionados usando a técnica de similaridade (Correlação de Pearson - $r > 0,5$).

sex abr 02 18:17:02 2021
TARQUIN version 4.3.10

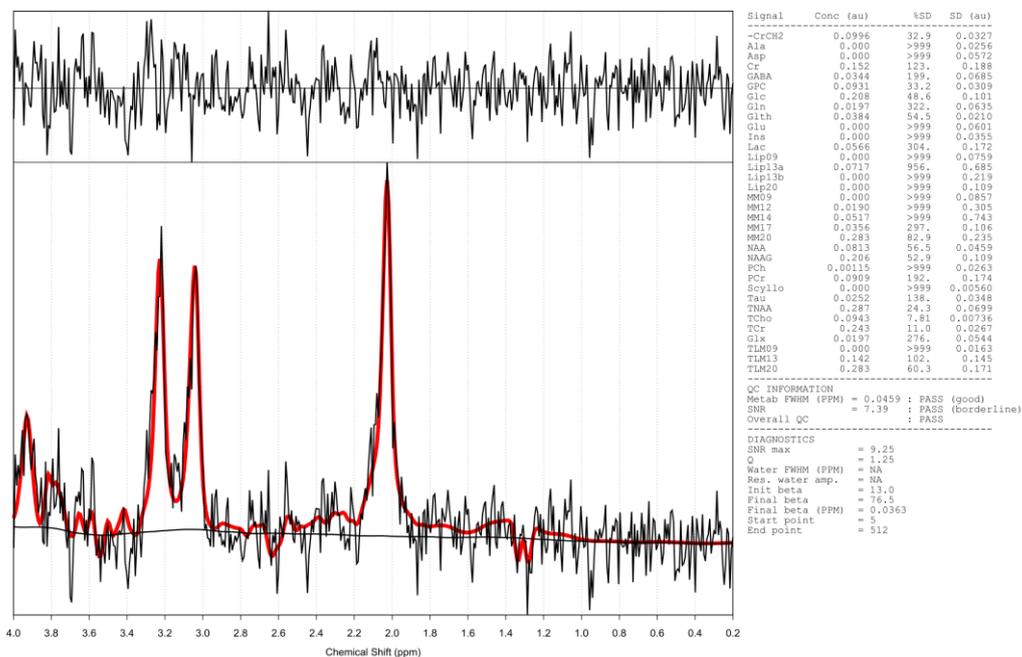


Figura 33 - Resultado da quantificação do espectro médio (.RAW) através do software TARQUIN. Espectros adquiridos no hipocampo (esquerdo) e selecionados usando a técnica de similaridade (Correlação de Pearson - $r > 0,5$).

e) Metabólic map

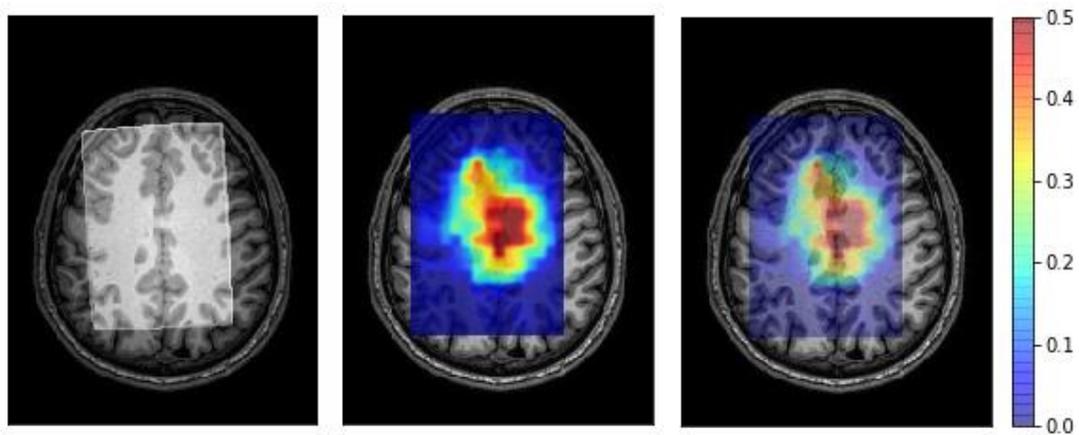


Figura 34 - Distribuição espacial do metabólito NAA na região supraventricular posterior.

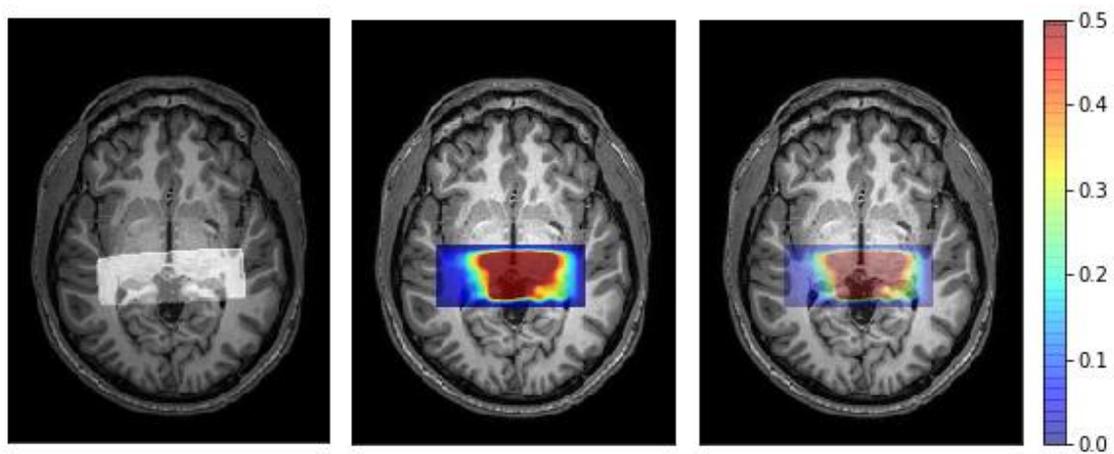


Figura 35 - Distribuição espacial do metabólito Colina (Cho) na região do hipocampo (bilateral).

4.2 Estudos Clínicos

4.2.1 - Disfunção axonal na substância branca em pacientes com esclerose sistêmica

Introdução

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença reumática multissistêmica imunomediada, caracterizada por fibrose da pele e de órgãos internos e vasculopatia.¹¹¹ Além disso, características de disfunção microvascular e fenômenos autoimunes podem ser observadas.^{112,113} Embora o envolvimento da pele e de órgãos internos, como o pulmão e o coração, sejam a marca registrada da doença, o envolvimento do sistema nervoso central (SNC) tem sido cada vez mais observado.¹¹⁴ Além de manifestações psiquiátricas, como depressão e ansiedade, cefaleia, convulsões e comprometimento cognitivo leve têm sido observados na ES.¹¹⁴ Além disso, a aterosclerose e o envolvimento macrovascular foram relatados em alguns estudos.¹¹⁵⁻¹¹⁷

Objetivo

Investigar a presença de disfunção axonal na região da substância branca em pacientes com ES usando exame de imagem por ressonância magnética (MRI) e espectroscopia por ressonância magnética (¹H-MRSI) e determinar se as características clínicas, laboratoriais e de tratamentos, estão associadas às suas ocorrências.

Resultados

a) Dados demográficos e características clínicas

Foram selecionados 37 pacientes (32 mulheres, média de idade de 50,86, DP \pm 11,66 anos; variação de 31-74 anos) com ES atendidos regularmente no Ambulatório de Reumatologia da Universidade Estadual de Campinas, Hospital Universitário e 37 voluntários saudáveis (32 mulheres; média de idade de 49,23; DP \pm 12,03 anos; variação de 26-77 anos), incluídos como grupo de controle. Os controles saudáveis foram pareados por sexo e histórico demográfico e não tinham histórico de qualquer doença crônica (incluindo histórico pessoal de doenças autoimunes).

A duração média da doença no início do estudo foi de 13 anos (variação de 3 a 22 anos, DP = 5,09) e 15 anos (variação de 3 a 22 anos, DP = 5,58) no grupo (follow-up). No momento da entrada no estudo, 26 (70,27%) pacientes com ES tinham sintomas de ansiedade [pontuação média do BAI = 14,22 (DP = 12,21)] e 21 (35,6%) com ES tinham sintomas depressivos [pontuação média do BDI = 13,25 (DP = 8,99)] A pontuação média de MoCA no início do estudo foi [pontuação = 20,24 (SD = 3,99)].

a) Aquisição das imagens estruturais e espectroscopia por RM

As aquisições das imagens (MRI) e espectroscopia (^1H -MRSI) foram repetidas em 26 pacientes com esclerose e 26 voluntários saudáveis. O intervalo médio entre cada exame de MRI e ^1H -MRSI foi de \pm 48 meses (variação de 12 a 48 meses; DP = 1,3).

b) Alterações metabólicas

Observamos uma redução significativa na razão NAA/Cr (valor médio = 1,805; DP = 0,24) em pacientes quando comparados aos controles (valor médio NAA/Cr = 1,904; DP = 0,27; $p = 0,002$) (Tabela 1). A redução da razão NAA/Cr foi associada à presença de comprometimento cognitivo leve ($p = 0,017$), presença de enxaqueca ($p = 0,001$), presença de cefaleia ($p = 0,011$), uso atual de prednisona ($p = 0,011$) e corrente uso de metotrexato ($p < 0,001$) e correlacionada com os scores MOCA ($r = 0,4$; $p = 0,017$).

O estudo de acompanhamento (*follow-up*) mostrou um aumento na razão Cho/Cr (Cho/Cr início: valor médio = 0,344; DP = 0,08 e Cho/Cr *follow-up*: valor médio = 0,362; DP = 0,32, $p = 0,033$) quando comparado com valores basais do paciente. O aumento da razão Cho/Cr foi associado à gravidade da doença: pulmão ($p = 0,037$) e coração ($p = 0,037$); queixas de memória ($p = 0,040$), sintomas de ansiedade ($p = 0,044$), uso de corrente de losartana ($p = 0,033$) e bromoprida ($p = 0,033$).

Tabela 1 - Comparação dos níveis de concentrações de metabólitos adquiridos na região supraventricular posterior entre pacientes com ES e controles

Metabólito (mmol/L)	Valor Médio (DP)		Kruskal Wallis
	37 pacientes	37 controles	Valor p
NAA/Cr	1,805 (0,24)	1,907	0,034*
Cho/Cr	0,324 (0,08)	0,355	0,417
	37 pacientes (inicial)	26 pacientes (follow-up)	Valor p
NAA/Cr	1,805 (0,24)	1,755 (0,33)	0,127
Cho/Cr	0,344 (0,08)	0,363 (0,09)	0,033*
	37 controles (inicial)	26 controles (follow-up)	Valor p
NAA/Cr	1,904 (0,27)	1,907 (0,22)	0,813
Cho/Cr	0,358 (0,14)	0,349 (0,03)	0,588

DP: desvio padrão; NAA: N-Acetylaspartate; Cr: Creatina; Cho: Colina.

4.2.2 – Alterações metabólicas e volume hipocampal em pacientes com esclerose sistêmica

Introdução

O exame de imagem por ressonância magnética é atualmente considerada a técnica padrão para a determinação de anormalidades morfológicas do cérebro e permite métricas quantitativas para avaliar a progressão ao longo do tempo.¹¹² Além disso, para sequências estruturais comumente usadas, a espectroscópica por ressonância magnética pode oferecer informações complementares sobre a composição química do tecido cerebral subjacente, que pode ocorrer antes de anormalidades estruturais.³⁰⁻³⁵ Além disso, a atrofia do hipocampo foi relacionada ao comprometimento cognitivo leve em doenças reumáticas e neurodegenerativas.¹²³⁻¹²⁵

Diversas estruturas cerebrais são afetadas em pacientes com ES,¹¹⁸ entretanto, nenhum estudo foi encontrado na literatura que mostre alterações no hipocampo em pacientes com ES. A neuroanatomia do hipocampo é complexa e não é uma estrutura uniforme. É uma estrutura de múltiplas camadas com uma organização segmentar distinta e uma série de subcampos denominados: CA1, CA2/3, CA4/*dentate gyrus* (DG), *strata radiatum*-

lacunosum-moleculare (SR-SL-SM) e *subiculum*. Esses subcampos têm funções diferentes na memória. CA1 e CA3 estão envolvidos na memória episódica e as lesões no DG levam ao prejuízo na distinção de diferentes ambientes.^{119,120} Além disso, os subcampos compõem o circuito interno e coordenam a função do hipocampo.¹²¹ Por exemplo, a sub-região CA2 está relacionada à memória social e emocional, a sub-região CA1 é crítica para a memória autobiográfica e a cauda do hipocampo prediz o estado de depressão.¹²²

Objetivo

Investigar alterações metabólicas e volume hipocampal em pacientes com esclerose sistêmica para determinar características clínicas, laboratoriais e de tratamento associadas às suas ocorrências.

Resultados

a) Dados demográficos e características clínicas

Foram selecionados 37 pacientes (33 mulheres, média de idade de 53,46, DP \pm 12,29 anos; variação de 30-78 anos) com ES atendidos regularmente no Ambulatório de Reumatologia da Universidade Estadual de Campinas, Hospital Universitário e 37 voluntários saudáveis (31 mulheres, média de idade de 49,41, DP \pm 12,20 anos; variação de 29-80 anos), incluídos como grupo de controle. Os controles saudáveis foram pareados por sexo e histórico demográfico e não tinham histórico de qualquer doença crônica ou autoimunes.

