



Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Relatório de Projecto

Aquisição Simultânea de EEG-fMRI em Epilepsia



Mário João Bártolo
Engenharia Biomédica
Setembro 2007





Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Relatório de Projecto

Autor:
Mário João Bártolo

Orientador:
Prof. Dr. Miguel Castelo-Branco

Supervisor:
Dr. José Marques

Setembro 2007

Índice

1.	Introdução.....	10
2.	MRI – Imagem por Ressonância Magnética	11
2.1.	Técnicas de Imagem – Echo-Planar Imaging (EPI)	15
2.2.	Hardware de um sistema de imagem por Ressonância Magnética.....	18
3.	fMRI – Imagem Funcional por Ressonância Magnética.....	20
4.	EEG – Electroencefalografia	24
5.	Epilepsia	27
6.	EEG-fMRI	29
7.	Metodologia.....	32
7.1.	Protocolo de Aquisição EEG-fMRI.....	32
7.2.	Tratamento dos Dados	34
7.2.1.	EEG	34
7.2.1.1.	Remoção dos artefactos associados aos gradientes	37
7.2.1.2.	Remoção dos artefactos associados aos batimentos cardíacos.....	38
7.2.1.3.	Marcação das pontas epiléticas/construção dos regressores.....	39
7.2.2.	fMRI	41
7.2.2.1.	BET – Brain Extraction Tool	42
7.2.2.2.	FEAT – fMRI Expert Analysis Tool	44
8.	Resultados.....	56
8.1.	Análise Estatística de Primeiro Nível (First-Level Analysis)	57
8.2.	Análise Estatística de Alto Nível (Higher-Level Analysis).....	64
9.	Discussão & Conclusão	68
10.	Melhoramento do Sinal de fMRI Através da Remoção do Ruído Fisiológico – Batimentos Cardíacos	69
10.1.	Modelação do sinal cardíaco	69
10.2.	Métodos	70
10.2.1.	Análise do EEG	70
10.2.2.	Filtro Passa-Baixo	72
10.2.3.	Máscaras	73
10.2.4.	Regressores.....	74

Aquisição Simultânea de EEG – fMRI em Epilepsia

10.2.5.	Análise Estatística – FEAT	75
10.3.	Resultados.....	78
10.4.	Discussão & Conclusão.....	83
11.	Referências Bibliográficas.....	85

Índice de Figuras

Figura 2.1 - Esquematização da direcção do campo B_0 aplicado e orientação dos spins das partículas (Pascal Belin – University of Montreal).....	12
Figura 2.2 – Comparação entre o tempo de alguns processos fisiológicos e as velocidades das técnicas de imagem mais comuns. [2].....	15
Figura 2.3 – Sequência de aquisição eco-planar. [2].....	16
Figura 2.4 – Esquematização da direcção do campo B_0 aplicado e orientação dos spins das partículas. [3].....	17
Figura 3.1 - Esquema representativo do consumo de oxigénio por uma célula nervosa. [5]	22
Figura 3.2 - Activações em dados de fMRI. [5]	22
Figura 4.1 – EEG obtido por Hans Berger em 1924. [6].....	24
Figura 4.2 - Tipos de ondas presentes no EEG. [7].....	25
Figura 7.1- Posição dos 31 eléctrodos no escalpe	32
Figura 7.2 – Sinal proveniente do EEG durante a aquisição de fMRI.	34
Figura 7.3 – Interface gráfica do EEGlab.....	36
Figura 7.4 – Estrutura dos dados EEG em ambiente Matlab.....	37
Figura 7.5 – Sinal EEG ‘limpo’.....	39
Figura 7.6 – Estrutura do regressor.	40
Figura 7.7 – GUI do FSL.....	42
Figura 7.8 - GUI do BET.....	42
Figura 7.9 – Visualização (FSLview) do cérebro antes da aplicação do algoritmo presente no BET.	43
Figura 7.10 – Visualização (FSLview) do cérebro após a aplicação do algoritmo presente no BET.	43
Figura 7.11 - GUI do FEAT.	44
Figura 7.12 – GUI do FEAT – “Data”.	45
Figura 7.13 – GUI do FEAT – “Pre-stats”.....	46
Figura 7.14 – GUI do FEAT – “Registration”	47
Figura 7.15 – Tamanho e Parâmetros da matriz elaborada por MC; Estrutura do regressor.	48
Figura 7.16 – GUI do FEAT – “Data”.	49
Figura 7.17 – GUI do FEAT – “Stats”.	50
Figura 7.18 – General Linear Model – “Events”.....	51

Figura 7.19 – General Linear Model – “ <i>Contrasts & F-tests</i> ”.....	52
Figura 7.20 – Modelo dos regressores e dos contrastes utilizados.....	53
Figura 7.21 – GUI do FEAT – “Post-stats”.....	53
Figura 7.22 – GUI do FEAT.....	55
Figura 7.23 – GUI do FEAT – “Data”.....	55
Figura 8.1 – Mapa das ativações (C1 – contraste ativações positivas; C2 – contraste ativações negativas).....	57
Figura 8.2 - Mapa das ativações (C1 – contraste ativações positivas; C2 – contraste ativações negativas).....	58
Figura 8.3 - Mapa das ativações (C1 – contraste ativações positivas; C2 – contraste ativações negativas).....	59
Figura 8.4 - Mapa das ativações (C1 – contraste ativações positivas; C2 – contraste ativações negativas).....	60
Figura 8.5 - Mapa das ativações (C1 – contraste ativações positivas; C2 – contraste ativações negativas).....	61
Figura 8.6 - Mapa das ativações (C1 – contraste ativações positivas; C2 – contraste ativações negativas).....	62
Figura 8.7 – Mapa das ativações positivas de todos os <i>datasets</i>	64
Figura 8.8 - Mapa das ativações negativas de todos os <i>datasets</i>	65
Figura 8.9 - Mapa das ativações positivas de todos os <i>datasets</i>	66
Figura 8.10 - Mapa das ativações negativas de todos os <i>datasets</i>	66
Figura 8.11 - Mapa das ativações positivas de todos os <i>datasets</i>	67
Figura 8.12 - Mapa das ativações negativas de todos os <i>datasets</i>	67
Figura 10.1 – Representação de parte dos vectores ‘fasesordenadas’ e ‘volumes ordenados’.....	71
Figura 10.2 – <i>Timseries</i> de um determinado ponto nos dados ordenados antes (fMRI1MCHPOrd) e após (fMRI1MCHPOrdLP7) aplicação do filtro passa-baixo.	72
Figura 10.3 – Esquematização do local da aplicação das máscaras.....	74
Figura 10.4 – Esquematização do local da 4ª máscara (zona posterior do cérebro).....	74
Figura 10.5 - GUI do FEAT – “Data”.....	76
Figura 10.6 – General Linear Model – “Events”.....	77
Figura 10.7 - Modelo dos regressores e dos contrastes utilizados.	78
Figura 10.8 – Ativações associadas ao batimento cardíaco (corte transversal).....	79
Figura 10.9 – Ativações associadas ao batimento cardíaco (corte sagital).....	79
Figura 10.10 - Ativações associadas ao batimento cardíaco (corte transversal).	80

