

QUANTIFICAÇÃO DE ESPECTROS DE RM CEREBRAIS EDITADOS DE GABA: COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS LCMODEL E GANNET

P. Oliveira*, R. C. G. Landim*, R. A. E. Edden**, B. Foerster***, T. B. S. Costa*, E. L. Silva*,
L. M. Li****, R. J. M. Covolan*, G. Castellano*

*Grupo de Neurofísica, IFGW, UNICAMP, Brasil

**Johns Hopkins Univ. School of Medicine, USA

***Philips Medical Systems, Brasil

****Depto. de Neurologia, FCM, UNICAMP, Brasil

e-mail: oliveira.pa.ty@hotmail.com

Resumo: O ácido gama-aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, e tem sido bastante estudado recentemente em experimentos de espectroscopia por ressonância magnética (MRS). Já se sabe que a concentração de GABA no córtex visual é inversamente correlacionada com a magnitude do sinal BOLD durante um estímulo visual. Por outro lado, muitos trabalhos têm demonstrado uma dependência entre o sinal BOLD e a frequência de oscilação do estímulo visual, com um pico da amplitude do BOLD em 8 Hz. Neste trabalho realizou-se um experimento de MRS funcional (fMRS), o qual avalia a variação da concentração de GABA no córtex visual de voluntários sujeitos a estímulos visuais de 4 Hz, 8 Hz e 16 Hz. Dois métodos de análise destes espectros foram comparados: LCModel e Gannet. Encontrou-se que apenas 4 dos 10 voluntários apresentaram o mesmo padrão de variação de GABA nos dois métodos. Os voluntários restantes apresentaram padrões exatamente opostos nos dois métodos. Isso provavelmente se deveu à baixa sensibilidade da técnica de fMRS, e, por se tratar de um uma comparação inicial entre os dois métodos, mais estudos serão realizados para uma melhor compreensão do problema e validação dos métodos.

Palavras-chave: GABA, MEGA-PRESS, fMRS, LCModel, Gannet.

Abstract: *Gamma-aminobutyric acid (GABA) is the chief inhibitory neurotransmitter of the central nervous system, and it has been extensively studied in recent magnetic resonance spectroscopy (MRS) experiments. It has been shown that resting GABA concentration in the visual cortex is inversely correlated with the BOLD magnitude response to a visual stimulus. On the other hand, several works have demonstrated a dependency between the BOLD signal and the flickering frequency of visual stimuli, with the BOLD response peaking at 8 Hz. In the present work, a functional MRS (fMRS) experiment was performed to evaluate GABA concentrations in the visual cortex of individuals subjected to visual stimuli flickering at 4 Hz, 8 Hz and 16 Hz. Two methods of analysis of these spectra were compared: LCModel and Gannet. It was found that only*

4 of the 10 subjects showed the same pattern of GABA variation in the two methods. The remaining volunteers had exactly opposite patterns in the two methods. This was probably due to the low sensitivity of the fMRS technique, and, since it is the first comparison between the two methods, more studies will be conducted to better understand the problem and validate the methods.

Keywords: GABA, MEGA-PRESS, fMRS, LCModel, Gannet.

Introdução

O GABA ou ácido gama-aminobutírico é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, e, portanto, de grande interesse da comunidade científica. Sua concentração no cérebro humano é de aproximadamente 1 mM, ou seja, 40000 vezes menos concentrado que a água. Vários trabalhos usando MRS têm sido realizados com o objetivo de melhor entender o papel deste metabólito no sistema nervoso central. Por exemplo, num trabalho realizado em 2007 por Northoff e colegas, explorou-se a relação entre a concentração de GABA e a rede de modo padrão (ou *default mode network*, DMN), e verificou-se que esta concentração possuía correlação com a quantidade de respostas BOLD negativas no córtex cingulado anterior (região que faz parte dessa rede). Estes autores concluíram que as respostas BOLD negativas da DMN durante emoções são mediadas por GABA [1,2]. Já no trabalho de Muthukumaraswamy e colegas, de 2009, verificou-se que a concentração (de repouso) de GABA no córtex visual de um dado indivíduo possui uma correlação positiva com a resposta da frequência gama do eletroencefalograma (EEG) e uma correlação negativa com a magnitude da resposta BOLD, quando o indivíduo é submetido a um estímulo visual [3]. Mais ainda, verificou-se que o desempenho do indivíduo na discriminação da orientação do estímulo visual poderia ser predito pela concentração (de repouso) de GABA, já que a seletividade de orientação neuronal requer cooperação da rede córtico-cortical e depende da presença de inibição gabaérgica [4]. Outro trabalho, de 2010, mostrou que a concentração de GABA na área