A duração média da doença no início do estudo foi de 13 anos (variação de 3 a 22 anos, DP = 5,09) e 15 anos (variação de 3 a 22 anos, DP = 5,58) no acompanhamento (follow-up) ¹H-MRSI. No momento da entrada no estudo, 26 (70,27%) pacientes com ES tinham sintomas de ansiedade [pontuação média do BAI = 14,22 (DP = 12,21)] e 21 (35,6%) com ES tinham sintomas depressivos [pontuação média do BDI = 13,25 (DP = 8,99)].

b) Aquisição das imagens estruturais e espectroscopia

As aquisições das imagens de ressonância magnética e ¹H-MRSI foram repetidas em 26 pacientes e 26 voluntários saudáveis. O intervalo médio entre

os exames de imagem por ressonância magnética e o $^1\text{H-MRSI}$ (Tempo 1 e tempo 2) foi de ± 48 meses (variação de 12 a 48 meses; DP = 1,3).

c) Avaliação neuropsiquiátrica

O teste de MoCA foi aplicado em 37 pacientes com ES no início do estudo [(pontuações médias de MoCA = 21,76 e DP = 3,72)] e 28 (75,67%) pacientes com ES tinham um MoCA prejudicado (pontuação ≤ 26). O MoCA foi reaplicado em 26 pacientes com ES (estudo de acompanhamento) [(pontuações médias de MoCA = 21,42 e DP = 3,90)] e 21 (80,76%) pacientes com ES tinham um MoCA prejudicado (pontuação ≤ 26).

No início do estudo, 89 episódios de manifestações do SNC ocorreram em 37 pacientes: Cefaléia: 11 (29,72%); enxaqueca: 06 (16,21%); comprometimento cognitivo (MoCA): 16 (43,24%); sintomas de ansiedade (BAI): 26 (70,27%); sintomas de depressão (BDI): 14 (37,83%); queixas de memória: 05 (13,51%); insônia: 04 (10,81%); dismetria: 05 (13,51%) e convulsões: 02 (5,40%).

d) Alterações metabólicas

Observamos uma redução significativa em NAA/Cr (valor médio = 1,006; DP = 0,35) em pacientes com ES quando comparados aos controles (valor médio NAA/Cr = 1,429; DP = 0,29; $p = 0,035$). A redução em NAA/Cr foi associada ao comprometimento cognitivo ($p = 0,0170$), scores de MoCA ($p = 0,049$), sintomas de ansiedade ($p = 0,011$), presença de enxaqueca ($p < 0,001$), queixas de memória ($p = 0,012$) e uso atual de metotrexato ($p = 0,028$), nifedipina ($p = 0,035$), anticoagulantes ($p = 0,045$) e diltiazem ($p = 0,025$). O estudo de acompanhamento (*follow-up*) mostrou um aumento nos valores de Cho/Cr (Cho / Cr inicial: valor = 0,242, Cho/Cr acompanhamento: valor = 0,329, $p = 0,011$) quando comparado aos valores basais do paciente (Tabela 2).

Tabela 2 - Comparação dos níveis de concentrações de metabólitos adquiridos no hipocampo (bilateral) entre pacientes com ES e controles

Metabólito (mmol/L)	Valor Médio (DP)		Teste de Kruskal Wallis
	37 pacientes	37 controles	Valor p
NAA/Cr	1,006 (0,35)	1,429 (0,29)	0,035*
Cho/Cr	0,242 (0,08)	0,382 (0,24)	0,129
	37 pacientes (inicial)	26 pacientes (follow-up)	Valor p
NAA/Cr	1,006 (0,35)	1,295 (0,53)	0,104
Cho/Cr	0,242 (0,08)	0,329 (0,10)	0,011*
	37 controles (inicial)	26 controles (follow-up)	Valor p
NAA/Cr	1,429 (0,29)	1,421 (0,34)	0,865
Cho/Cr	0,382 (0,24)	0,350 (0,10)	0,789

DP: desvio padrão; NAA: N-Acetylaspartate; Cr: Creatina; Cho: Colina.

O aumento da razão Cho/Cr em pacientes foi associado à presença de miopatia ($p = 0,045$).

e) Volume hipocampal

Observamos redução significativa do hipocampo nos pacientes quando comparados aos controles saudáveis (Tabela 3): Hipocampo total (volume médio = 4,78 cm³; DP = 0,38; $p = 0,033$); Hipocampo esquerdo (volume médio = 2,40 cm³; DP = 0,18; $p = 0,002$); Hipocampo direito (volume médio = 2,33 cm³; DP = 0,19; $p = 0,033$). A redução do volume do hipocampo total foi associada ao fenômeno de Raynaud ($p = 0,006$) e ao uso atual de losartana ($p = 0,016$). A redução do volume do hipocampo esquerdo foi associada ao fenômeno de Raynaud ($p = 0,042$), uso atual de losartana ($p = 0,016$) e correlacionada com os escores do BAI ($r = 0,356$; $p = 0,031$). A redução do volume do hipocampo direito foi associada ao fenômeno de Raynaud ($p = 0,032$).

Também observamos redução do CA1 esquerdo (volume médio = 0,81 cm³; DP = 0,06; $p = 0,014$); CA4-DG total (volume médio = 1,23 cm³; DP = 0,10; $p = 0,001$); CA4-GD direito (volume médio = 0,63 cm³; DP = 0,05; $p = 0,033$); SR-SL-SM esquerdo (volume médio = 0,44 cm³; DP = 0,03; $p = 0,014$) e

subiculum direito (volume médio = 0,26 cm³; DP = 0,02; p = 0,033). A redução do CA1 esquerdo foi associada ao uso atual de azatioprina (p = 0,011). A redução do volume do CA4-DG total foi associada à presença de dismetria (p = 0,030), uso atual de losartana (p = 0,011), diltiazem (p = 0,005) e bromoprida (p = 0,032). A redução do CA4-DG direito foi associada à presença de dismetria (p = 0,008), uso atual de nifedipina (p = 0,027) e diltiazem (p = 0,003). A redução do SR-SL-SM esquerdo foi associada ao envolvimento pulmonar (p = 0,048) e correlacionada com os escores do BAI (r = 0,379; p = 0,021). Além disso, a redução do *subiculum* direito foi associada ao envolvimento do trato gastrointestinal (p = 0,023) e queixas de insônia (p = 0,042).

Tabela 3 - Comparação das medidas volumétricas dos subcampos do hipocampo entre 37 pacientes com ES e 37 controles

Volume (cm ³)	Valor médio (DP)		Teste de Friedman
	37 pacientes	37 controles	Valor p
Hipocampo total	4,78 (0,38)	5,01 (0,38)	0,033*
Hipocampo direito	2,40 (0,18)	2,56 (0,19)	0,002*
Hipocampo esquerdo	2,33 (0,19)	2,48 (0,19)	0,033*
CA1 total	1,59 (0,14)	1,78 (0,13)	0,139
CA1 direito	0,87 (0,07)	0,88 (0,07)	0,622
CA1 esquerdo	0,81 (0,06)	0,87 (0,06)	0,014*
CA2/3 total	0,30 (0,02)	0,33 (0,02)	0,139
CA2/3 direito	0,17 (0,01)	0,18 (0,01)	0,869
CA2/3 esquerdo	0,13 (0,01)	0,15 (0,01)	0,071
CA4-DG total	1,23 (0,10)	1,30 (0,10)	0,001*
CA4-DG direito	0,63 (0,05)	0,66 (0,05)	0,033*
CA4-DG esquerdo	0,62 (0,05)	0,64 (0,05)	0,622
SR-SL-SM total	0,94 (0,06)	1,01 (0,07)	0,071
SR-SL-SM direito	0,48 (0,03)	0,50 (0,03)	0,139
SR-SL-SM esquerdo	0,44 (0,03)	0,50 (0,03)	0,014*
Subiculum total	0,53 (0,04)	0,59 (0,04)	0,071
Subiculum direito	0,26 (0,02)	0,29 (0,02)	0,033*
Subiculum esquerdo	0,27 (0,02)	0,30 (0,02)	0,071

DP: desvio padrão CA: Cornu Ammonis; DG: Dentate Gyrus; SR-SL-SM: Strata radiatum-lacunosum-moleculare.

Estudo de acompanhamento (*follow-up*) mostrou redução do volume do hipocampo quando comparado aos valores iniciais dos pacientes (Tabela 4): Hipocampo total (volume inicial médio = 4,78 cm³; volume médio (*follow-up*) = 4,50 cm³, $p = 0,027$); hipocampo direito (volume inicial médio = 2,40 cm³; volume médio de (*follow-up*) = 2,26 cm³, $p = 0,045$); hipocampo esquerdo (volume inicial médio = 2,33 cm³; volume médio (*follow-up*) = 2,21 cm³, $p = 0,046$). A redução do volume do hipocampo total foi associada à presença de miopatia ($p = 0,002$), queixas de memória ($p = 0,034$), uso atual de prednisona ($p = 0,008$) e bromoprida ($p = 0,021$). A redução do volume do hipocampo direito foi associada à presença de miopatia ($p = 0,044$), uso atual de prednisona ($p = 0,036$) e bromoprida ($p = 0,030$). A redução do volume do hipocampo esquerdo foi associada à presença de miopatia ($p = 0,002$), queixas de memória ($p = 0,047$), uso atual de prednisona ($p = 0,014$) e bromoprida ($p = 0,025$).

Observamos redução no CA1 total (volume inicial médio = 1,59 cm³; volume médio (*follow-up*) = 1,58 cm³, $p < 0,0001$); CA1 direito (volume inicial médio = 0,87 cm³; volume médio (*follow-up*) = 0,81 cm³, $p < 0,0001$); CA4-DG direito (volume inicial médio = 0,63 cm³; volume médio (*follow-up*) = 0,59 cm³, $p = 0,005$); CA4-DG esquerdo (volume inicial médio = 0,62 cm³; volume médio (*follow-up*) = 0,55 cm³, $p = 0,018$) e *subiculum* total (volume inicial médio = 0,53 cm³; volume médio (*follow-up*) = 0,51 cm³, $p = 0,014$). A redução do volume do subcampo CA1 total foi associada ao uso atual de bromoprida ($p = 0,025$). Além disso, a redução do volume do subcampo CA1 esquerdo foi associada à presença de miopatia ($p = 0,031$), uso atual de prednisona ($p = 0,014$) e bromoprida ($p = 0,009$). Além disso, a redução do volume do subcampo CA4-DG esquerdo foi associada à presença de miopatia ($p = 0,002$). Além disso, a redução do *subiculum* total foi associada à presença de calcinose ($p = 0,023$).

Tabela 4 - Comparação das medidas volumétricas do hipocampo dos pacientes com ES e controles

Volumes (cm ³)	Valor médio (DP)		Teste t pareado
	37 pacientes (inicial)	26 pacientes (follow-up)	Valor p
Hipocampo total	4,78 (0,38)	4,50 (0,37)	0,027*
Hipocampo direito	2,40 (0,18)	2,28 (0,19)	0,045*
Hipocampo esquerdo	2,33 (0,19)	2,21 (0,18)	0,046*
CA1 total	1,59 (0,14)	1,58 (0,13)	< 0,0001*
CA1 direito	0,87 (0,07)	0,81 (0,06)	< 0,0001*
CA1 esquerdo	0,81 (0,06)	0,79 (0,06)	0,776
CA2/3 total	0,31 (0,02)	0,30 (0,02)	0,256
CA2/3 direito	0,17 (0,01)	0,16 (0,01)	0,169
CA2/3 esquerdo	0,14 (0,01)	0,13 (0,01)	0,875
CA4-DG total	1,23 (0,10)	1,22 (0,10)	0,806
CA4-DG direito	0,63 (0,05)	0,59 (0,05)	0,005*
CA4-DG esquerdo	0,62 (0,05)	0,58 (0,04)	0,018*
SR-SL-SM total	0,94 (0,06)	0,89 (0,07)	0,131
SR-SL-SM direito	0,48 (0,03)	0,45 (0,03)	0,120
SR-SL-SM esquerdo	0,44 (0,03)	0,43 (0,03)	0,212
Subiculum total	0,53 (0,04)	0,51 (0,04)	0,014*
Subiculum direito	0,26 (0,02)	0,24 (0,02)	0,125
Subiculum esquerdo	0,27 (0,02)	0,26 (0,02)	0,144
	37 controles (inicial)	26 controles (follow-up)	Valor p
Hipocampo total	5,01 (0,38)	4,88 (0,38)	0,070
Hipocampo direito	2,56 (0,19)	2,49 (0,19)	0,129
Hipocampo esquerdo	2,48 (0,19)	2,39 (0,19)	0,097
CA1 total	1,78 (0,13)	1,79 (0,14)	0,209
CA1 direito	0,88 (0,07)	0,87 (0,07)	0,425
CA1 esquerdo	0,87 (0,06)	0,88 (0,06)	0,754
CA2/3 total	0,33 (0,02)	0,31 (0,02)	0,056
CA2/3 direito	0,18 (0,01)	0,17 (0,01)	0,157
CA2/3 esquerdo	0,15 (0,01)	0,14 (0,01)	0,024*

CA4-DG total	1,30 (0,10)	1,28 (0,10)	0,909
CA4-DG direito	0,66 (0,05)	0,65 (0,05)	0,945
CA4-DG esquerdo	0,64 (0,05)	0,63 (0,49)	0,519
SR-SL-SM total	1,01 (0,07)	1,00 (0,07)	0,994
SR-SL-SM direito	0,50 (0,03)	0,49 (0,03)	0,207
SR-SL-SM esquerdo	0,50 (0,03)	0,49 (0,03)	0,769
Subiculum total	0,59 (0,04)	0,59 (0,04)	0,466
Subiculum direito	0,29 (0,02)	0,28 (0,02)	0,237
Subiculum esquerdo	0,30 (0,02)	0,31 (0,02)	0,896

DP: desvio padrão CA: Cornu Ammonis; DG: Dentate Gyrus; SR-SL-SM: Strata radiatum-lacunosum-moleculare.