Aquisição Simultânea de EEG – fMRI em Epilepsia

Figura 10.11 – Activações associadas ao batimento cardíaco (corte sagital).....	80
Figura 10.12 - Activações associadas ao batimento cardíaco (corte transversal).	81
Figura 10.13 - Activações associadas ao batimento cardíaco (corte sagital).	81
Figura 10.14 - Activações associadas ao batimento cardíaco (corte transversal).	82
Figura 10.15 - Activações associadas ao batimento cardíaco (corte sagital).	82

Índice de Gráficos

Gráfico 2.1 – Percentagem da magnetização longitudinal (%) versus tempo (ms). [1].	13
Gráfico 2.2 - Percentagem da magnetização transversal (%) versus tempo (ms). [1]....	14
Gráfico 2.3 - Rapidez da aquisição de MRI em função do tempo e da tecnologia (gráfico concebido por Van J. Wedeen da Universidade de Harvard). [2]	15
Gráfico 3.1 - Função da resposta hemodinâmica (modelo de Glover). [4]	21
Gráfico 3.2 – <i>Time-course</i> da actividade num voxel. [5]	23
Gráfico 6.1 – Tempo relativo da resposta no EEG e fMRI após a apresentação de um estímulo. [9].....	30
Gráfico 8.1 – Representação gráfica das time-courses dos dados vs modelo.	58
Gráfico 8.2 - Representação gráfica das time-courses dos dados vs modelo.....	59
Gráfico 8.3 - Representação gráfica das time-courses dos dados vs modelo.....	60
Gráfico 8.4 - Representação gráfica das time-courses dos dados vs modelo.....	61
Gráfico 8.5 - Representação gráfica das time-courses dos dados vs modelo.....	62
Gráfico 8.6 - Representação gráfica das time-courses dos dados vs modelo.....	63
Gráfico 10.1 – Traçado dos regressores utilizados para cada uma das 4 máscaras obtidas.....	75

Prefácio

A “Aquisição simultânea de EEG-fMRI em Epilepsia” é um projecto do 5º ano da cadeira de Projecto do curso de Engenharia Biomédica da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

A aquisição de dados foi efectuada nos HUC (Hospitais da Universidade de Coimbra). O estudo e a análise dos dados adquiridos foram realizados no IBILI (Instituto Biomédico para Investigação Luz e Imagem). O orientador do projecto foi o Prof. Dr. Miguel Castelo-Branco e o supervisor o Dr. José Marques. De referir também o papel do Dr. Francisco Sales, do Serviço de Neurologia dos HUC, que permitiu o acesso a pacientes com epilepsia.

1. Introdução

A aquisição simultânea de EEG-fMRI (Electroencefalograma e Imagem Funcional por Ressonância Magnética) é um recente avanço tecnológico que permite aliar duas poderosas técnicas de análise funcional do cérebro humano. Neste estudo, estas duas técnicas foram utilizadas em pacientes com epilepsia no lobo temporal podendo servir como auxílio ao serviço de cirurgia, na avaliação e decisão de operação do paciente em causa.

O sinal de EEG, quando adquirido em simultâneo com a fMRI, apresenta artefactos produzidos sobretudo pelos gradientes do scanner e pelo batimento cardíaco do paciente. A análise correcta dos dados e a detecção de pontas epiléticas só é possível removendo estes artefactos. Um dos softwares disponíveis para este efeito é o EEGlab, uma toolbox do Matlab. Já a análise estatística dos dados de fMRI pode ser realizada com o FSL (ferramenta de estudo para dados funcionais).

Reduzir a subjectividade do ‘quando’, através dos dados EEG, e conseguir aumentar a capacidade de detecção do ‘onde’, proporcionada pelos dados de fMRI, é o objectivo principal deste projecto.

Como complemento, é ainda exposto uma metodologia capaz de remover o ruído nos dados de fMRI associado aos batimentos cardíacos do paciente.

Antes da apresentação das metodologias utilizadas e dos resultados obtidos, irá ser feita uma breve introdução teórica relativamente à epilepsia e à Imagem Funcional por Ressonância Magnética e Electroencefalograma.

2. MRI – Imagem por Ressonância Magnética

A obtenção de imagens usadas em fMRI tem como base a técnica que lhe deu origem – a MRI (Imagem por Ressonância Magnética). A MRI é uma técnica não invasiva de imagem usada na medicina capaz de produzir imagens de elevada qualidade do interior do corpo humano. Antes de se inferir sobre o processo de obtenção de imagem através desta técnica, é importante clarificar o modo de funcionamento de um scanner de ressonância magnética bem como as técnicas de formação de imagem existentes.

Foi em 1946 que Felix Bloch and Edward Purcell descobriram o fenómeno de ressonância magnética, a base da ressonância magnética nuclear (NMR). Em 1971, Raymond Damadian provou que os tempos de relaxamento magnético nucleares dos tecidos e os dos tumores diferem entre si, motivando assim os cientistas para uma nova área científica na qual o fenómeno de ressonância magnética pode funcionar como auxílio na detecção de uma doença tumoral. Em 1973, Paul Lauterbur demonstrou, pela primeira vez, o fenómeno de MRI em pequenas amostras em tubos experimentais utilizando uma técnica semelhante à desenvolvida para a tomografia computadorizada – *back projection*. É ainda de salientar o trabalho de Richard Ernest que, em 1975, desenvolveu a MRI com base na codificação da fase e frequência, bem como da transformada de Fourier, técnicas ainda hoje utilizadas em MRI. Já em 1977, Peter Mansfield desenvolveu a técnica de aquisição de imagem eco-planar (EPI), técnica essa desenvolvida nos posteriores anos para produzir imagens com elevada frequência (30 ms/imagem) e que hoje é utilizada quando se pretende adquirir dados funcionais.

Na base da MRI está uma propriedade fundamental dos elementos da Natureza (prótons, electrões e neutrões), tal como o é a carga eléctrica e a massa, designada por spin. Ao sujeitarmos uma partícula a um campo magnético externo B_0 , com a direcção magnética do eixo dos z, o vector de spin dessa mesma partícula irá alinhar com o campo, tal como um magnete o faria.