motora suplementar (SMA) está relacionada com a capacidade de resposta dos mecanismos motores subconscientes [5]. Ainda em 2010, Sumner e colegas mostraram uma relação direta da concentração de GABA no lobo frontal (numa região relacionada ao movimento dos olhos) com a velocidade da resposta motora (direcionamento do olhar para um dado estímulo) [6]. No trabalho de Evans e colegas, verificou-se a estabilidade da concentração de GABA ao longo do dia [7]. Todos estes trabalhos usaram experimentos de MRS “estáticos” para medir GABA. Foi encontrado um único trabalho envolvendo um experimento dinâmico (de fMRS) na literatura, realizado por Floyer-Lea e colegas em 2006, no qual foram adquiridos espectros de MRS da área motora correspondente ao movimento da mão direita, durante uma tarefa de aprendizagem de movimento [8]. Nesse trabalho, os autores verificaram um decréscimo de aproximadamente 20% na concentração de GABA, relacionado à aprendizagem do movimento, sendo que indivíduos que mexeram a mão de forma randômica não apresentaram essa redução [8]. Embora estes trabalhos deem um exemplo das pesquisas mais recentes relacionadas ao GABA, ainda há várias linhas de investigação sobre este metabólito que podem ser exploradas. Por exemplo, não foi encontrado nenhum trabalho na literatura relacionado ao estudo da variação de GABA relativa a um estímulo sensorial.

Como mencionado, a concentração de GABA no córtex visual é inversamente correlacionada com a magnitude do sinal BOLD durante um estímulo visual [3]. Por outro lado, muitos trabalhos têm demonstrado uma dependência entre o sinal BOLD e a frequência de oscilação do estímulo visual, com um pico da amplitude do BOLD em 8 Hz [9].

O objetivo principal deste trabalho foi comparar duas ferramentas de análise da variação de GABA durante estimulação visual (piscando a 4, 8 e 16 Hz), realizada em indivíduos normais, através da análise de espectros de fMRS que foram obtidos com a sequência MEGA-PRESS. Em MRS em que se usa o núcleo do hidrogênio ^1H (^1H -MRS), há grande sobreposição de dados no eixo de desvio químico, e o espectro de GABA se sobrepõe a espectros de vários outros compostos, como na Figura 1. A fim de resolver essa questão, e retirar contribuições de diferentes metabólitos, usa-se o método de edição espectral por meio da sequência MEGA-PRESS [10]. Esta sequência permite separar a contribuição ao espectro de um dado metabólito através da aquisição de dois espectros consecutivos com diferentes parâmetros, de modo que, ao serem combinados, resultam em um espectro contendo o pico “editado” do metabólito de interesse (neste caso, o GABA).

As duas ferramentas de análise da variação de GABA comparadas neste trabalho foram: o software LCModel [11], que é um dos métodos mais utilizados pela comunidade científica da área para a análise de espectros de ^1H -MRS in vivo, e o software Gannet [12], composto por uma série de scripts em Matlab desenvolvidos especificamente para a quantificação de

GABA. A hipótese era que esperava-se encontrar um decréscimo de GABA para o estímulo de 8 Hz quando comparado com os outros dois estímulos.

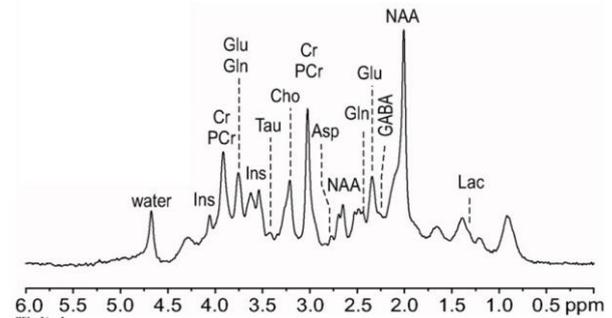


Figura 1: Espectro cerebral de Hidrogênio. Adaptada de [13].