5. DISCUSSÃO GERAL

Espectroscópica multivoxel por ressonância magnética frequentemente são encontrados espectros de baixa qualidade espectral, principalmente pela alta sensibilidade da técnica às inhomogeneidades de campo magnético. Os espectros de baixa qualidade são propensos a quantificação e erros de interpretação que podem impactar significativamente o uso clínico dos dados espectroscópicos. Portanto, controle de qualidade dos espectros deve sempre preceder seu uso clínico. Quando realizada manualmente, a avaliação da qualidade dos espectros é uma tarefa demorada e também pode ser afetada pela subjetividade humana.

Ferramenta computacional proposta

Os dados de espectroscópica multivoxel por ressonância magnética (MRSI) adquiridos em regiões não-homogênea do cérebro, quase sempre, são encontrados espectros de baixa qualidade espectral (ruidosos), causados pelo efeito do volume parcial,¹²⁶ inhomogeneidade do campo magnético, contaminação por CSF e uma galeria de artefatos.^{39,40} Espectros com baixa qualidade causam erros de estimativas das concentrações dos metabólitos ou erros de interpretação que podem impactar significativamente o uso clínico dos dados espectroscópicos.⁴⁰ Quando realizada manualmente e/ou visualmente, a avaliação da qualidade dos espectros é uma tarefa demorada e também é afetada pela subjetividade humana. Portanto, a seleção automática de espectros de interesse (boa qualidade espectral), se torna uma etapa importante e extremamente necessária na análise de dados de espectroscopia multivoxel por ressonância magnética.

É possível encontrar na literatura, muitos estudos que demonstram a importância da técnica de MRSI em pesquisas e estudos clínicos, e que também apoia a necessidade de desenvolvimento de *software* de código-aberto (*open-source*), com uma interface gráfica amigável e que possa ser disponibilizada para uso na comunidade de pesquisa e também em ambientes clínicos.³⁹

Diversas ferramentas computacionais para análise e controle de qualidade de dados de MRSI foram desenvolvidas nos últimos 10 anos, porém

algumas delas são usados em uma rotina de trabalho clínico. Algumas funcionalidades para reconstrução, pré e pós-processamento e análise quantitativa de MRSI ainda precisam ser totalmente automatizados e integrados ao fluxo de trabalho clínico por meio de um *software* com uma *interface* gráfica de fácil utilização pelos pesquisadores e profissionais da saúde.

Nesse projeto de pesquisa, propomos uma metodologia para análise, visualização e controle de qualidade de dados de MRSI. A metodologia (*pipeline*) foi desenvolvida em uma ferramenta computacional, usando uma linguagem de programação científica e gratuita chamada Python/Numpy, onde cada etapa do pipeline está separada em módulos (funcionalidades). O desenvolvimento de *software* em módulos, facilita na manutenção, correção de bugs e inclusão de novas funcionalidades.

A etapa *co-registration* MRI/MRSI é uma etapa importante da ferramenta, pois através dessa etapa, podemos visualizar nas fatias da imagem anatômica (MRI), e nas três vistas (sagital, coronal e axial), o VOI dos espectros, ou seja, a região de onde os espectros foram adquiridos. Adicionalmente, essa etapa permitiu a limitar a região de interesse na imagem estrutural, na qual forma extraídas as informações sobre os tecidos e estrutura cerebral, que pode ser informações complementares para a análise. Por fim, essa etapa poderá ser usada também para validar o correto posicionamento da grade de espectros na imagem estrutural, que quase sempre é feito de forma manual pelo operador do MR *scanner*.

A ferramenta computacional desenvolvida nesse trabalho de doutorado, permitiu a seleção automática de um subconjunto de espectros com base em diferentes critérios (espectros contidos totalmente e parcialmente em um determinado tecido ou estrutura cerebral; espectros com baixa concentração de CSF e espectros similares) que permitirá a comunidade científica validar cada critério proposto ou propor novos. Além disso, a ideia de quantificar um subconjunto de espectros separadamente ou utilizando um espectro médio, deste subconjunto, como uma solução para reduzir o ruído, ainda precisam serem testados e validados utilizando dados de MRSI de diferentes regiões do cérebro, diferentes tipos de doenças e diferentes protocolos de aquisição (*Long e Short TE*).

A versão atual da ferramenta permitirá que os pesquisadores e profissionais de saúde testem e validem os critérios das métricas de qualidade espectral (SNR, FWHM e CRLB), média de espectro e outros valores de *threshold* ainda não estabelecidos e padronizados pela comunidade científica.

Apesar de ser uma versão beta, acreditamos que ferramenta computacional proposta ter potencial a ser usada e modificada por pesquisadores da área de espectroscopia por ressonância magnética.

Seleção de espectros baseado no conteúdo da imagem de ressonância magnética

A seleção de espectros de interesse, baseado no conteúdo de ressonância magnética, mostrou que é possível identificar um subconjunto de espectros que possuem interseção (totalmente ou parcialmente) com a estrutura ou tecido cerebral segmentado. No entanto, os valores dos critérios de seleção vão depender da área de interesse e características do estudo clínico. Se configurarmos uma alta porcentagem (acima de 70%) de interseção entre o voxel e a estrutura cerebral, hipocampo, por exemplo, podemos acabar sem espectros ou apenas alguns, uma vez que a estrutura é pequena, em comparação com o tamanho do voxel ($\approx 7,73 \times 6,52 \times 16\text{mm}$).

Para selecionarmos um conjunto de espectros que possuem interseção com um tecido cerebral, WM, por exemplo, podemos estabelecer um critério de seleção e considerar que o mínimo a porcentagem de conteúdo da substância branca, deve ser, por exemplo, 90 ou 95%. Entretanto, esse valor (limite) pode mudar, dependendo do tipo de estudo que está sendo realizado. O mesmo é verdade em estabelecer um critério para eliminar espectros com contaminação do CSF a partir da quantificação final: devemos estabelecer a porcentagem máxima permitida de CSF presente na região, acima do qual o espectro é descartado.

Seleção de espectros baseado em métricas de qualidade espectral e similaridade

Para a seleção de espectros de interesse (espectral com qualidade espectral), utilizamos 2 diferentes abordagens: métricas de qualidade espectral (SNR > 10, FWHM < 10 e CRLB > 50) e por similaridade usando Correlação de

Pearson ($r > 0,7$ para região homogênea do cérebro e $r > 0,5$ para região contendo diferentes tipos de tecidos - volume parcial).

A seleção de espectros de interesse usando métricas de qualidade espectral e similaridade, foi melhor quando aplicada em VOIs adquiridas no hipocampo esquerdo ou direito (grade com 63 espectros). A grade de espectros adquirido na região do hipocampo (bilateral – grade com 208 espectros) é maior do que a grade de espectros adquirida no hipocampo esquerdo ou direito, e por isso, muitos espectros estão localizados em regiões com altas concentrações de CSF.

Para o VOI adquirido na região supraventricular superior (substância branca), a seleção de espectros com alta qualidade espectral, os resultados foram semelhantes quando utilizados os valores: (SNR > 10 , FWHM < 10 e CRLB > 50) e Correlação de Pearson ($r > 0,7$), indicando que as 2 abordagens podem ser utilizadas em VOIs adquiridas em regiões homogênea do cérebro, onde existem pouco volume parcial.

Embora em nossos experimentos tenhamos usado valores de *threshold* típicos para as métricas de qualidade espectral (SNR, FWHM e CRLB) encontrados na literatura, mas até o presente momento, ainda não há consenso sobre os valores ideais e esses valores são diferentes para cada tipo de estudo. Portanto a escolha dos valores de *threshold* para SNR, FWHM, CRLB, coeficiente de correlação de Person, devem ser cuidadosamente definidos de acordo com a região do cérebro estudado e / ou estudo clínico.

Estudos clínicos

Os estudos clínicos foram realizados com o objetivo de analisar os resultados gerados pela ferramenta computacional desenvolvida nesse trabalho de doutorado e também fazer os ajustes/correções para que possa ser instalada e usada em ambientes clínicos e de pesquisas. Nos estudos de casos, utilizamos dados de espectroscopia multivoxel por ressonância magnética (MRSI), adquiridos na região supraventricular posterior (acima do corpo caloso) e hipocampo (bilateral, direito e esquerdo) de controles saudáveis e pacientes de esclerose sistêmica.

Atráves da ferramenta computacional, foi possível identificar e remover de forma automática, os espectros com baixa qualidade espectral, que permitiu

realizar análise das alterações metabólicas no hipocampo em controles e pacientes com esclerose sistêmica. A qualidade espectral quase sempre é prejudicada quando os espectros são adquiridos em regiões não- homogêneas e alta concentrações de CSF (por exemplo, no hipocampo).

Os resultados obtidos através dos estudos clínicos, demonstraram que a ferramenta poderá ser utilizada e facilmente ajustada de acordo com as necessidades particular de cada estudo, fornecendo informações para melhor entendimento das alterações metabólicas e inflamatórias, em diferentes tipos de doenças neurológicas e tumores cerebrais.

Alterações metabólicas no hipocampo em estudos clínicos

Atráves de revisão na literatura, pesquisamos os artigos no período de 1998 à 2020, que analisaram alterações metabólicas no hipocampo em estudos clínicos,¹²⁷⁻¹⁷³ utilizando espectroscopia de prótons (¹H-MRS e ¹H-MRSI) e encontramos 47 artigos sendo que:

a) Espectros rejeitados utilizando métricas de qualidade espectral - 32 artigos (68.08%):

- *Cramer-Rao lower bound* (CRLB) > 20% - 26 artigos (81,25%)
- *Full Width Half Maximum* (FWHM) > 8 Hz - 11 artigos (34,37%);
- *Signal-to-noise ratios* (SNR) < 8 - 5 artigos (15,62%)

b) Não foi realizada nenhuma análise de qualidade espectral ou não mencionada – 11 artigos (23,4%)

c) Qualidade espectral realizada utilizando inspeção manual e visual por especialistas - 6 artigos (12,76%);

d) Voxels com $\geq 30\%$ de CSF foram rejeitados - 1 artigo (2,12%);

e) Segmentação do hipocampo e rejeitados voxels com $\leq 25\%$ de tecido hipocampal - 1 artigo (2,12%)

f) Posicionamento do volume de interesse (VOI) no hipocampo:

- Bilateral - 23 artigos (48,93%)
- Esquerdo - 10 artigos (21,27%)
- Direito - 2 artigos (4,25%)

- Esquerdo e Direito simultaneamente – 12 artigos (25,53%)
- g)** Espectroscopia multi-voxel (MRSI) - 10 artigos (21,27%)
- h)** Em relação ao campo magnético (MR *scanner*):
- 1.5T – 10 artigos (21,27%)
 - 3.0T – 35 artigos (74,48%)
 - 7.0T – 2 artigos (4,25%)
- i)** Software de quantificação:
- LCModel – 30 artigos (63,82%)
 - MRI *scanner software* - 11 artigos (23,4%)
 - jMRUI – 4 artigos (8,5%)
 - N/A – 2 artigos (4,25%)

Analisando os resultados da revisão da literatura, podemos observar que ainda não existe um consenso ou padronização sobre a melhor maneira de fazer a aquisição (posicionamento do VOI), análise e controle de qualidade dos dados adquiridos no hipocampo. Portanto, as escolhas sobre o posicionamento do VOI (hipocampo direito, esquerdo ou bilateral), tempo de eco (longo ou curto), controle de qualidade espectral, seleção de espectros de interesse, devem levar em considerações as peculiaridades e objetivos de cada estudo clínico ou de pesquisa.

Nessa pesquisa, foram analisadas as concentrações dos metabólitos da região do hipocampo, utilizando espectros obtidos através de diferentes VOIs: bilateral (grade de 208 espectros) e esquerdo e direito (grade de 63 espectros). Após a quantificação dos metabólitos, obtivemos valores de níveis de concentração de metabólitos mais baixos, quando comparados com os valores obtidos ao quantificar VOIs menores (hipocampo direito e esquerdo).

Limitações e perspectivas

Há uma vasta literatura que demonstra a utilidade clínica do MRSI, que também mostra a necessidade do desenvolvimento de software de código aberto pela comunidade de pesquisa e rotinas clínicas. Mesmo que alguns softwares para análise e visualização de dados MRSI foram desenvolvidos,

apenas alguns deles são integrados no fluxo de trabalho clínico. Reconstrução, pré, pós-processamento e análise quantitativa de MRSI ainda precisam ser totalmente automatizados e integrados ao fluxo de trabalho clínico por meio de um software gráfico de fácil utilização.

Nesse presente estudo, utilizamos espectros adquiridos de apenas duas regiões do cérebro: supraventricular superior (substância branca) e hipocampo (bilateral, direito e esquerdo). Portanto, a ferramenta computacional precisa ser testada e validada com espectros adquiridos em outras regiões do cérebro e com um número maior de participantes.

Na etapa de seleção de espectros de interesse, propusemos a seleção de espectros usando similaridade de espectros, através do coeficiente de correlação de Pearson, e os resultados foram satisfatórios quando utilizados espectros livre de artefatos. Portanto, uma nova etapa (funcionalidade) de pré-processamento para identificação e correção de artefatos usando *machine learning* ou outra técnica de processamento de sinais, deverá ser implementada.