No entanto existem dois níveis de energia possíveis para a partícula, uma de energia inferior, que é quando o spin se encontra alinhado com o campo magnético e outra de energia superior, quando os spins estão alinhados mas em sentido contrário ao campo magnético (figura 2.1). Esta alternância entre os níveis de energia pode ser efectuada fazendo incidir um fóton de frequência ν que possua uma energia igual à diferença da energia dos dois níveis. Esta frequência característica é designada por frequência de Larmor. Uma partícula ao ser colocada num campo magnético de intensidade B pode absorver um fóton de frequência ν , cuja frequência depende da razão giromagnética segundo a seguinte fórmula: $\nu = \gamma B$. Para o hidrogénio a razão giromagnética é de $\gamma = 42,58$ MHz/T.

Quando várias partículas se encontram sujeitas a um campo magnético externo B_0 , o vector magnetização (M_0), que corresponde à soma dos spins das diversas partículas, está alinhado segundo o campo introduzido.

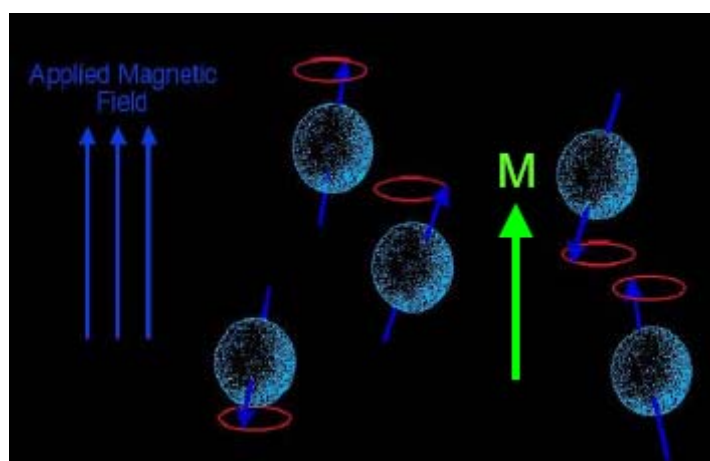


Figura 0.1 - Esquematização da direcção do campo B_0 aplicado e orientação dos spins das partículas (Pascal Belin – University of Montreal)

Esta magnetização é designada por magnetização longitudinal (M_z). É possível alterar este vector fornecendo energia ao sistema. O regresso ao seu estado de equilíbrio é designado por tempo de relaxamento longitudinal ou de latência – spin lattice (T_1). O valor de T_1 é então o tempo necessário para que a magnetização longitudinal regresse a 63% do seu valor original (gráfico 2.1).

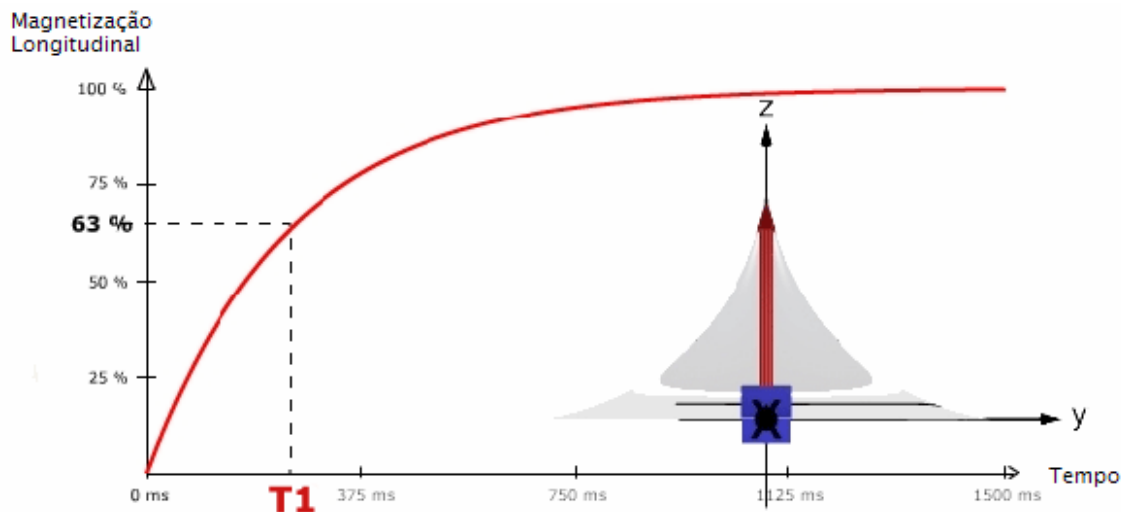


Gráfico 0.1 – Percentagem da magnetização longitudinal (%) versus tempo (ms). [1]

A equação inerente a este processo físico em relação ao tempo t é dada pela seguinte fórmula:

$$M_z = M_o (1 - e^{-t/T_1}) \quad (\text{Equação 2.1})$$

No entanto, se o vector magnetização não se encontrar alinhado segundo o eixo dos z , tem uma componente no plano xy (M_{xy} – vector magnetização transversal). Essa componente irá regressar ao seu estado de equilíbrio ($M_{xy}=0$) rodando em torno do eixo dos z , a uma frequência igual à frequência do fóton incidente – precessão. A constante de tempo que descreve o regresso ao estado de equilíbrio da componente M_{xy} é designada por tempo de relaxamento de spin-spin (T_2). O tempo de relaxamento T_2 ocorre, tal como o tempo T_1 , de forma exponencial sendo que 63 % da magnetização transversal desaparece após um período de T_2 (gráfico 2.2). De referir que T_2 é sempre menor ou igual a T_1 .

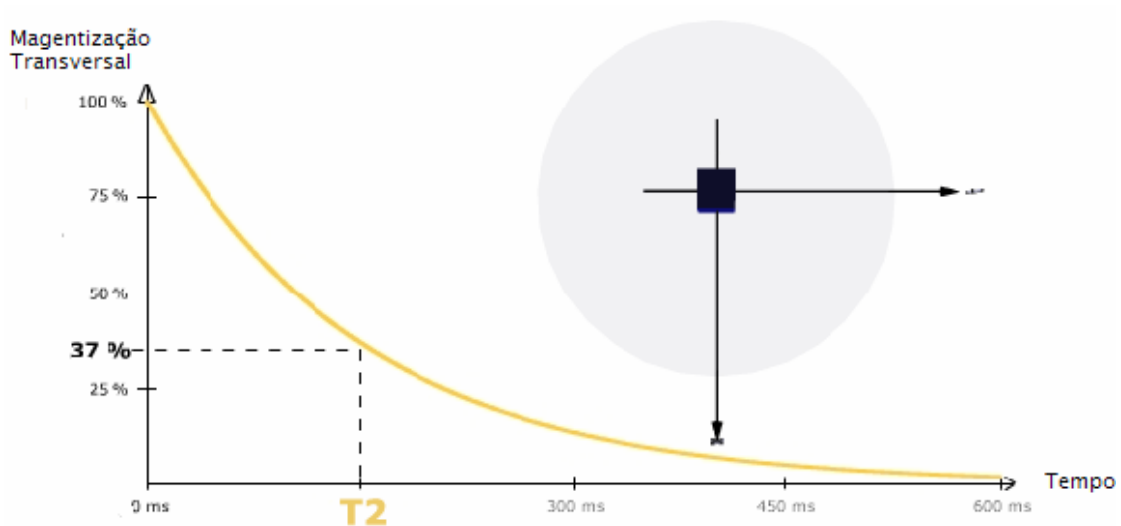


Gráfico 0.2 - Percentagem da magnetização transversal (%) versus tempo (ms). [1]