Materiais e métodos

Paradigma de coleta dos dados – O paradigma usado consistiu na aplicação de um estímulo visual (padrão xadrez radial da Figura 2) piscando a 4 Hz, 8 Hz e 16 Hz, distribuído em 7 blocos (cada um com 4min e 15 espectros): repouso – 4 Hz – repouso – 8 Hz – repouso – 16 Hz – repouso.

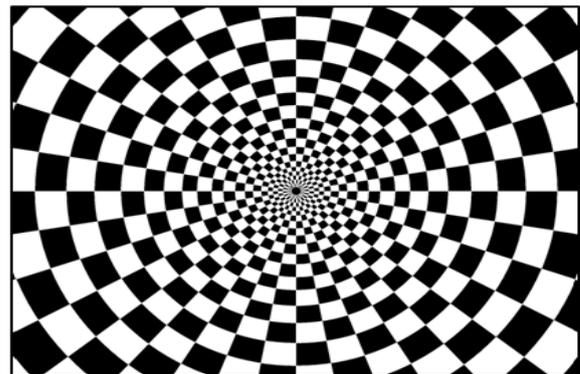


Figura 2: Estímulo visual usado.

Dezesseis indivíduos sadios (com idade média de 26 ± 8 anos, 13 homens) participaram; todos assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (o trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da UNICAMP, número CAAE 24019613.7.0000.5404). Os dados foram coletados com um scanner de 3 T da Philips usando a sequência de pulsos MEGA-PRESS de edição espectral, com um pulso de seleção no pico de GABA em 1,9 ppm, o qual resulta em um espectro “editado” (sem sobreposição) no pico de GABA em 3ppm.

Protocolo para fMRS – O protocolo de aquisição utilizado nos experimentos de fMRS consistiu de:

- Aquisição de imagens anatômicas ponderadas em T2 nos planos axial, coronal e sagital, para servir de referência para o posicionamento do voxel de MRS;
- Aquisição rápida de fMRI utilizando o mesmo estímulo visual que para fMRS, para localização da

área ativada – estas imagens são sobrepostas às imagens anatômicas, e o voxel é posicionado levando em conta a informação anatômica e funcional;

- Aquisição de fMRS.

Para a aquisição de fMRS foi usada a sequência MEGA-PRESS, com tempo de repetição (TR) de 2 s, tempo ao eco (TE) de 68 ms, largura de banda de 2 kHz, 2048 pontos, média de 8 espectros, e voxel de tamanho $3 \times 3 \times 3$ cm³ posicionado no centro do córtex occipital, sobre a fissura calcarina.

Pré-processamento – O pré-processamento dos dados foi feito com scripts do Matlab, responsáveis por fazer a correção de frequência (alinhamento) dos espectros, além de calcular as médias para cada um dos blocos correspondentes. De acordo com as características de cada um dos softwares a serem comparados, o pré-processamento foi utilizado apenas com o LCModel.

LCModel – O LCModel (*Linear Combination of Model spectra*) é um software cujo objetivo é ajustar uma função modelo aos dados, que consiste, não de uma soma de ressonâncias isoladas, mas de uma combinação linear de espectros completos dos metabólitos de interesse [11]. Isso é feito de forma totalmente independente do usuário. A ideia por trás desse método é que cada metabólito é geralmente responsável por múltiplas ressonâncias no espectro, e funções que modelam cada metabólito como um todo estariam mais próximas do sinal medido do que a modelagem de ressonâncias avulsas. Para isso, o software usa uma base de espectros de metabólitos, simuladas ou adquiridas *in vitro*, e obtidas sob as mesmas condições do espectro a ser analisado (mesma sequência de pulsos e mesma intensidade do campo magnético). Além disso, é um método totalmente automático (somente requer o FID *in vivo* e o sinal da água sem suprimir), evitando erros provenientes da subjetividade introduzida pelo usuário, maximizando a reprodutibilidade e comparação de resultados. Também permite estimar as concentrações de metabólitos presentes em baixas quantidades com alta precisão, o que o torna destaque na comunidade científica.

Gannet – O Gannet (*GABA-MRS Analysis Tool*) é feito de forma específica para a quantificação de espectros de MRS editados de GABA [12]. Diferentemente do LCModel, este método de quantificação é feito por meio de scripts de Matlab, de forma a permitir a interação do usuário. Gannet consiste em dois módulos principais: GannetLoad, o qual usa os dados diretamente do scanner (domínio de tempo) e processa estes para o domínio de frequência. Já o GannetFit usa técnicas de ajuste não lineares para integrar a área do pico de GABA, em 3ppm, e assim estimar a concentração deste.