Como continuidade deste projeto, identificamos a necessidade de fazer uma análise comparativa mais detalhada sobre as diferenças obtidas na quantificação utilizando todos os espectros adquiridos e na quantificação apenas usando o subconjunto de espectros de interesse (espectro médio), para de fato, validar se a abordagem está correta e os valores de concentrações encontrados tem relevância clínica e poderão ser usados como referência em futuros estudos.

6. CONCLUSÃO

- O desenvolvimento da ferramenta computacional possibilitou na análise dos dados de espectroscopia multivoxel por ressonância magnética, adquiridas em diferentes regiões do cérebro.
- Através da ferramenta foi possível identificar e selecionar automaticamente espectros com baixa qualidade espectral através de métricas de qualidade espectral e similaridade usando Correlação de Pearson.
- Espectros adquiridos em regiões não-homogêneas (volume parcial) e com alta concentração de CSF (contaminação por CSF) precisam ser identificados e removidos de forma automática da análise dos metabólitos.
- Observamos redução de NAA/Cr na região supraventricular posterior em pacientes com ES, quando comparados aos controles, associada ao comprometimento cognitivo, presença de enxaqueca, uso de prednisona e metotrexato durante o tratamento. O estudo de acompanhamento (*follow-up*) mostrou um aumento em Cho/Cr, associada à gravidade da doença (pulmão e coração), queixas de memória, sintomas de ansiedade, uso de corrente de losartana e bromoprida.
- Observamos redução em NAA/Cr no hipocampo em pacientes com ES quando comparados a controles saudáveis, associados a comprometimento cognitivo, scores de MoCA, sintomas de ansiedade, presença de enxaqueca, queixas de memória e uso de imunossupressor durante o tratamento. O estudo de acompanhamento (*follow-up*) mostrou um aumento em Cho/Cr, correlacionado com a redução do hipocampo total.

REFERÊNCIAS

1. Sood S, Gupta A, Tsiouris AJ. Advanced magnetic resonance techniques in neuroimaging: diffusion, spectroscopy, and perfusion. In: Seminars in roentgenology 2010; 45(2), 137-146.
2. Tamby MC, Chanseaud Y; Guillevin L., et al. New insights into the pathogenesis of systemic sclerosis 2003. Autoimmunity reviews, 2(3), 152-157.
3. Steen VD, Medsger TA. Long-term outcomes of scleroderma renal crisis. Ann InternMed 2000; 133(8), 600-603.
4. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T; Medsger TA., et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. J Rheumatol 1988; 15(2), 202-205.
5. Mayes MD, Lacey JV, Beebe-Dimmer J, Gillespie BW, Cooper B, Laing TJ, et al. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology, 2003; 48(8), 2246-2255.
6. Mayes MD. Scleroderma Epidemiology. Rheumatic Disease Clinics 2003; 29(2), 239-254.
7. Baron M, et al. The relationship of dyspnoea to function and quality of life in systemic sclerosis. Annals of the rheumatic diseases 2008; 67(5), 644-650.
8. El-Baalbaki G, Razykov I, Hudson M, Bassel M, Baron M, Thombs BD; Canadian Scleroderma Research Group. Association of pruritus with quality of life and disability in systemic sclerosis. Arthritis care & research 2010; 62(10), 1489-1495.
9. Mouthon L, Mestre-Stanislas C, Bérezné A, Rannou F, Guilpain P, Revel M, Pagnoux C, Guillevin L, Fermanian J, Poiraudou S. Impact of digital ulcers on disability and health-related quality of life in systemic sclerosis. Annals of the rheumatic diseases 2010; 69(01), 214-217.
10. Benrud-Larson LM, Haythornthwaite JA, Heinberg LJ, Boling C, Reed J, White B, Wigley FM. The impact of pain and symptoms of depression in scleroderma. Pain 2002; 95 (3), 267-75.
11. Nietert PJ, Mitchell HC, Bolster MB, Curran MY, Tilley BC, Silver RM. Correlates of depression, including overall and gastrointestinal functional status,

among patients with systemic sclerosis. *The Journal of rheumatology* 2005; 32(1), 51-57.

12. Evans DL, Charney DS, Lewis L, Golden RN, Gorman JM, Krishnan KR, et al. Mood disorders in the medically ill: scientific review and recommendations. *Biological psychiatry* 2005; 58(3), 175-189.

13. Wulsin LR, Singal BM. Do depressive symptoms increase the risk for the onset of coronary disease? A systematic quantitative review. *Psychosomatic medicine* 2003; 65(2), 201-210.

14. Glassman AH, Helzer JE, Covey LS, Cottler LB, Stetner F, Tipp JE, et al. Smoking, smoking cessation, and major depression. *Jama* 1990; 264(12), 1546-1549.

15. Ziegelstein RC, Fauerbach JA, Stevens SS, Romanelli J, Richter DP, Bush DE. Patients with depression are less likely to follow recommendations to reduce cardiac risk during recovery from a myocardial infarction. *Archives of internal medicine* 2000; 160(12), 1818-1823.

16. Thombs BD, Taillefer SS, Hudson M, Baron M. Depression in patients with systemic sclerosis: a systematic review of the evidence. *Arthritis Care & Research* 2007; 57(6), 1089-1097.

17. Sardanelli F, et al. White matter hyperintensities on brain magnetic resonance in systemic sclerosis. *Annals of the rheumatic diseases* 2005; 64(5), 777-779.

18. Pathak R, Gabor AJ. Scleroderma and central nervous system vasculitis. *Stroke* 1991; 22(3), 410-413.

19. Fornes, P; Chatellier, J; Emmerich J, et al. Central nervous system involvement in scleroderma. *Annales de medecine interne* 2002; 53(3):179-182.

20. Andonopoulos A.P, Maraziotis T, Yarmenitis S et al. Multiple spontaneous intracerebralhaemorrhage in a patient with progressive systemic sclerosis. *Revue du rhumatisme (English ed.)* 1998; 65(6), 437-440.

21. Cutolo M, Nobili F, Sulli A et al. Evidence of cerebral hypoperfusion in scleroderma patients. *Rheumatology* 2000; 39(12), 1366-1373.

22. Blaszczyk M, Krolicki L, Krasu M et al. Progressive facialhemiatrophy: central nervous system involvement and relationship with scleroderma en coupe de sabre. *The Journal of rheumatology* 2003; 30(9), 1997-2004.

23. Chung MH, Sum J, Morrel MJ, Horoupian, D.S et al. Intracerebral

- involvement in scleroderma en coup de sabre: report of a case with neuropathologic findings. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society* 1995; 37(5), 679-681.
24. Mohammed RH; Sabry YY, Nasef AA., Brain MRI screening showing evidences of early central nervous system involvement in patients with systemic sclerosis. *Rheumatology international* 2011; 31(5), 667-671.
25. Mohamed RH, Nassef AA. Brain magnetic resonance imaging findings in patients with systemic sclerosis. *International journal of rheumatic diseases* 2010; 13(1), 61–67.
26. Pearson JD. The endothelium: its role in scleroderma. *Annals of the rheumatic diseases* 1991; 50(Suppl 4), 866.
27. Blann AD, Illingworth K, Layson MIV. Mechanisms of endothelial damage in systemic sclerosis and Raynaud's phenomenon. *The Journal of rheumatology* 1993; 20(8), 1325-1330.
28. Frahm J, et al. Localized proton NMR spectroscopy in different regions of the human brain in vivo. Relaxation times and concentrations of cerebral metabolites. *Magnetic Resonance in Medicine* 1989; 11(1), 47-63.
29. Hubsch B, et al. Clinical MRS studies of the brain. *Investigative radiology* 1989, 24(12), 1039-1042.
30. Faghihi R, et al. Magnetic resonance spectroscopy and its clinical applications: a review. *Journal of medical imaging and radiation sciences* 2017; 48(3), 233-253
31. Öz G, et al. Clinical proton MR spectroscopy in central nervous system disorders. *Radiology* 2014; 270(3), 658-679.
32. Bertholdo D, Watcharakorn A, Castillo M. Brain proton magnetic resonance spectroscopy: introduction and overview. *Neuroimaging Clinics* 2013; 23(3), 359-380.
33. Alger JR. Quantitative proton magnetic resonance spectroscopy and spectroscopic imaging of the brain: a didactic review. *Topics in magnetic resonance imaging. Topics in magnetic resonance imaging: TMRI* 2010; 21(2), 115.
34. Novotny JR, Edward J., et al. Magnetic resonance spectroscopy of neurotransmitters in human brain. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society* 2003;

54(S6), S25-S31.

35. Frittoli RB, Pereira DR., et al. Proton magnetic resonance spectroscopy (¹H-MRS) in rheumatic autoimmune diseases: A systematic review. *Lupus* 2020; 29(14), 1873-1884.

36. Brandao LA, Castillo M. Adult brain tumors: clinical applications of magnetic resonance spectroscopy. *Magnetic Resonance Imaging Clinics* 2016; 24(4), 781-809.

37. Durmo F, et al. Multivoxel ¹H-MR spectroscopy biometrics for preoperative differentiation between brain tumors. *Tomography* 2018; 4(4), 172-181.

38. Nelson SJ. Multivoxel magnetic resonance spectroscopy of brain Tumors1. *Molecular cancer therapeutics* 2003; 2(5), 497-507.

39. Maudsley AA, et al. Advanced magnetic resonance spectroscopic neuroimaging: Experts' consensus recommendations. *NMR in Biomedicine* 2021; 34(5), e4309.

40. Kreis R. Issues of spectral quality in clinical ¹H-magnetic resonance spectroscopy and a gallery of artifacts. *NMR in Biomedicine* 2004; 17(6), 361-381.

41. Vidya RR, Chang JC., Hu HH, Kodibagkar VD. Fast data acquisition techniques in magnetic resonance spectroscopic imaging. *NMR in Biomedicine* 2019; 32(3), e4046.

42. Bogner W, Otazo R, Henning A. Accelerated MR spectroscopic imaging - a review of current and emerging techniques. *NMR in Biomedicine* 2021; 34(5), e4314

43. Cecil KM, Naid P. Advances in Pediatric Neuroimaging. MR Spectroscopy. In: *Seminars in pediatric neurology*. WB Saunders 2020; 33,100798.

44. Gruber S, et al. Metabolic changes in the normal ageing brain: consistent findings from short and long echo time proton spectroscopy. *European journal of radiology* 2008; 68(2), 320-327.

45. Považan M, Mikkelsen M, Berrington A, Bhattacharyya PK, Brix MK, Buur PF, Barker PB. Comparison of multivendor single-voxel MR spectroscopy data acquired in healthy brain at 26 sites. *Radiology* 2020; 295(1), 171-180.

46. Barisano G, Seppehrband F, Ma S, Jann K, Cabeen R, Wang DJ, Law M. Clinical 7 T MRI: Are we there yet? A review about magnetic resonance imaging at ultra-high field. *The British journal of radiology* 2019; 92(1094), 20180492.

47. Trattnig S, Springer E., Bogner W, Hangel G, Strasser B, Dymerska B, Robinson SD, et al. Key clinical benefits of neuroimaging at 7 T. *Neuroimage* 2018; 168, 477-489.
48. Chadzynski GL, Pohmann R, Shajan G, Kolb R, Bisdas S, Klose U, Scheffle K. In vivo proton magnetic resonance spectroscopic imaging of the healthy human brain at 9.4 T: initial experience. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine* 2015; 28(3), 239-249.
49. Motyka S, Moser P, Hingerl L, Hangel G, Heckova E, Strasser B, Bogner, W. The influence of spatial resolution on the spectral quality and quantification accuracy of whole-brain MRSI at 1.5 T, 3T, 7T, and 9.4 T. *Magnetic resonance in medicine* 2019; 82(2), 551-565.
50. Provencher SW. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magnetic resonance in medicine* 1993; 30(6),672-679.
51. Iqbal Z, Nguyen D, Hangel G, Motyka S, Bogner W, Jiang S. Super-resolution 1h magnetic resonance spectroscopic imaging utilizing deep learning. *Frontiers in oncology* 2019; 9, 1010.
52. Maudsley AA, Lin E, Weiner MW. Spectroscopic imaging display and analysis. *Magnetic resonance imaging* 1992; 10(3), 471-485.
53. Vigneron DB, et al. Chemical shift imaging of human brain: axial, sagittal, and coronal P-31 metabolite images. *Radiology* 1990; 177(3), 643-649.
54. Soher BJ, et al. Automated spectral analysis III: application to in vivo proton MR spectroscopy and spectroscopic imaging. *Magnetic resonance in medicine* 1998; 40(6), 822-831.
55. Le Fur Y, et al. Grid-free interactive and automated data processing for MR chemical shift imaging data. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine* 2010; 23(1), 23-30.
56. Pouillet J, et al. An automated quantitation of short echo time MRS spectra in an open source software environment: AQSES. *NMR in Biomedicine: An International Journal Devoted to the Development and Application of Magnetic Resonance in vivo* 2007; 20(5), 493-504.
57. Naressi A. et al. Java-based graphical user interface for the MRUI quantitation package. *Magnetic resonance materials in physics, biology and medicine* 2001; 12 (2-3), 141.