A equação inerente a este processo físico em relação ao tempo t é dada pela seguinte fórmula:

$$M_{XY} = M_{XY0} e^{-t/T_2} \quad (\text{Equação 2.2})$$

Existem factores que contribuem para o decaimento da magnetização transversal tais como as interacções moleculares (conduzem a um efeito molecular ‘puro’ de T_2) e as variações do campo B_0 (conduzem a um efeito heterogéneo do T_2). Estes dois factores levam ao designado tempo T_2^* (T_2 estrela) cuja relação com o tempo T_2 é dada por:

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{1}{T_{2Heter}} \quad (\text{Equação 2.3})$$

2.1. Técnicas de Imagem – Echo-Planar Imaging (EPI)

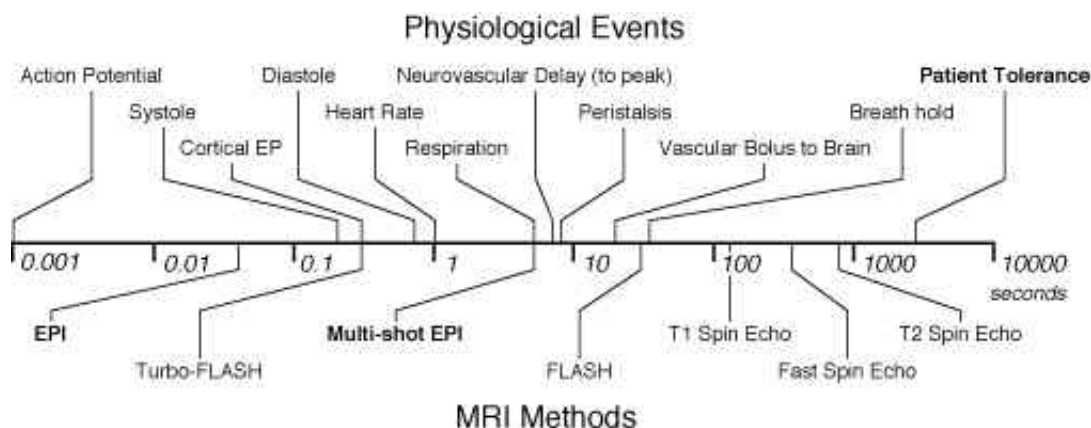


Figura 0.2 – Comparação entre o tempo de alguns processos fisiológicos e as velocidades das técnicas de imagem mais comuns. [2]

Desde o início da MRI que o tempo de aquisição de imagem mostrou ser a maior limitação prática existente. Um paciente consegue tolerar no máximo uma hora deitado dentro de um scanner de ressonância magnético sendo que consegue estar totalmente quieto por apenas 15 minutos. A figura 2.2 mostra a relação entre o tempo necessário para alguns métodos de imagem utilizados em ressonância magnética e uma variedade de fenômenos biológicos.

Nos últimos anos o tempo da aquisição de imagem tem vindo a diminuir. Hoje em dia a sequência de imagem mais rápida utilizada é a eco-planar utilizada na aquisição de imagens funcionais (gráfico 2.3).

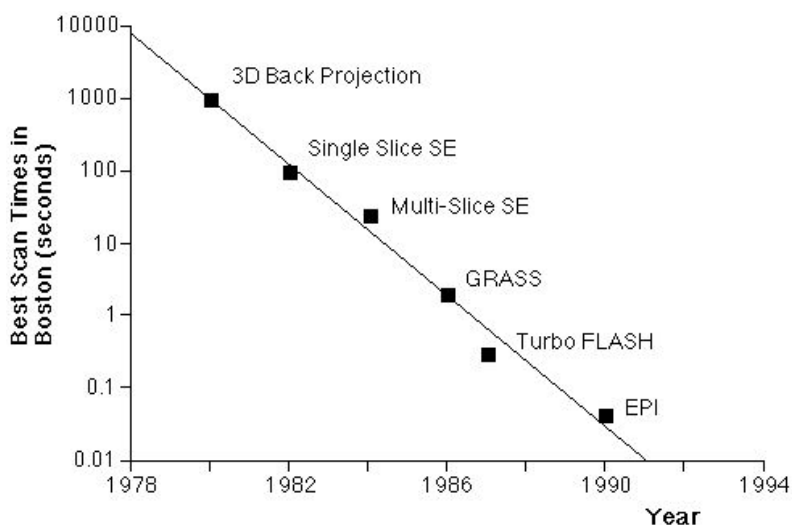


Gráfico 0.3 - Rapidez da aquisição de MRI em função do tempo e da tecnologia (gráfico concebido por Van J. Wedeen da Universidade de Harvard). [2]

Numa sequência típica de imagem T_2 -*weighted* (formação de uma imagem cujo contraste depende predominantemente dos parâmetros intrínsecos de magnetização do tecido, T_2) requer que os tempos entre os pulsos de excitação (tempo de repetição – TR) sejam duas ou três vezes maiores que o parâmetro T_1 . Como o valor de T_1 de tecidos biológicos é na ordem do segundo, o TR necessita de ser 3 vezes superior, logo 3 segundos, levando a que uma imagem formada por 128 repetições da amostra demore 6.5 minutos. Como comparação, a sequência utilizada na EPI adquire os mesmos dados em 40 – 150 milissegundos (dependendo do hardware e do contraste pretendido).

A principal diferença entre a técnica de EPI e as restantes técnicas de imagem reside na forma como se processa a codificação espacial.