Resultados

Com os dados obtidos através da quantificação dos dois métodos, pode-se observar as semelhanças e diferenças entre as variações de GABA.

Para se realizar as análises dividiu-se, para cada voluntário, os 7 blocos em três trios: trio 1 (repouso-4 Hz-repouso), trio 2 (repouso-8 Hz-repouso) e trio 3 (repouso-16 Hz-repouso), de modo a conseguir observar as variações de GABA, antes do estímulo, durante e depois, mas sem comparar com as variações dos outros blocos de estímulo. Como a hipótese inicial se refere ao bloco cujo estímulo era de 8 Hz, o foco foi no trio 2.

Dos 16 voluntários iniciais, 3 não foram possíveis de quantificar com o LCModel, devido à baixa qualidade espectral, enquanto com o Gannet 4 foram descartados devido a problemas de compilação. Um indivíduo não teve seus dados quantificados em nenhum dos métodos. Portanto, dos 16 voluntários iniciais, 10 foram quantificados com ambos os métodos.

Calculou-se a variação percentual de GABA em relação ao primeiro bloco do trio. Para cada indivíduo foram comparados os dados de forma a se observar um padrão. Os dados usados para tal comparação estão organizados na Tabela 1.

Tabela 1: Variação percentual de GABA para o trio 2, com os dados quantificados com o LCModel e com o Gannet. As variações foram calculadas com relação ao bloco de repouso anterior ao estímulo. Rep.: repouso; Vol.: voluntário.

Vol.	LCModel		Gannet	
	8 Hz	Rep.	8 Hz	Rep.
1	3,514	23,640	-8,700	-13,040
3	27,140	21,110	-28,570	-10,710
6	-31,690	-26,150	-27,270	59,090
8	35,800	34,160	-7,690	-19,230
11	15,190	-39,240	9,090	40,910
12	6,940	-9,390	-4,710	-37,500
13	7,140	20,480	-23,530	-29,410
14	25,860	27,010	-28,000	32,000
15	1,200	12,050	21,050	0,000
16	-8,620	-35,690	-48,720	-33,330

Encontrou-se que apenas 4 dos 10 voluntários apresentaram o mesmo padrão de variação de GABA nos dois métodos – desses, dois apresentaram aumento (11 e 15) e dois diminuição (6 e 16) de GABA com o estímulo. Os voluntários restantes apresentaram padrões exatamente opostos nos dois métodos. No total, 8 voluntários apresentaram aumento e 2 diminuição de GABA com o estímulo com LCModel (e vice-versa com o Gannet).

Apesar da quantidade de indivíduos com resultados opostos nos dois métodos, ainda é possível encontrar semelhanças, como no caso da média de variação para cada método. Com o LCModel, a média de aumento foi

de $(11,2 \pm 12,8)\%$ e a de decréscimo de $(-20,2 \pm 16,3)\%$. Já para o Gannet a média de aumento $(15,1 \pm 8,5)\%$ e para decréscimo de $(-25,4 \pm 13,8)\%$. Ou seja, os valores médios apresentaram uma diferença de aproximadamente 20% entre si, apesar dos desvios serem mais de 50% do valor médio (apenas 10 dados foram considerados).

Discussão

Apesar da hipótese inicial feita neste trabalho (de que a variação de GABA no córtex visual deveria ser inversamente correlacionada com o estímulo visual, e que essa anti-correlação deveria ter um pico em 8 Hz) ser baseada em diversos estudos, a variação de GABA envolve mecanismos mais complexos. Estes resultam em comportamento variável no mesmo indivíduo e ainda mais inter-indivíduos, e nem sempre seguem a ideia proposta pela hipótese. Tal variabilidade, associada aos problemas intrínsecos da técnica de MRS, a qual tem baixa sensibilidade, pode ter causado a discrepância entre os resultados e a suposição inicial, assim como a discrepância entre os resultados encontrados com os dois métodos. O fato do software LCModel ser uma “caixa preta” também dificulta entender o porquê da discrepância encontrada entre os resultados dos dois métodos.