58. Wilson M, et al. A constrained least-squares approach to the automated quantitation of in vivo ^1H magnetic resonance spectroscopy data. *Magnetic resonance in medicine* 2011, 65(1), 1-12.
59. Crane JC, Olson MP, Nelson, SJ. SIVIC: open-source, standards-based software for DICOM MR spectroscopy workflows. *International journal of biomedical imaging* 2013; 2013.
60. Jiru F, et al. JSIPRO—analysis tool for magnetic resonance spectroscopic imaging. *Computer methods and programs in biomedicine* 2013; 112(1), 173-188.
61. Lei Y, et al. Deep learning-based denoising for magnetic resonance spectroscopy signals. In: *Medical Imaging 2021: Biomedical Applications in Molecular, Structural, and Functional Imaging*. International Society for Optics and Photonics 2021; 11600, 1160006.
62. Bhaduri S, et al. SCSA based MATLAB pre-processing toolbox for ^1H MR spectroscopic water suppression and denoising. *Informatics in Medicine Unlocked* 2020; 18,100294.
63. Ortega-Martorell S, et al. SpectraClassifier 1.0: a user friendly, automated MRS-based classifier-development system. *BMC bioinformatics* 2010; 11(1), 1-14.
64. Juchem C. INSPECTOR-magnetic resonance spectroscopy software, Columbia TechVenture (CTV): p. License CU17130, 2016.
65. Soher B, Semanchuk P, Todd D, Steinberg J, Young K, Vespa: integrated applications for rf-pulse design, spectral simulation and mrs data analysis. *Proc Int Soc Magn Reson Med* 2011; 19(19), 1410.
66. Edden RA, Puts NA, Harris AD, Barker PB, Evans CJ, Gannet: A batch-processing tool for the quantitative analysis of gamma-aminobutyric acid—edited MR spectroscopy spectra. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 2014; 40(6), 1445–1452.
67. Simpson R, Devenyi GA, Jezzard P, Hennessy TJ, Near J. Advanced processing and simulation of mrs data using the fid appliance (FID-A) - an open source, matlab-based toolkit. *Magnetic Resonance in Medicine* 2017; 77(1), 23–33.
68. Oeltzschner G, Zöllner HJ, Hui SC, Mikkelsen M, Saleh MG, Tapper S, Edden RA. Osprey: Open-source processing, reconstruction & estimation of

magnetic resonance spectroscopy data. *Journal of Neuroscience Methods* 2020; 343, 108827.

69. Novotny JR, Edward J., et al. Magnetic resonance spectroscopy of neurotransmitters in human brain. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society* 2003; 54(S6), S25-S31.

70. Schuff N, Meyerhoff DJ, Mueller S, Chao L, Sacrey DT, Laxer K, Weiner MW. N-acetylaspartate as a marker of neuronal injury in neurodegenerative disease. *Adv Exp Med Biol* 2006; 241-262.

71. Kirov II, Sollberger M, Davitz MS., Glodzik L, Soher BJ, Babb JS, Gonen O. Global brain volume and N-acetyl-aspartate decline over seven decades of normal aging. *Neurobiology of Aging* 2021; 98, 42-51.

72. Kreis R, Ernst T, Ross BD. Development of the human brain: in vivo quantification of metabolite and water content with proton magnetic resonance spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine* 1993; 30(4), 424-437.

73. Pouwels PJW, Frahm J. Regional metabolite concentrations in human brain as determined by quantitative localized proton MRS. *Magnetic resonance in medicine* 1998; 39(1) 53-60.

74. Saunders DE, et al. Aging of the adult human brain: in vivo quantitation of metabolite content with proton magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance Imaging: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine* 1999; 9(5), 711-716.

75. Schuff N, et al. Age-related metabolite changes and volume loss in the hippocampus by magnetic resonance spectroscopy and imaging. *Neurobiology of aging* 1999; 20(3); 279-285.

76. Chang L, et al. In vivo proton magnetic resonance spectroscopy of the normal aging human brain. *Life sciences* 1996; 58(22), 2049-2056.

77. Charles HC, et al. Proton spectroscopy of human brain: effects of age and sex. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 1994; 18(6) 995-1004.

78. Fukuzako H, et al. Metabolite changes with age measured by proton magnetic resonance spectroscopy in normal subjects. *Psychiatry and clinical neurosciences* 1997; 51(4), 261-263.

79. Lim KO, Spielman DM, Estimating NAA in cortical gray matter with

applications for measuring changes due to aging. *Magnetic resonance in medicine* 1997, 37(3), 372-377.

80. Pfefferbaum A, et al., In vivo spectroscopic quantification of the N-acetyl moiety, creatine, and choline from large volumes of brain gray and white matter: effects of normal aging. *Magnetic Resonance in Medicine: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine* 1999, 41(2), 276-284.

81. Maghsudi H, Schütze M, Maudsley AA, Dadak M, Lanfermann H, Ding XQ. Age-related Brain Metabolic Changes up to Seventh Decade in Healthy Humans. *Clinical neuroradiology* 2020; 30(3), 581-589.

82. Wang Y, Li SJ. Differentiation of metabolic concentrations between gray matter and white matter of human brain by in vivo ¹H magnetic resonance spectroscopy. *Magnetic resonance in medicine* 1998; 39 (1), 28-33.

83. Doyle TJ; Beddell BJ, Narayana PA, Relative concentration of proton MR visible neurochemicals in gray and white matter in human brain. *Magnetic resonance in medicine* 1995; 33(6), 755-759.

84. Krukowski P, et al. Analysis of the brain proton magnetic resonance spectroscopy—differences between normal grey and white matter. *Polish journal of radiology* 2010; 75 (2), 22.

85. Brown ES, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of lamotrigine for prescription corticosteroid effects on the human hippocampus. *European Neuropsychopharmacology* 2019; 29(3), 376-383.

86. Chang R, Geng Z, Zhu Q, Song Z, Wang Y. Proton magnetic resonance spectroscopy reveals significant decline in the contents of N-acetylaspartylglutamate in the hippocampus of aged healthy subjects. *Archives of medical science: AMS* 2017; 13(1), 124.

87. Soares DP, Law M. Magnetic resonance spectroscopy of the brain: review of metabolites and clinical applications. *Clinical radiology* 2009; 64(1), 12-21.

88. van der Graaf M. In vivo magnetic resonance spectroscopy: basic methodology and clinical applications *European Biophysics Journal* 2010; 39(4), 527-540.

89. Pimentel-Silva JR, Cendes F. Proton magnetic resonance spectroscopy in epilepsy: key findings. *J. epilepsy clin. neurophysiol*, 2015.

90. Petroff OAC, Errante LD, Kim JH. N-acetyl-aspartate, total creatine, and

myo-inositol in the epileptogenic human hippocampus. *Neurology* 2003; 60(10):1646–1651.

91. Valentini G. The assessment of the patient with systemic sclerosis. *Autoimmunity reviews* 2003;2(6):370-376.

92. Hudson M, Steele R, Canadian Scleroderma Research G, Baron M. Update on indices of disease activity in systemic sclerosis. *Seminars in arthritis and rheumatism* 2007;37(2):93-98.

93. Nasreddine ZS, Phillips NA, Bedirian V, Charbonneau S, Whitehead V, Collin I, et al. The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2005;53(4):695-699.

94. Bertolucci PHF, Sarmiento ALR, Wajman JR. Brazilian Portuguese version for the Montreal Cognitive Assessment (MoCA) and the preliminary results. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association* 2008; 4(4), T686.

95. Duro D, Simões MR, Ponciano E, Santana I. Validation studies of the Portuguese experimental version of the Montreal Cognitive Assessment (MoCA): confirmatory factor analysis. *Journal of Neurology* 2010; 257(5), 728-734.

96. Beck AT, Ward CH, Mendelson M, Mock J, Erbaugh J. An inventory for measuring depression. *Archives of general psychiatry* 1961; 4:561-571.

97. Gomes-Oliveira MH, Gorenstein C, Lotufo Neto F, Andrade LH, Wang YP. Validation of the Brazilian Portuguese version of the Beck Depression Inventory-II in a community sample. *Revista brasileira de psiquiatria* 2012; 34(4):389-394.

98. Beck AT, Epstein N, Brown G, Steer RA. An inventory for measuring clinical anxiety: psychometric properties. *Journal of consulting and clinical psychology*. 1988;56(6):893.

99. Manjón JV, Coupé P. volBrain: an online MRI brain volumetry system. *Frontiers in neuroinformatics* 2016; 10, 30.

100. Fischl B. FreeSurfer. *Neuroimage* 2012; 62(2), 774-781.

101. Næss-Schmidt E, Tietze A, Blicher JU, Petersen M, Mikkelsen IK, Coupé, P, Eskildsen SF. Automatic thalamus and hippocampus segmentation from MP2RAGE: comparison of publicly available methods and implications for DTI

quantification. *International journal of computer assisted radiology and surgery* 2016; 11(11), 1979-1991.

102. Winterburn JL, Pruessner JC, Chavez S, Schira MM, Lobaugh NJ, Voineskos AN, Chakravarty MM. A novel in vivo atlas of human hippocampal subfields using high-resolution 3T magnetic resonance imaging. *NeuroImage* 2013;74:254–265.

103. Yushkevich PA, Amaral RS, et al. Quantitative comparison of 21 protocols for labeling hippocampal subfields and parahippocampal subregions in in vivo MRI: towards a harmonized segmentation protocol. *NeuroImage* 2015; 111:526–541.

104. Walt S, Colbert SC, Varoquaux G, The NumPy Array: A Structure for Efficient Numerical Computation. *Computing in Science & Engineering* 2011; 13(2), 22–30.

105. Pereira, D, et al. Open-source toolbox for analysis and spectra quality control of magnetic resonance spectroscopic imaging. *Medical Imaging: Biomedical Applications in Molecular, Structural, and Functional Imaging*. International Society for Optics and Photonics, 2021; 11600.

106. Fontolan J, Pereira D, Souza R, Appenzeller S, Rittner L. Improving estimates of brain metabolite concentrations in MR spectroscopic imaging (MRSI) through MRI content. *Medical Imaging: Biomedical Applications in Molecular, Structural, and Functional Imaging*, International Society for Optics and Photonics 2019; 10953, 109530.

107. Hess AT, Jacobson SW, Jacobson JL, Molteno CD, van der Kouwe AJ, Meintjes EM. A comparison of spectral quality in magnetic resonance spectroscopy data acquired with and without a novel epi-navigated press sequence in school-aged children with fetal alcohol spectrum disorders. *Metabolic brain disease* 2014; 29(2), 323–332.

108. Van Der Graaf M, Julia-Sapé M, Howe FA, Ziegler A, Majos C, Moreno-Torres A, Rijpkema M, Acosta D, Opstad KS, van der Meulen YM., et al., MRS quality assessment in a multicentre study on MRS-based classification of brain tumours, *NMR in Biomedicine* 2008; 21(2), 148–158.

109. Mukaka MM. A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi medical journal* 2012; 24(3), 69–71.

110. Sedgwick P. Pearson's correlation coefficient. *The BMJ Journals* 2012;

345.

111. Denton CP Khanna D. Systemic sclerosis. *The Lancet* 2017; 390(10103), 1685-1699.

112. Mahoney JM, Taroni J, Martyanov V, et al. Systems level analysis of systemic sclerosis shows a network of immune and profibrotic pathways connected with genetic polymorphisms. *PLoS Comput Biol* 2015; 11: e1004005.

113. Varga J, Trojanowska M, Kuwana M. Pathogenesis of systemic sclerosis: Recent insights of molecular and cellular mechanisms and therapeutic opportunities. *J Scleroderma Relat Disord.* 2017;2(3):137–152.

114. Mohamed RH, Nassef AA. Brain magnetic resonance imaging findings in patients with systemic sclerosis. *International journal of rheumatic diseases* 2010;13(1),61-67.

115. Veale DJ, Collidge TA, Belch JJ. Increased prevalence of symptomatic macrovascular disease in systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1995; 54(10), 853-855.

116. Hettema ME, Bootsma H, Kallenberg CG. Macrovascular disease and atherosclerosis in SSc *Rheumatology (Oxford)*, 2008; 47, 578-583.

117. Nussinovitch U, Shoenfeld Y. Atherosclerosis and macrovascular involvement in systemic sclerosis: myth or reality. *Autoimmunity reviews* 2011; 10(5),259-266.

118. Bombini MF, Peres FA, Lapa AT, Sinicato NA, Quental BR, Pincelli ÁSM, Amaral TN, Gomes CC, Del Rio AP, Marques-Neto JF, Costallat LTL, Fernandes PT, Cendes F, Rittner L, Appenzeller S. Olfactory function in systemic lupus erythematosus and systemic sclerosis. A longitudinal study and review of the literature. *Autoimmunity reviews* 2018;17(4):405-412.

119. Hunsaker MR, Lee B, Kesner RP. Evaluating the temporal context of episodic memory: the role of CA3 and CA1. *Behavioural brain research* 2008; 188(2), 310-315.

120. Yassa MA, Stark CE. Pattern separation in the hippocampus. *Trends in neurosciences* 2011; 34(10), 515-525.

121. Schultz C, Engelhardt M. Anatomy of the hippocampal formation. *The Hippocampus in Clinical Neuroscience* 2014; 34, 6-17.

122. Maller JJ, Broadhouse K, Rush AJ, Gordon E, Koslow S, Grieve, SM. Increased hippocampal tail volume predicts depression status and remission to

anti-depressant medications in major depression. *Molecular psychiatry* 2018; 23(8), 1737-1744.

123. Müller MJ, Greverus D, Dellani PR, Weibrich C, Wille PR, Scheurich A, Fellgiebel A. Functional implications of hippocampal volume and diffusivity in mild cognitive impairment. *Neuroimage* 2005; 28(4), 1033-1042.

124. Mueller SG, Schuff N, Yaffe K, Madison C, Miller B, Weiner MW. Hippocampal atrophy patterns in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Human brain mapping* 2010; 31(9) 1339-1347.

125. Verhelst HE, Beele H, Joos R, Vanneuville B, Van Coster RN. Hippocampal atrophy and developmental regression as first sign of linear scleroderma "en coup de sabre". *European Journal of Paediatric Neurology* 2008; 12(6), 508-511.