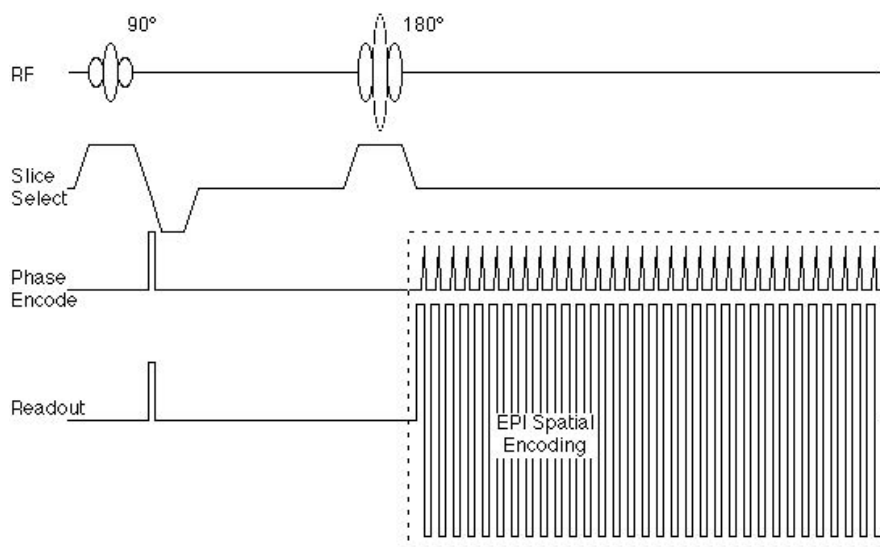


Figura 0.3 – Sequência de aquisição eco-planar. [2]

A figura 2.3 mostra a forma mais comum sequência da técnica de EPI – spin echo sequence (sequência eco de spin). Nesta, a codificação espacial é precedida por uma aplicação de pulso excitatório de radiofrequência (RF) de 90° seguido de um pulso RF de 180° , que resulta na formação de um sinal eco. As imagens adquiridas possuem uma intensidade de sinal descrita pela seguinte equação:

$$SI = k\rho(1 - e^{-tr/T_1})e^{-te/T_2} \quad (\text{Equação 1.4})$$

O valor k representa os factores independentes da sequência tais como a intensidade do campo magnético e a sensibilidade da bobine RF; r é a densidade de prótons no tecido; T_r é o tempo de repetição; T_e é o tempo de eco (*echo time*) – tempo entre o pulso de 90° e o máximo de amplitude do eco.

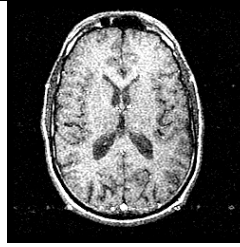
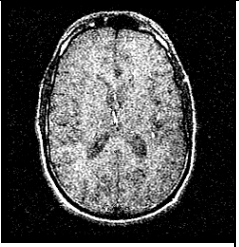
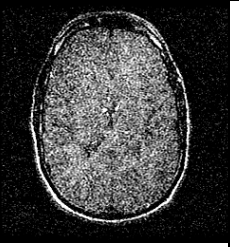
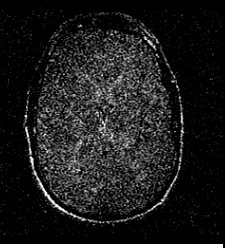
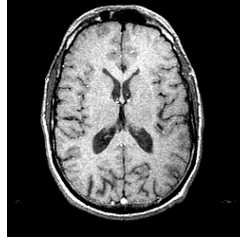

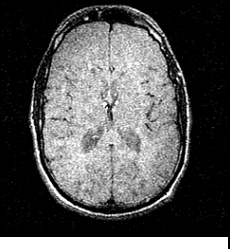
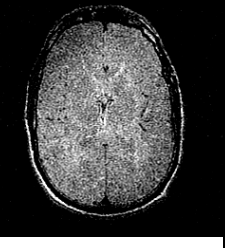


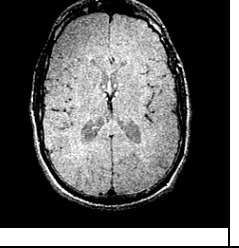
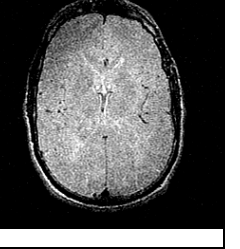



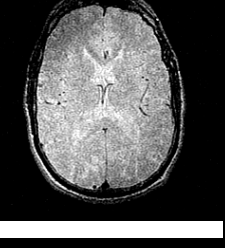

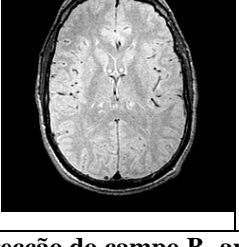

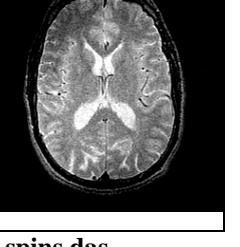
TR(ms)	TE (ms)			
	20	40	60	80
250				
500				
750				
1000				
2000				

Figura 0.4 – Esquematização da direcção do campo B_0 aplicado e orientação dos spins das partículas. [3]

Através da figura 2.4 podemos verificar os diferentes contrastes conseguidos numa imagem, alterando para isso os parâmetros utilizados numa sequência de aquisição EPI.

2.2. Hardware de um sistema de imagem por Ressonância Magnética

Após ter sido exposto o processo físico intrínseco a moléculas que estejam num campo magnético, é agora sucintamente descrito a física do sistema de ressonância magnética e o modo de captação de imagens.

Um campo magnético estático, um transmissor, um receptor de pulsos de radiofrequência (RF) e três gradientes magnéticos ortogonais, que se podem controlar, são os principais componentes de um scanner de MRI.

O magnete, que produz o campo estático, é o maior componente do scanner e, para além da sua força, também a precisão tem um papel crítico na ressonância magnética. Isto porque se pretende que o iso-centro do magnete seja quase perfeito, diminuindo ao máximo a não-homogeneidade do campo, pois este factor provoca perda de qualidade das imagens ou espectros. Já a intensidade do campo magnético é um importante factor na qualidade de imagem. Quanto maior o campo, maior é a razão sinal-ruído (*signal-to-noise ratio*) permitindo uma maior resolução e/ou scanners mais rápidos. Os magnetes mais comuns nos hospitais têm uma intensidade de 1.5 T sendo que cada vez mais se encontram hospitais com sistemas de 3 T.

O sistema de transmissão de RF é composto por um sintetizador de RF, um amplificador de potência e uma bobine de transmissão. Já o receptor é constituído por uma bobine, um pré-amplificador, um digitalizador e um sistema de processamento de sinal. De referir que em muitas aplicações a bobine de transmissão e de recepção são as mesmas.