Estes resultados são apenas preliminares nas análises da variação de GABA. No futuro pretende-se aprofundar o estudo sobre os métodos para entender melhor a razão das discrepâncias entre os mesmos. Também serão feitas correções na quantificação com o Gannet, de modo a conseguir quantificar os dados dos voluntários eliminados e assim aumentar o número de indivíduos na análise, consequentemente aumentando os parâmetros de comparação. Outra possibilidade é investigar a aplicação de outros métodos de quantificação, por exemplo não baseados em análise de Fourier como a FDM [14], e que talvez possam ter sucesso onde os métodos mais convencionais não têm. Para aparelhos de campo médio como o usado neste trabalho (3 T), ainda outra possibilidade seria o aumento da amostra (de indivíduos) e a repetição das medidas de cada voluntário, embora realizar mais medidas nem sempre seja viável, devido ao alto custo dos exames de ressonância e ao uso mais direcionado destes aparelhos para casos clínicos. Alguns trabalhos na área de fMRS têm buscado melhorar a sensibilidade da técnica utilizando campos magnéticos mais altos (geralmente de 7 T [15]), embora, até onde se sabe, nenhum ainda tenha investigado variações de GABA. No entanto, aparelhos de ressonância de altos campos (>3 T) ainda são raros no mundo e pouco viáveis do ponto de vista custo/benefício para ambientes clínicos.

Agradecimentos

Agradecemos à FAPESP e ao PIBIC-CNPq pelo apoio financeiro.

Referências

- [1] Northoff G, Walter M, Schulte RF, Beck J, Dydak U, Henning A, Boeker H, Grimm S, Boesiger P. GABA concentrations in the human anterior cingulate cortex predict negative BOLD response in fMRI. *Nature Neuroscience* 2007; 10(12): 1515-1517.
- [2] Raichle ME, Snyder AZ. A default mode of brain function: A brief history of an evolving idea. *NeuroImage* 2007; 37 (4): 1083-1090.
- [3] Muthukumaraswamy SD, Edden RAE, Jones DK, Swettenham JB, Singh KD. Resting GABA concentration predicts peak gamma frequency and fMRI amplitude in response to visual stimulation in humans. *PNAS* 2009; 106: 8356-8361.
- [4] Edden RAE, Muthukumaraswamy SD, Freeman TCA, Singh KD. Orientation discrimination performance is predicted by GABA concentration and gamma oscillation frequency in human primary visual cortex. *The Journal of Neuroscience* 2009; 29(50): 15721-15726.
- [5] Boy F, Evans CJ, Edden RAE, Singh KD, Husain M, Sumner P. Individual differences in subconscious motor control predicted by GABA concentration in SMA. *Current Biology* 2010; 20: 1779-1785.
- [6] Sumner P, Edden RAE, Bompas A, Evans CJ, Singh KD. More GABA, less distraction: a neurochemical predictor of motor decision speed. *Nature Neuroscience* 2010; 13: 825-827.
- [7] Evans CJ, McGonigle DJ, Edden RAE. Diurnal stability of g-aminobutyric acid concentration in visual and sensorimotor cortex. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 2010; 31: 204-209.
- [8] Floyer-Lea A, Wylezinska M, Kincses T, Matthews PM. Rapid modulation of GABA concentration in human sensorimotor cortex during motor learning. *Journal of Neurophysiology* 2006; 95: 1639-1644.
- [9] Emir UE, Bayraktaroglu Z, Ozturk C, Ademoglu A, Demiralp T. Changes in BOLD transients with visual stimuli across 1-44Hz. *Neuroscience Letters* 2008; 436:185-188.
- [10] Mescher M, Merkle H, Kirsch J, Garwood M, Gruetter R. Simultaneous in vivo spectral editing and water suppression. *NMR in Biomedicine* 1998; 11: 266-272.
- [11] Provencher SW. Automatic quantitation of localized in vivo ^1H spectra with LCModel. *NMR in Biomedicine* 2001; 14: 260-264.
- [12] Edden RAE, Puts NAJ, 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* 2013. Publicado online. doi: 10.1002/jmri.24478.
- [13] Graaf RA. *In Vivo NMR Spectroscopy: Principles and Techniques*, 2ed. John Wiley & Sons, Chichester. 2007.

- [14] Mandelshtam VA. FDM: the filter diagonalization method for data processing in NMR experiments. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 2001; 38: 159-196.
- [15] Lin Y, Stephenson MC, Xin L, Napolitano A, Morris PG (2012). Investigating the metabolic changes due to visual stimulation using functional proton magnetic resonance spectroscopy at 7 T. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 32: 1484-1495.