126. Tal A, Kirov II, Grossman RI, Gonen O. The role of gray and white matter segmentation in quantitative proton MR spectroscopic imaging. *NMR in Biomedicine* 2012; 25 (12),1392-1400.

127. Spurny B, Seiger R, Moser P, Vanicek T, Reed MB, Heckova E, Lanzenberger R. Hippocampal GABA levels correlate with retrieval performance in an associative learning paradigm. *NeuroImage* 2020; 204, 116244.

128. Demnitz N, Topiwala A, Zsoldos E, Stagg CJ, Emir UE, Johansen-Berg, H, Sexton CE. Alcohol consumption is associated with reduced creatine levels in the hippocampus of older adults. *Psychiatry Research: Neuroimaging* 2020; 295, 111019.

129. Sporn L, MacMillan EL, Ge R, Greenway K, Vila-Rodriguez F, Laule C. Longer repetition time proton MR spectroscopy shows increasing hippocampal and parahippocampal metabolite concentrations with aging. *Journal of Neuroimaging* 201; 29 (5), 592-597.

130. Kraguljac NV, Morgan CJ, Reid MA, White DM, Jindal RD, Sivaraman S, Lahti A. A longitudinal magnetic resonance spectroscopy study investigating effects of risperidone in the anterior cingulate cortex and hippocampus in schizophrenia. *Schizophrenia research* 2019; 210, 239-244.

131. Kaur M., et al. Elucidating the glutamatergic processes underlying mismatch negativity deficits in early stage bipolar disorder and schizophrenia: A combined ¹H-MRS and EEG study. *Journal of psychiatric research* 2019; 113, 83-89.

132. Brown ES., et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of lamotrigine for prescription corticosteroid effects on the human hippocampus. *European Neuropsychopharmacology* 2019; 29(3), 376-383.
133. Xu J, Sun W, Li Y. Association between iron metabolism and cognitive impairment in older non-alcoholic fatty liver disease individuals: A cross-sectional study in patients from a Chinese center. *Medicine* 2019; 98, 48.
134. Tiwari V., et al. Distinction of the GABA 2.29 ppm resonance using triple refocusing at 3 T in vivo. *Magnetic resonance in medicine* 2018; 80(4), 1307-1319.
135. Gao F., et al. Altered hippocampal GABA and glutamate levels and uncoupling from functional connectivity in multiple Sclerosis. *Hippocampus* 2018; 28(11), 813-823.
136. Zhang Y., et al. Comparison of reproducibility of single voxel spectroscopy and whole-brain magnetic resonance spectroscopy imaging at 3T. *NMR in Biomedicine* 2018; 31(4), e3898.
137. Tang Y., et al. Elevated hippocampal choline level is associated with altered functional connectivity in females with major depressive disorder: a pilot study. *Psychiatry Research: Neuroimaging* 2018; 278, 48-55.
138. Silveira LE., et al. Hippocampal neurochemical markers in bipolar disorder patients following the first-manic episode: a prospective 12-month proton magnetic resonance spectroscopy study. *Australian & New Zealand Journal of Psychiatry* 2017; 51(1), 65-74.
139. Shakory S., et al. Hippocampal glutamate metabolites and glial activation in clinical high risk and first episode psychosis. *Neuropsychopharmacology* 2018; 43(11), 2249-2255.
140. Rijpma A., et al. Altered brain high-energy phosphate metabolism in mild Alzheimer's disease: A 3-dimensional ³¹P MR spectroscopic imaging study. *NeuroImage: Clinical* 2018; 18, 254-261.
141. Modinos G., et al. Prefrontal GABA levels, hippocampal resting perfusion and the risk of psychosis. *Neuropsychopharmacology* 2018; 43(13), 2652-2659.
142. Bossong MG., et al. Human striatal response to reward anticipation linked to hippocampal glutamate levels. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 2018; 21(7), 623-630.
143. Karczewska-Kupczewska M., et al. Intralipid/Heparin Infusion Alters Brain

Metabolites Assessed with ¹H-MRS Spectroscopy in Young Healthy Men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2018; 103(7), 2563-2570.

144. Kroll JL. et al. Hippocampal metabolites in asthma and their implications for cognitive function. *NeuroImage: Clinical* 2018; 19, 213-221.

145. Klauser P., et al. N-acetylcysteine add-on treatment leads to an improvement of fornix white matter integrity in early psychosis: a double-blind randomized placebo-controlled trial. *Translational psychiatry* 2018; 8(1),1-8.

146. Xu J., et al. Left fimbria atrophy is associated with hippocampal metabolism in female major depressive disorder patients. 40th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC). IEEE, 2018; 1136-1139.

147. Bossong MG., et al. Association of hippocampal glutamate levels with adverse outcomes in individuals at clinical high risk for psychosis. *JAMA psychiatry* 2019; 76(2), 199-207.

148. Zeng Y et al. Effects of acupuncture on cancer-related cognitive impairment in Chinese gynecological cancer patients: a pilot cohort study. *Integrative cancer therapies* 2018; 17(3), 737-746.

149. Coplan JD., et al. Neurobiology of the dorsolateral prefrontal cortex in GAD: Aberrant neurometabolic correlation to hippocampus and relationship to anxiety sensitivity and IQ. *Journal of affective disorders* 2018; 229, 1-13.

150. Rijpmma A., et al. Altered brain high-energy phosphate metabolism in mild Alzheimer's disease: A 3-dimensional ³¹P MR spectroscopic imaging study. *NeuroImage: Clinical* 2018; 18, 254-261.

151. Voets NL., et al. Hippocampal MRS and subfield volumetry at 7T detects dysfunction not specific to seizure focus. *Scientific reports* 2017; 7(1), 1-14.

155. Steinke J., et al. Hippocampal metabolism and prefrontal brain structure: A combined ¹H-MR spectroscopy, neuropsychological, and voxel-based morphometry (VBM) study. *Brain research* 2017; 1677, 14-19.

153. Singh S., et al. Evidence for regional hippocampal damage in patients with schizophrenia. *Neuroradiology* 2018; 60(2), 199-205.

154. Shin JE., et al. Association between memory impairment and brain metabolite concentrations in North Korean refugees with posttraumatic stress disorder. *PLoS one* 2017; 12(12), e0188953.

155. Rosso IM., et al. Hippocampus glutamate and N-acetyl aspartate

markers of excitotoxic neuronal compromise in posttraumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology* 2017; 42(8), 1698-1705.

156. Shirayama Y., et al. Myo-inositol, glutamate, and glutamine in the prefrontal cortex, hippocampus, and amygdala in major depression. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging* 2017; 2(2), 196-204.

157. Meyer EJ. et al. Metabolic abnormalities in the hippocampus of patients with schizophrenia: a 3D multivoxel MR spectroscopic imaging study at 3T. *American Journal of Neuroradiology* 2016; 37(12) 2273-2279.

158. Allaili N., et al. Single-voxel ¹H spectroscopy in the human hippocampus at 3 T using the LASER sequence: characterization of neurochemical profile and reproducibility. *NMR in Biomedicine* 2015; 28(10), 1209-1217.

159. Resmini E., et al. Hippocampal dysfunction in cured Cushing's syndrome patients, detected by ¹H-MR-spectroscopy. *Clinical endocrinology* 2013; 79(5), 700-707.

160. Kraguljac NV., et al. Increased hippocampal glutamate and volumetric deficits in unmedicated patients with schizophrenia. *JAMA psychiatry* 2013; 70(12), 1294-1302.

161. Chiu P., et al. Metabolic changes in the anterior and posterior cingulate cortices of the normal aging brain: proton magnetic resonance spectroscopy study at 3T. *Age* 2014; 36(1), 251-264.

162. Eckart C., et al. Magnetic resonance volumetry and spectroscopy of hippocampus and insula in relation to severe exposure of traumatic stress. *Psychophysiology* 2012; 49(2), 261-270.

163. Shu X., et al. More vulnerability of left than right hippocampal damage in right-handed patients with post-traumatic stress disorder. *Psychiatry Research: Neuroimaging* 2013; 212(3), 237-244.

164. He Z., et al. Detection of metabolites in the white matter of frontal lobes and hippocampus with proton in first-episode treatment-naïve schizophrenia patients. *Early intervention in psychiatry* 2012; 6(2),166-175.

165. Guo M., et al. Study of the hippocampus and the anterior cingulate gyrus by proton MR spectroscopy in patients with post-traumatic stress disorder. *Asian Pacific journal of tropical medicine* 2012; 5(2), 162-164.

166. Ham B., et al. Decreased N-acetyl-aspartate levels in anterior cingulate and hippocampus in subjects with post-traumatic stress disorder: a proton

magnetic resonance spectroscopy study. *European journal of neuroscience* 2007; 25(1), 324-329.

167. Li L., et al. Magnetic resonance imaging and magnetic resonance spectroscopy study of deficits in hippocampal structure in fire victims with recent-onset posttraumatic stress disorder. *The Canadian Journal of Psychiatry* 2006; 51(7), 431-437.

168. Szentkuti A., et al. Quantitative MR analyses of the hippocampus: unspecific metabolic changes in aging. *Journal of neurology* 2004; 251(11), 1345-1353.

169. Driscoll I., et al. The aging hippocampus: cognitive, biochemical and structural findings. *Cerebral cortex* 2003; 13(12), 1344-1351.

170. Fannon D., et al. Selective deficit of hippocampal N-acetylaspartate in antipsychotic-naive patients with schizophrenia. *Biological Psychiatry* 2003; 54(6), 587-598.

171. Schuff N., et al. Decreased hippocampal N-acetylaspartate in the absence of atrophy in posttraumatic stress disorder. *Biological psychiatry* 2001; 50(12), 952-959.

172. Schuff N., et al. Age-related metabolite changes and volume loss in the hippocampus by magnetic resonance spectroscopy and imaging. *Neurobiology of aging* 1999; 20(3), 279-285.

173. Freeman TW., et al. In vivo proton magnetic resonance spectroscopy of the medial temporal lobes of subjects with combat-related posttraumatic stress disorder. *Magnetic resonance in medicine* 1998; 40(1), 66-71.

ANEXOS

Anexo 1: Documentos de aprovação no Comitê de Ética da Unicamp



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: TÉCNICAS PARA ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA MULTI-VOXEL POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA (1H-MRS): ESTUDO APLICADO EM ESPECTROS ADQUIRIDOS NO HIPOCAMPO E SUBSTÂNCIA BRANCA NORMAL DE PACIENTES COM ESCLEROSE SISTÊMICA

Pesquisador: Simone Appenzeller

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 80872917.4.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas - UNICAMP

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.514.166

Apresentação do Projeto:

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença autoimune, caracterizada por inflamação crônica, fibrose de pele e comprometimento vascular. A ES apresenta períodos de atividade e remissão. Em sua evolução, a fase inicial inflamatória é seguida de fibrose e esclerose da derme, bem como envolvimento de diversos órgãos. Alterações endoteliais, da microcirculação, do sistema imunológico e da matriz celular compõem os mecanismos patológicos da doença. Os pacientes podem manifestar sintomas variados, tanto objetivos quanto subjetivos, decorrentes do acometimento da pele, coração, articulações, rins, pulmões, trato gastrointestinal, vasos sanguíneos e recentemente foi descrita alteração olfatória. A doença é complexa, o que torna necessário, critérios classificatórios pormenorizados. As manifestações clínicas da ES são heterogêneas e podem comprometer a execução de inúmeras tarefas. Por isso, depressão e ansiedade são comuns, porém pouco estudadas. Desta forma, estratégias complementares alternativas que vislumbrem a melhora da qualidade de vida do paciente, ampliam as possibilidades de tratamento não invasivo. Nos exames de ressonância magnética (RM) o principal achado é o acometimento da substância branca, sugestivo de vasculopatia. Manifestações clínicas correspondente a essas lesões podem ocorrer, mas muitos pacientes são assintomáticos e testes neuro-psicológicos podem ser eficientes como exames complementares ao diagnóstico. O

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.514.166

presente estudo tem como objetivo determinar os achados de espectroscopia na ressonância magnética cerebral de pacientes com ES e correlacioná-las com achados neuro-psiquiátricos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Analisar a concentração dos metabólitos cerebrais (NAA, Cho, Cr, Lac e mIno) adquiridos no hipocampo e na substância branca normal em pacientes com ES e de controles, através da espectroscopia de multi-voxel por ressonância magnética.

Objetivo Secundário:

- Desenvolver métodos e ferramentas computacionais para selecionar um subconjunto de espectros (voxels) que foram adquiridos (totalmente ou parcialmente) no hipocampo;
- Identificar espectros ruidosos e eliminá-los automaticamente da análise;
- Propor formas de analisar os espectros selecionados: média, média ponderada e espectros centrais e, posteriormente, comparar os resultados obtidos em cada uma delas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O possível desconforto relacionado ao exame de ressonância é o ruído intermitente durante os primeiros 15 minutos. Depois disso o ruído será muito menor. O pessoal técnico providenciará tapas-ouvido para me deixar mais confortável. Não existem efeitos nocivos associados com a ressonância magnética dentro das condições utilizadas atualmente.