Os gradientes magnéticos são gerados por três bobines ortogonais que se encontram orientadas segundo um sistema de coordenadas x , y e z . Através destes sistemas de gradientes é possível ajustar a direcção do campo produzido pelos mesmos, bem como a sua força ao longo de qualquer eixo. Como os gradientes são os responsáveis pela determinação do plano de imagem e como

Aquisição Simultânea de EEG – fMRI em Epilepsia

estes podem ser combinados livremente entre si, qualquer plano pode ser seleccionado para obter uma imagem.

O sinal do scanner é então traduzido para imagem e, posteriormente, pode então ser analisada pelo médico ou técnicos especializados.

3. fMRI – Imagem Funcional por Ressonância Magnética

Tal como já foi referido, a fMRI usa os princípios básicos de funcionamento da MRI. No entanto, a sequência utilizada permite a aquisição de muitas imagens mas de reduzida resolução (quando comparadas com a resolução das imagens estruturais). Com esta técnica consegue-se medir de forma indirecta a resposta hemodinâmica (mudança no fluxo sanguíneo e na oxigenação cerebral) associada à actividade neuronal no cérebro ou na medula espinal em humanos ou em animais. Desta forma, é possível produzir mapas de activação onde mostram qual a parte do cérebro envolvida num determinado processo neuronal.

Em 1948 Seymour Kety e Carl Schimdt demonstraram que o fluxo sanguíneo no cérebro é regulado pelo próprio cérebro, mas a possibilidade de usar este efeito, para estudos funcionais, só aconteceu na década de noventa, muito devido ao progresso conseguido pelos cientistas Seiji Ogawa e Ken Kwong. Estes cientistas confirmaram que, quando os neurónios usam mais oxigénio, os sinais químicos emitidos levam a uma dilatação dos vasos sanguíneos na vizinhança da origem da emissão. Por sua vez, o aumento do volume vascular leva a um aumento do fluxo sanguíneo. Esta demanda de oxigénio por parte do cérebro não é linear nem instantânea. Assim, quando as células nervosas são activadas e necessitam de mais oxigénio promovem uma resposta local que intensifica o fluxo sanguíneo nessas regiões cujo máximo é atingido com um atraso de 5-7 segundos.

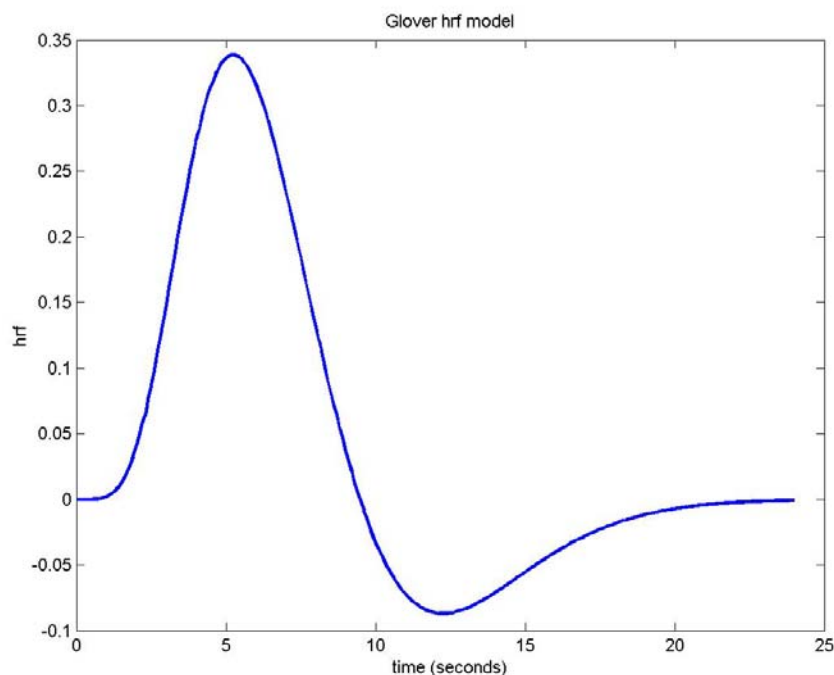


Gráfico 0.4 - Função da resposta hemodinâmica (modelo de Glover). [4]

O pico da resposta hemodinâmica – regulação dinâmica do fluxo sanguíneo no cérebro – é atingido aos 4-6 segundos, voltando depois ao normal. Neste período o volume sanguíneo cerebral aumenta, como consequência directa do aumento local do fluxo sanguíneo cerebral (CBF) face ao aumento da actividade neuronal. Isto leva a que a concentração de oxihemoglobina (hemoglobina transportadora de oxigénio - oxigenada) e de desoxihemoglobina (hemoglobina transportadora de dióxido de carbono - desoxigenada) se altere na região. São as diferentes propriedades magnéticas (oxihemoglobina tem propriedades diamagnéticas e a desoxihemoglobina propriedades paramagnéticas) e a diferença de concentração destas moléculas nas diferentes regiões do cérebro que promovem uma pequena diferença no sinal de MR (Ressonância Magnética) conseguindo-se então obter numa imagem dependente do fluxo sanguíneo cerebral e da concentração de (des)oxihemoglobina.

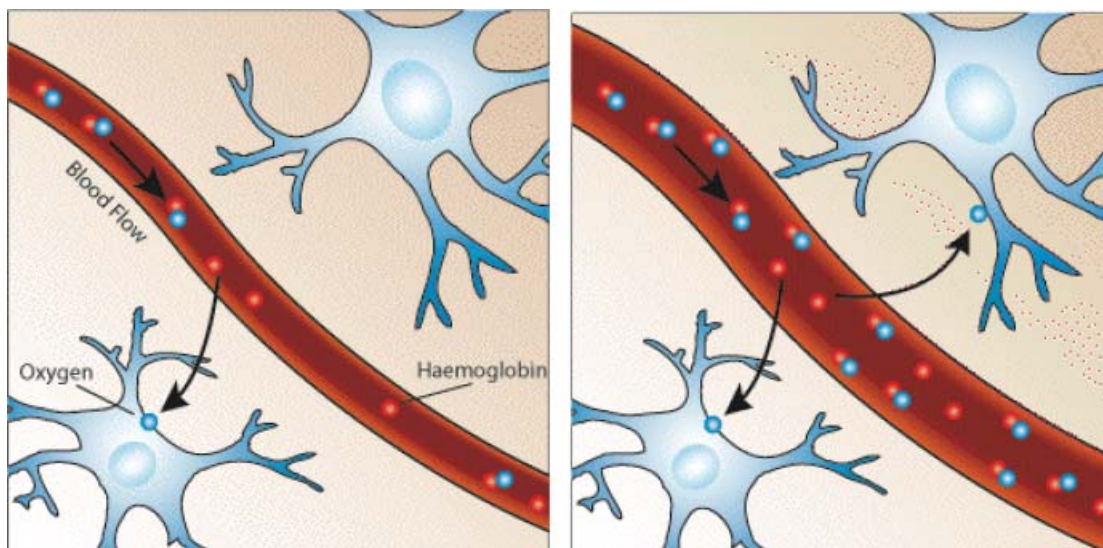


Figura 0.5 - Esquema representativo do consumo de oxigênio por uma célula nervosa. [5]

Desta forma, como o sangue oxigenado numa determinada região do cérebro varia de acordo com os níveis de actividade cerebral (figura 3.1), pode-se utilizar este factor como um detector da actividade cerebral. Este efeito que permite detectar actividade cerebral é vulgarmente conhecido por efeito BOLD (*Blood Oxygen Level Dependent Effect*).