Benefícios:

Não será obtida nenhuma vantagem direta com sua participação nesse estudo. Contudo, os resultados desse estudo podem, em longo prazo, oferecer vantagens para os indivíduos com Esclerose Sistêmica, possibilitando melhor diagnóstico e tratamento mais adequado. Os resultados do exame de ressonância magnética, ficarão à disposição dos médicos responsáveis pelo seu tratamento, e poderão ser úteis no futuro. Este estudo irá auxiliar na ampliação do entendimento sobre a esclerose sistêmica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um projeto de pesquisa, intitulado "Avaliação do acometimento neuro-psiquiátrico na esclerose sistêmica", aprovado pelo CEP em 27Setembro2011 (Parecer 975/2011), já em andamento, em que a proponente original solicita inclusão de outro pesquisador na equipe, o qual participará de processo seletivo do programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica, Área de concentração: Neurociências (AB), Linha de pesquisa: Análise Morfofuncional e Molecular em

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.514.166

Doenças Neurológicas-Faculdade de Ciências Médicas (FCM)-Unicamp, no início de 2018. Caso seja aprovado nesse processo seletivo, o aluno, graduado em Medicina, será orientado pela proponente, docente desse Programa. O título da Tese é "TÉCNICAS PARA ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA MULTI-VOXEL POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA (¹H-MRS): ESTUDO APLICADO EM ESPECTROS ADQUIRIDOS NO HIPOCAMPO E SUBSTÂNCIA BRANCA NORMAL DE PACIENTES COM ESCLEROSE SISTÊMICA" e o trabalho será feito ao longo de 4 anos. Nesta Tese o aluno irá analisar imagens, não analisadas anteriormente, conforme citado abaixo.

Metodologia Proposta:

Serão incluídos neste estudo de pesquisa, pacientes com ES e controles que adquiriram imagens de RM e MRSI em um estudo prévio, aprovado pelo CEP da UNICAMP (CAAE: 82014800011). Todos os pacientes e controles assinaram o TCLE aprovado. O pesquisador, durante seu doutorado irá analisar as imagens que não foram avaliadas anteriormente.

Investigação com Ressonância Magnética:

Todos os pacientes e controles foram submetidos ao exame de RM. As imagens de RM foram obtidas utilizando um aparelho de 3 Tesla, com aquisições em plano coronal, sagital e axial, além de aquisições em 3D (volumétricas), que permitiu a reconstrução das imagens em qualquer plano ou inclinação. Os parâmetros de imagens para as diferentes aquisições foram: 1) Imagens sagitais T1 ponderadas "spin echo" (espessura de 6 mm, ângulo de excitação – "tipangle" – de 180° ; TR=430, TE=12, matriz de 200x350, FOV=25x25cm). Estas imagens foram utilizadas para orientar o plano de aquisição das demais imagens; 2) Imagens no plano coronal (T2 ponderadas, FLAIR, duplo echo); T2 ponderadas (espessura de 6 mm, ângulo de excitação de 180° , TR=1800, TE=90, matriz de 165x256, FOV=20x24cm) ou "fast spin echo" T2 ponderadas (espessura de 4mm, ângulo de excitação de 120° , TR=6800, TE=129, matriz de 252x328, FOV=21x23cm); FLAIR (TR= 8500 e 2000 ou 100 e 2200, TE=72 ou 90, matrix= 256 X 296 ou 250 X 256, FOV= 200 X 220 ou 220 x 220 mm); 3) Imagens no plano axial FLAIR (TR= 8500 e 2000 ou 100 e 2200, TE=72 ou 90, matrix= 256 X 296 ou 250 X 256, FOV= 200 X 220 ou 220 x 220 mm); 4.) Aquisições em 3D obtidas no plano sagital "gradiente echo" T1 ponderadas com espessura de 1mm, ângulo de excitação de 35° TR=22, TE=9, matriz de 256x220, FOV=230x250 cm, pixel 1x1; 5) Espectroscopia obtida no plano sagital, em região supraventricular posterior, na região frontal e nos hipocampos ("Shriming-press", TE=135, TR=1500, ângulo de excitação 90o , nex=1, matriz de 20x1024, FOV=5x2cm; "Water supression calibration": TE=135, TR=1500, ângulo de excitação 90o , nex=1, matriz de 20x1024, FOV=5x2cm; "Aquisition Press": TE=135, TR=1500, ângulo de exitação 90o ,

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.514.166

nex=160, matriz de 20x1024, FOV=5x2cm; "Reference scan": TE=135, TR=1500, ângulo de excitação 90°, nex=8, matriz de 20x1024, FOV=5x2cm; 5. Difusão: obtida no plano sagital, axial e coronal com espessura de 6mm (TR/ TE = 8000 ms/100 ms, b = 0 and 900 mm² s⁻¹, matrix 128x128, 5 mm espessura,); 6) Imagem de magnetização: foram obtidas por gradiente echo (TR=640, TE=12, =20o) com e sem pulso de saturação. Ajustes e pequenas modificações nos parâmetros de imagens foram realizadas após aquisição dos primeiros pacientes e controles. O estudo volumétrico das estruturas de substância branca e cinzenta e das lesões em substância branca foi realizado por um método semiautomático, desenvolvido no Laboratório de Neuroimagem do Departamento de Neurologia da FCM - UNICAMP e também por programas de segmentação de imagens, comerciais e públicos disponíveis no laboratório de neuroimagem. O padrão de normalidade foi obtido pela análise quantitativa e qualitativa das estruturas de interesse dos voluntários sadios. O pré-processamento dos dados obtidos através da MRS será realizado por ferramentas computacionais a serem desenvolvidas durante o projeto de doutorado e deverá permitir a seleção automática de um subconjunto de espectros de interesse, adquiridos no hipocampo e na substância branca utilizando a técnica de MRSI. O método fará a localização espacial dos espectros na imagem de ressonância magnética; a utilização das máscaras binárias de segmentação do hipocampo obtidas em T1 e a seleção automática de um subconjunto de espectros de interesse. Além disso, os espectros selecionados serão combinados na forma de uma média simples ou ponderada, antes de sua quantificação. A quantificação de metabólitos a partir da MRSI será feita por programas desenvolvidos por terceiros: TARQUIN [40] e LCModel [41].

Critérios de inclusão:

Foram incluídos pacientes consecutivos com diagnóstico de ES segundo os critérios estabelecidos pelo American College of Rheumatology - ACR [42] e acompanhados rotineiramente nos ambulatórios UNICAMP e que concordem em participar do projeto de pesquisa.

Critério de Exclusão:

Foram excluídos os pacientes que: 1) Não teve diagnóstico definitivo de ES; 2) Apresentaram contra-indicações para realização dos exames como presença de marca passo ou cliques metálicos; 3) Pacientes com claustrofobia (não conseguiram realizar os exames de imagem).

Metodologia de Análise de Dados:

As diferentes frequências serão analisadas pelo teste de Qui quadrado. A correção de Yates e o teste exato de Fischer serão utilizados quando necessário. As variáveis não numéricas serão avaliadas por testes não paramétricos apropriados, a depender das características das variáveis

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.514.166

obtidas no final do estudo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados a Folha de Rosto, assinada pelo Coordenador de Assistência-Hospital de Clínicas-Unicamp, o documento com Informações Básicas do Projeto e o projeto detalhado. Foi apresentado também o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do projeto original (CAAE: 0882.0.146.000-11), aprovado em 27Setembro2011.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Informações Básicas do Projeto:

Pendência 1:

Consta que os riscos são: O possível desconforto relacionado ao exame de ressonância é o ruído intermitente durante os primeiros 15 minutos. Depois disso o ruído será muito menor. O pessoal técnico providenciará tapas-ouvido para me deixar mais confortável. Não existem efeitos nocivos associados com a ressonância magnética dentro das condições utilizadas atualmente".

Perguntas: os exames de ressonância já não foram realizados em outro estudo? Neste estudo serão realizados novos exames utilizando esta técnica? Se não, informar que não há riscos previsíveis em participar desta pesquisa.

Resposta:

Nesse projeto serão utilizados exames de ressonância magnética adquiridos em estudo prévio, aprovado pelo CEP da UNICAMP (CAAE: 0882.0.146.000-11), dessa forma, não haverá riscos previsíveis em participar dessa pesquisa. A correção foi realizada na Plataforma Brasil na seção Informações Básicas do Projeto.

Pendência 2:

O Sistema CEP/Conep entende que não há estudos sem custo nenhum. Sempre haverá necessidade de algum grau de investimento, ainda que mínimo. Não é razoável imaginar, por exemplo, que um pesquisador faça o seu estudo sem registrar as informações em algum formulário ou outro instrumento, o que exige investimento financeiro.

Resposta:

Foi adicionado no projeto as seguintes despesas: 10 exames de ressonâncias magnéticas, Xerox, encadernação e confecção de posters. A correção foi realizada também na Plataforma Brasil na seção 5 – Outras informações >> Orçamento Financeiro:

Adendo:

Pendência 3

Informamos que a inclusão do aluno Danilo Rodrigues Pereira, junto ao protocolo de pesquisa

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.514.166

anteriormente aprovado pelo CEP, deverá ser realizado através de emenda via papel junto ao CEP e não através da Plataforma Brasil, pois o mesmo foi aprovado anteriormente a criação da Plataforma Brasil.

Resposta:

Solicitação feita via papel e enviado ao CEP.

Parecer CEP anteriormente aprovado:

Pendência 4:

O número correto de aprovação do protocolo de pesquisa anteriormente aprovado pelo CEP é: CAAE:0882.0.146.000-11. No item desenho do documento "Informações Básicas do Projeto" e no projeto detalhado contemplam CAAE: 2014800011.solicitamos que as informações sejam uniformizadas.

Resposta:

Correção foi realizada no item desenho do documento "Informações Básicas do Projeto" e no projeto detalhado na versão 2 (projeto_detalhado.pdf)

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.514.166

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final, em formulário próprio do CEP, devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1021968.pdf	18/01/2018 15:09:46		Aceito
Outros	Carta_Resposta_Parecer_CEP.pdf	18/01/2018 15:08:31	Simone Appenzeller	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_detalhado.pdf	17/01/2018 01:12:25	Simone Appenzeller	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto_Danilo.pdf	06/12/2017 09:13:12	Simone Appenzeller	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	adendo_cep.pdf	27/10/2017 09:05:31	Simone Appenzeller	Aceito
Parecer Anterior	1_parecer_aprovacao_inicial_CEP.pdf	27/10/2017 08:59:09	Simone Appenzeller	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	27/10/2017 08:57:54	Simone Appenzeller	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.514.166

CAMPINAS, 26 de Fevereiro de 2018

Assinado por:
Maria Fernanda Ribeiro Bittar
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Anexo 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO AVALIAÇÃO DO ACOMETIMENTO NEUROPSIQUIÁTRICO NA ESCLEROSE SISTÊMICA

Número do CAAE: 0882.0.146.000-11

Você está sendo convidado a participar como voluntário de uma pesquisa. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar este Termo para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo se você não aceitar participar ou retirar sua autorização em qualquer momento.

Justificativa e objetivos:

Existem poucos estudos com esclerose sistêmica no Brasil. Desta forma, há carência de estudos com esta população. O presente estudo tem como objetivos determinar a prevalência de depressão, ansiedade, alterações cognitivas, recorrência familiar, atividade física e prejuízos olfativos da esclerose sistêmica. Associar as alterações detectadas nos testes com o exame de ressonância magnética. A identificação e quantificação desses parâmetros, podem eventualmente melhorar da qualidade de vida, e do diagnóstico como também levar a um melhor tratamento para os pacientes com esclerose sistêmica.

Procedimentos:

Participando do estudo você está sendo convidado a: preencher questionários que avaliam sintomas de ansiedade, depressão, aspectos cognitivos e qualidade de vida; entrevistas sobre a recorrência familiar de esclerose sistêmica e atividade física; teste que avalia a capacidade olfativa, e exame de ressonância magnética (RM).

Observações:

- O exame de ressonância magnética é semelhante a uma tomografia. Você será colocado em uma maca e será movido lentamente para dentro do aparelho de ressonância magnética. Um alto falante dentro da sala possibilitará a constante

comunicação com as pessoas responsáveis pelo exame. Durante todo o tempo o pessoal médico e paramédico poderão ouvi-lo, podendo interromper o exame se necessário; por exemplo, se durante o exame se sentir mal ou com claustrofobia. O procedimento pode durar entre 40 a 90 minutos. Durante a primeira parte do exame ouvirá ruídos, tipo marteladas, por alguns minutos enquanto o aparelho faz as imagens do seu cérebro. O restante do exame será relativamente silencioso. O exame de RM será repetido a cada dois anos para comparação ou mais frequentemente se os médicos julgarem necessário repetir a ressonância.

- A avaliação da função olfatória é uma técnica não invasiva que utiliza um dispositivo semelhante a uma caneta com diversos odores. Esta técnica é capaz de identificar prejuízos na capacidade olfatória e classificar o indivíduo com anosmia (perda total da capacidade olfativa) e hiposmia (diminuição da capacidade olfativa).
- Os questionários para investigar sintomas de ansiedade, depressão e alteração cognitiva serão de múltipla escolha.
- As entrevistas serão realizadas com perguntas claras e objetivas.
- Os testes serão aplicados no dia do exame de RM realizado no equipamento da Unicamp, e será repetido após dois anos. Os testes e o exame RM terão duração total de até 2h.
- Não vai haver nenhuma forma de reembolso de dinheiro, já que com a participação na pesquisa você não vai ter nenhum gasto.

Desconfortos e riscos:

Você não deve participar deste estudo se não quiser preencher os questionários; não informar sobre o histórico familiar; não quiser ser entrevistado sobre a frequência de atividade física, não realizar o teste da capacidade olfativa, apresentar marca-passo cardíaco, clipe de cirurgia para aneurisma cerebral ou qualquer outro objeto metálico no corpo, que tenha sido implantado durante uma cirurgia ou alojado em no corpo durante um acidente, pois estes podem parar de funcionar ou causar acidentes; ou não querer fazer o exame de ressonância magnética.