O sinal BOLD resulta então das variações do CBF e do consumo local de oxigênio. É ainda de referir que no scanner de 1.5 T, 70% do contraste provém da contribuição dos vasos sanguíneos mais largos, enquanto que num scanner de 4 T, 70% do contraste provém das veias mais pequenas.

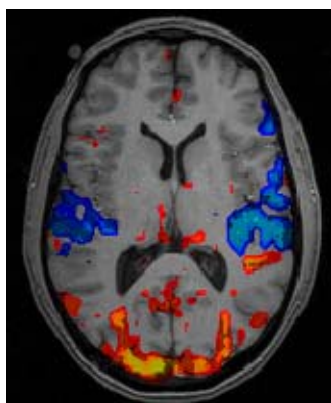


Figura 0.6 - Activações em dados de fMRI. [5]

O efeito BOLD é medido através de uma rápida aquisição volumétrica de imagens com contraste T_2^* . Estas imagens, constituídas por voxels (elemento de volume), traduzem então a actividade neuronal e podem ser adquiridas com boa resolução espacial e temporal, sendo a razão temporal de 1-4 segundos e a espacial de 2-4 milímetros.

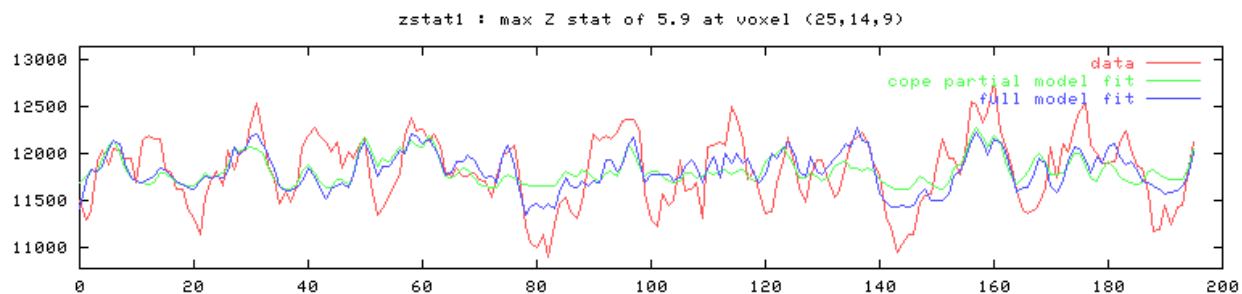


Gráfico 0.5 – *Time-course* da actividade num voxel. [5]

A actividade num voxel é definida como sendo a correlação com que a *time-course* do sinal proveniente desse mesmo voxel, representada no gráfico 3.2 pela cor vermelha, se encontra da *time-course* esperada, representada no gráfico 3.2 pela cor verde. Voxeis cujo sinal se encontra correlacionado com o esperado acima de um determinado valor estatístico são considerados activos, enquanto voxeis onde essa correlação não atinge esse valor estatístico são considerados não activos.

4. EEG – Electroencefalografia

A técnica de Electroencefalografia permite a medida da actividade eléctrica do cérebro através da gravação dos sinais captados por eléctrodos colocados no escalpe ou, em casos especiais, no córtex cerebral. O sinal resultante representa a soma do sinal eléctrico (potenciais pós-sinápticos) de um elevado número de neurónios e é designado por Electroencefalograma (EEG). É de salientar que não é a corrente eléctrica que é medida mas sim as diferenças de potenciais existentes entre as diferentes partes do cérebro. Esta detecção de alterações da actividade eléctrica é feita com uma resolução temporal muito elevada, na ordem dos milissegundos.

Foi em 1875 que o físico Richard Caton apresentou no *British Medical Journal* os resultados da sua experiência onde descrevia o fenómeno eléctrico que acontecia em hemisférios cerebrais de coelhos e macacos. No entanto foi só em 1920 que o fisiologista alemão Hans Berger começou estudos de EEG em humanos (figura 4.1). Este cientista deu o seu nome ao dispositivo sendo visto como o inventor do EEG, apesar de outros cientistas também terem produzido semelhantes experiências.

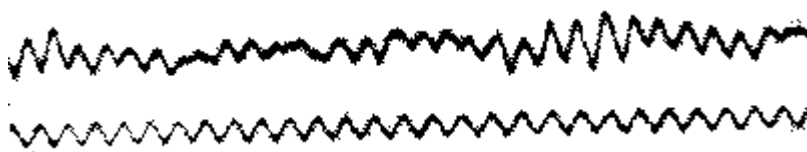


Figura 0.7 – EEG obtido por Hans Berger em 1924. [6]

Hoje em dia, um EEG convencional do escalpe é obtido colocando vários eléctrodos no escalpe, que é pré preparado com uma ligeira abrasão para reduzir a impedância. O sinal de EEG, quando o dispositivo se encontra na superfície do escalpe, provém de um grandes correntes dendríticas geradas por activações de um grande número de neurónios. O EEG do escalpe provém então da condução passiva de correntes através do meio extra celular e que são produzidas pelos agregados neuronais. Desta forma, a actividade gravada num eléctrodo do escalpe corresponde ao somatório da actividade das regiões que lhe estão

próximas. É de salientar que o sinal pode também ser influenciado por actividade que ocorra longe da área do eléctrodo, o que muitas vezes se traduz num sinal excedente.

De referir que as toucas comercializadas apresentam 31 ou 63 eléctrodos. A sua colocação, localização dos eléctrodos e nomenclatura segue normas fornecidas por sistemas internacionais (como por exemplo o 10-20), promovendo-se assim um sistema reproduzível e seguro.