O possível desconforto relacionado ao exame de ressonância é o ruído intermitente durante os primeiros 15 minutos. Depois disso o ruído será muito menor. O pessoal técnico providenciará tapas-ouvido para me deixar mais confortável. Não existem efeitos nocivos associados com a ressonância magnética dentro das condições utilizadas atualmente. O possível desconforto do teste da capacidade olfativa é o odor não ser agradável para o indivíduo.

Benefícios:

Não será obtida nenhuma vantagem direta com a sua participação nesse estudo. Contudo, os resultados desse estudo podem, em longo prazo, oferecer vantagens para os indivíduos com Esclerose Sistêmica, possibilitando um melhor diagnóstico e um tratamento mais adequado. Os resultados do exame de ressonância magnética, ficarão à disposição dos médicos responsáveis pelo seu tratamento, e poderão ser úteis no futuro. Este estudo irá auxiliar na ampliação do entendimento sobre a esclerose sistêmica.

Acompanhamento e assistência:

O paciente incluído neste estudo faz acompanhamento no ambulatório de reumatologia da Unicamp e continuará mesmo após o encerramento do estudo. Caso sejam detectadas situações que indiquem a necessidade de uma intervenção (médica, pedagógica, nutricional, psicológica, fisioterápica, fonoaudiologia, etc), serão tomadas as devidas providências e o paciente será encaminhado para especialidade correspondente.

Sigilo e privacidade:

Você tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome não será citado. Deste modo, todas as informações médicas decorrentes desse projeto de pesquisa farão parte do seu prontuário médico e serão submetidos aos regulamentos do HC-UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado.

Ressarcimento e Indenização:

A participação deste estudo é voluntária sem benefícios financeiros. Entretanto você terá a garantia ao direito à indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Contato:

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com a Professora Dra. Simone Appenzeller, departamento de clínica médica e/ou ambulatório de reumatologia da Unicamp, laboratório de reumatologia telefone (019) 35217886 e telefone (019) 3521-7372 que estará disponível para responder todas as dúvidas, questões e preocupações. Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações contatar a secretaria da Comissão de Ética da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, tel. (019) 3521-8942. Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você poderá entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP das 08:30hs às 11:30hs e das 13:00hs as 17:00hs na Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936 ou (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br.

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

O papel do CEP é avaliar e acompanhar os aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), tem por objetivo desenvolver a regulamentação sobre proteção dos seres humanos envolvidos nas pesquisas. Desempenha um papel coordenador da rede de Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs) das instituições, além de assumir a função de órgão consultor na área de ética em pesquisas.

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar e declaro estar recebendo uma via original deste documento assinada pelo pesquisador e por mim, tendo todas as folhas por nós rubricadas:

Nome do (a) participante:

Contato telefônico:

e-mail (opcional):

 Data: ____/____/____.
 (Assinatura do participante ou nome e assinatura do seu RESPONSÁVEL LEGAL)

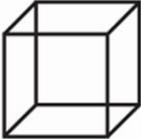
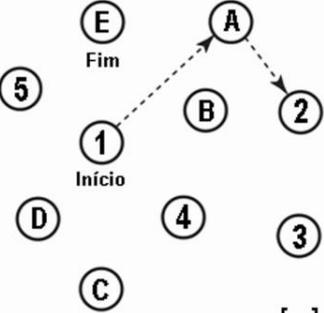
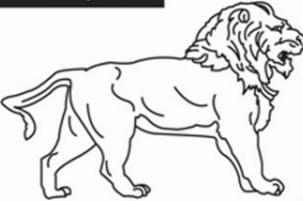
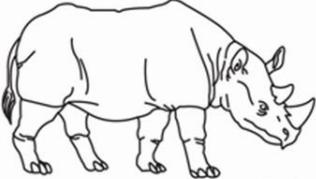
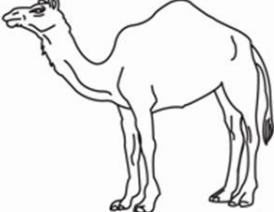
Responsabilidade do Pesquisador:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado e pela CONEP, quando pertinente. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

_____ Data: ____/____/____.
(Assinatura do pesquisador)

Anexo 3 - Avaliação Cognitiva de Montreal (MoCA)

MONTREAL COGNITIVE ASSESSMENT (MOCA) Nome: _____ Data de nascimento: ____/____/____
 Versão Experimental Brasileira Escolaridade: _____ Data de avaliação: ____/____/____
 Sexo: _____ Idade: _____

VISUOESPACIAL / EXECUTIVA		 Copiar o cubo [] []		Desenhar um RELÓGIO (onze horas e dez minutos) (3 pontos)	Pontos	
		[] [] [] [] [] []		[] [] [] Contorno Números Ponteiros	_/5	
NOMEAÇÃO						
 []		 []		 []		
MEMÓRIA						
Leia a lista de palavras, O sujeito de repeti-la, faça duas tentativas Evocar após 5 minutos		Rosto	Veludo	Igreja	Margarida	Vermelho
1ª tentativa		[]	[]	[]	[]	[]
2ª tentativa		[]	[]	[]	[]	[]
ATENÇÃO						
Leia a seqüência de números (1 número por segundo)		O sujeito deve repetir a seqüência em ordem direta [] 2 1 8 5 4 O sujeito deve repetir a seqüência em ordem indireta [] 7 4 2				_/2
Leia a série de letras. O sujeito deve bater com a mão (na mesa) cada vez que ouvir a letra "A". Não se atribuem pontos se ≥ 2 erros. [] F B A C M N A A J K L B A F A K D E A A A J A M O F A A B						_/1
Subtração de 7 começando pelo 100 [] 93 [] 86 [] 79 [] 72 [] 65		4 ou 5 subtrações corretas: 3 pontos; 2 ou 3 corretas 2 pontos; 1 correta 1 ponto; 0 correta 0 ponto				_/3
LINGUAGEM						
Repetir: Eu somente sei que é João quem será ajudado hoje. []		O gato sempre se esconde embaixo do Sofá quando o cachorro está na sala. []				_/2
Fluência verbal: dizer o maior número possível de palavras que comecem pela letra F (1 minuto). [] _____ (N ≥ 11 palavras)						_/1
ABSTRAÇÃO						
Semelhança p. ex. entre banana e laranja = fruta []		trem - bicicleta []		relógio - régua []		_/2
EVOCAÇÃO TARDIA		Deve recordar as palavras SEM PISTAS		Rosto	Veludo	Igreja
[]		[]	[]	[]	[]	[]
OPCIONAL		Pista de categoria []		Pista de múltipla escolha []		Pontuação apenas para evocação SEM PISTAS
ORIENTAÇÃO						
[] Dia do mês		[] Mês		[] Ano		[] Dia da semana
[] Lugar		[] Cidade		[]		_/6
© Z. Nasreddine MD www.mocatest.org Versão experimental Brasileira: Ana Luisa Rosas Sarmiento Paulo Henrique Ferreira Bertolucci - José Roberto Wajman						TOTAL Adicionar 1 pt se ≤ 12 anos de escolaridade
						_/30

Anexo 4 - Inventário de Depressão de Beck (BDI)

INVENTÁRIO DE DEPRESSÃO DE BECK - BDI

Nome: _____ Idade: _____ Data: ____/____/____

Este questionário consiste em 21 grupos de afirmações. Depois de ler cuidadosamente cada grupo, faça um círculo em torno do número (0, 1, 2 ou 3) próximo à afirmação, em cada grupo, que descreve melhor a maneira que você tem se sentido na semana, incluindo hoje. Se várias afirmações num grupo parecerem se aplicar igualmente bem, faça um círculo em cada uma. Tome cuidado de ler todas as afirmações, em cada grupo, antes de fazer sua escolha.

1	0 Não me sinto triste 1 Eu me sinto triste 2 Estou sempre triste e não consigo sair disto 3 Estou tão triste ou infeliz que não consigo suportar	7	0 Não me sinto decepcionado comigo mesmo 1 Estou decepcionado comigo mesmo 2 Estou enojado de mim 3 Eu me odeio
2	0 Não estou especialmente desanimado quanto ao futuro 1 Eu me sinto desanimado quanto ao futuro 2 Acho que nada tenho a esperar 3 Acho o futuro sem esperanças e tenho a impressão de que as coisas não podem melhorar	8	0 Não me sinto de qualquer modo pior que os outros 1 Sou crítico em relação a mim por minhas fraquezas ou erros 2 Eu me culpo sempre por minhas falhas 3 Eu me culpo por tudo de mal que acontece
3	0 Não me sinto um fracasso 1 Acho que fracassei mais do que uma pessoa comum 2 Quando olho pra trás, na minha vida, tudo o que posso ver é um monte de fracassos 3 Acho que, como pessoa, sou um completo fracasso	9	0 Não tenho quaisquer idéias de me matar 1 Tenho idéias de me matar, mas não as executaria 2 Gostaria de me matar 3 Eu me mataria se tivesse oportunidade
4	0 Tenho tanto prazer em tudo como antes 1 Não sinto mais prazer nas coisas como antes 2 Não encontro um prazer real em mais nada 3 Estou insatisfeito ou aborrecido com tudo	10	0 Não choro mais que o habitual 1 Choro mais agora do que costumava 2 Agora, choro o tempo todo 3 Costumava ser capaz de chorar, mas agora não consigo, mesmo que o queria
5	0 Não me sinto especialmente culpado 1 Eu me sinto culpado grande parte do tempo 2 Eu me sinto culpado na maior parte do tempo 3 Eu me sinto sempre culpado	11	0 Não sou mais irritado agora do que já fui 1 Fico aborrecido ou irritado mais facilmente do que costumava 2 Agora, eu me sinto irritado o tempo todo 3 Não me irrita mais com coisas que costumavam me irritar
6	0 Não acho que esteja sendo punido 1 Acho que posso ser punido 2 Creio que vou ser punido 3 Acho que estou sendo punido	12	0 Não perdi o interesse pelas outras pessoas 1 Estou menos interessado pelas outras pessoas do que costumava estar 2 Perdi a maior parte do meu interesse pelas outras pessoas 3 Perdi todo o interesse pelas outras pessoas

INVENTÁRIO DE DEPRESSÃO DE BECK - BDI

13	0 Tomo decisões tão bem quanto antes 1 Adio as tomadas de decisões mais do que costumava 2 Tenho mais dificuldades de tomar decisões do que antes 3 Absolutamente não consigo mais tomar decisões	18	0 O meu apetite não está pior do que o habitual 1 Meu apetite não é tão bom como costumava ser 2 Meu apetite é muito pior agora 3 Absolutamente não tenho mais apetite
14	0 Não acho que de qualquer modo pareço pior do que antes 1 Estou preocupado em estar parecendo velho ou sem atrativo 2 Acho que há mudanças permanentes na minha aparência, que me fazem parecer sem atrativo 3 Acredito que pareço feio	19	0 Não tenho perdido muito peso se é que perdi algum recentemente 1 Perdi mais do que 2 quilos e meio 2 Perdi mais do que 5 quilos 3 Perdi mais do que 7 quilos Estou tentando perder peso de propósito, comendo menos: Sim _____ Não _____
15	0 Posso trabalhar tão bem quanto antes 1 É preciso algum esforço extra para fazer alguma coisa 2 Tenho que me esforçar muito para fazer alguma coisa 3 Não consigo mais fazer qualquer trabalho	20	0 Não estou mais preocupado com a minha saúde do que o habitual 1 Estou preocupado com problemas físicos, tais como dores, indisposição do estômago ou constipação 2 Estou muito preocupado com problemas físicos e é difícil pensar em outra coisa 3 Estou tão preocupado com meus problemas físicos que não consigo pensar em qualquer outra coisa
16	0 Consigo dormir tão bem como o habitual 1 Não durmo tão bem como costumava 2 Acordo 1 a 2 horas mais cedo do que habitualmente e acho difícil voltar a dormir 3 Acordo várias horas mais cedo do que costumava e não consigo voltar a dormir	21	0 Não notei qualquer mudança recente no meu interesse por sexo 1 Estou menos interessado por sexo do que costumava 2 Estou muito menos interessado por sexo agora 3 Perdi completamente o interesse por sexo
17	0 Não fico mais cansado do que o habitual 1 Fico cansado mais facilmente do que costumava 2 Fico cansado em fazer qualquer coisa 3 Estou cansado demais para fazer qualquer coisa		

Anexo 5 – Inventário de Ansiedade de Beck (BAI)

INVENTÁRIO DE ANSIEDADE DE BECK - BAI

Nome: _____ Idade: _____ Data: ____ / ____ / ____

Abaixo está uma lista de sintomas comuns de ansiedade. Por favor, leia cuidadosamente cada item da lista. Identifique o quanto você tem sido incomodado por cada sintoma durante a semana, incluindo hoje, colocando um "X" no espaço correspondente, na mesma linha de cada sintoma.

	Absolutamente não (0 pontos)	Levemente Não me incomodou muito (1 ponto)	Moderadamente Foi muito desagradável mas pode suportar (2 pontos)	Gravemente Difícilmente pode suportar (3 pontos)
1. Dormência ou formigamento				
2. Sensação de calor				
3. Tremores nas pernas				
4. Incapaz de relaxar				
5. Medo que aconteça o pior				
6. Atordoado ou tonto				
7. Palpitação ou aceleração do coração				
8. Sem equilíbrio				
9. Aterrorizado				
10. Nervoso				
11. Sensação de sufocação				
12. Tremores nas mãos				
13. Trêmulo				
14. Medo de perder o controle				
15. Dificuldade de respirar				
16. Medo de morrer				
17. Assustado				
18. Indigestão ou desconforto no abdômen				
19. Sensação de desmaio				
20. Rosto afogueado				
21. Suor (não devido ao calor)				