Cada eléctrodo é conectado a uma entrada de um amplificador diferencial sendo que a outra entrada é ocupada pelo eléctrodo de referência. Assim, consegue-se amplificar a diferença de potencial dos eléctrodos (activo/referencia) na ordem de 1000-100000. O sinal voltaico resultante é então filtrado por um filtro passa-baixo (com uma frequência característica 35-75 Hz) e um filtro passa-alto (com uma frequência característica 0.5 Hz). Um filtro adicional – *notch filter* – remove o artefacto causado pela frequência de corrente local (50 Hz em Portugal).

A variação de corrente é o principal artefacto externo do sinal do EEG. No entanto, poderão também ocorrer artefactos internos ou biológicos que sejam fonte de ruído do sinal. Os tipos mais comuns de sinais “não-cerebrais” são os artefactos oculares, artefactos causados pelos batimentos cardíacos e por contracções e movimentos musculares involuntários.

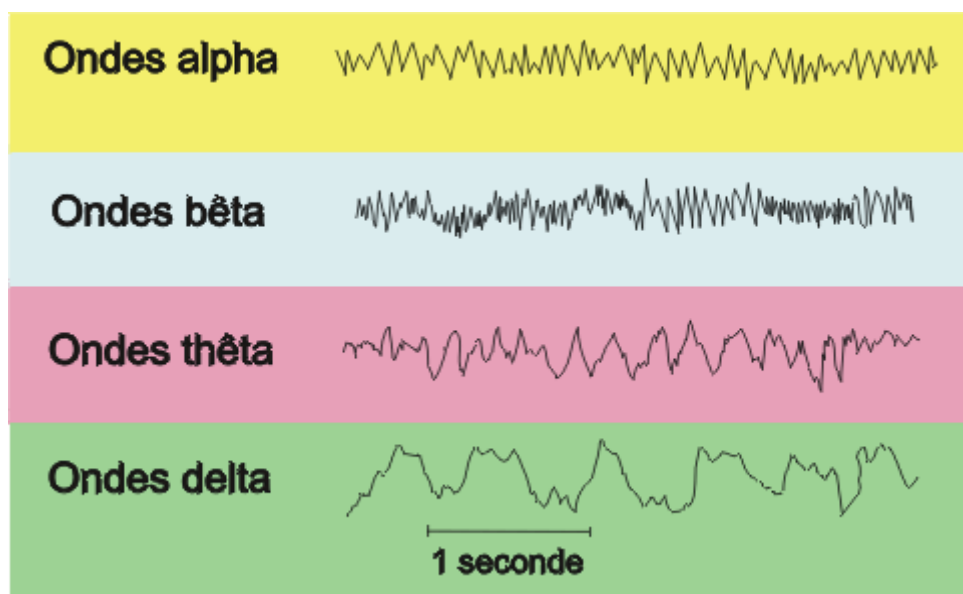


Figura 0.8 - Tipos de ondas presentes no EEG. [7]

Um sinal típico de EEG de repouso apresenta quatro principais tipos de ondas de actividade sinusoidal rítmica contínua (figura 4,2). A onda alfa (onda de Berger) apresenta uma frequência na ordem dos 8 Hz a 12 Hz. É característica de um estado relaxado e de alerta consciente. Já a onda beta tem uma frequência de aproximadamente 12 Hz, sendo associada a pensamentos activos, ocupados ou ansiosos e ao estado de concentração. A onda teta, com uma frequência entre os 4 e os 8 Hz, está associada à sonolência, à infância e fase da adolescência. Por último, a onda delta na ordem dos 4 Hz está muitas vezes associada a certas encefalopatias e a lesões cerebrais.

O EEG do escalpe em adultos tem uma amplitude máxima de 75 μ V mas, em casos extremo tais como ataques epilépticos, pode alcançar os 1 mV de amplitude.

O EEG é um grande auxílio na medicina pois permite localizar temporal e espacialmente (com uma resolução muito pequena) zonas do cérebro que tenham impulsos eléctricos instáveis causadores da epilepsia, podendo também ser utilizado para diagnosticar e supervisionar ataques epilépticos, encefalopatias e estados de coma.

5. Epilepsia

A palavra epilepsia é de origem grega, “epi” = em cima e “lepsem” = abater, que significa fulminar, abater com surpresa, ser atacado, algo que vem de cima e abate o indivíduo.

“A epilepsia é uma perturbação caracterizada pela tendência a sofrer convulsões recidivantes” [7]. Vallejo-Nágera define ataque epiléptico como “um fenómeno clínico, com sintomas variados, que incide bruscamente sobre o paciente e é decorrente de uma descarga de actividade neuronal paroxística de uma certa quantidade de células nervosas de qualquer estrutura ou território cerebral, e que é acompanhado por uma fenomenologia eléctrica característica. De acordo com o território de onde parte a primeira descarga que inicia a crise epiléptica, estarão presentes traços clínicos e eléctricos específicos de cada caso.” [8]

As crises epilépticas podem ser desencadeadas por vários estímulos tais como sons repetitivos, luzes cintilantes (por ex. em videojogos) ou até mesmo tocando o paciente em certas partes do corpo. Actualmente a classificação destas crises é feita de acordo com a “Classificação de Crises Epilépticas” de 1981, elaborada pela Liga Internacional Contra a Epilepsia, sendo classificadas por sintomas clínicos auxiliadas por dados do EEG em crises parciais (focais, que comprometem uma região delimitada de um hemisfério cerebral), crises generalizadas de origem não focal (convulsivas e não convulsivas) e em crises epilépticas não classificadas (quando não preenchem os critérios de classificação).

Para além de se poder identificar e classificar as crises epilépticas é também importante e de grande auxílio a classificação das manifestações neurológicas e psiquiátricas em pacientes com epilepsia. Consegue-se assim, através da análise do EEG, a sua classificação em:

- Pré-ictais – Antes de ocorrer o momento da crise epiléptica propriamente dita;

- Ictais – Ocorrem no momento da crise epiléptica propriamente dita;
- Pós-Ictais – Manifestações que se seguem ao término da crise epiléptica, no máximo após 48 horas
- Interictais – Ocorrem entre o término do período pós-ictal e o início da próxima crise

Num EEG típico de pacientes com epilepsias focais a anormalidade epileptiforme mais frequentemente observada são as pontas e ondas agudas isoladas, que aparecem sobre a actividade base do sinal traçado. Essas pontas e ondas caracterizam breves períodos de excitação seguida de inibição sináptica (hiperpolarização) de células piramidais, resultando do desequilíbrio entre excitação e inibição numa rede neuronal que está predisposta à epilepsia. Estas manifestações são, tal como já foi referido, paroxismos epileptiformes interictais e que estão normalmente relacionados com a zona irritativa – área cortical que frequentemente (mas não sempre) está próxima do foco primário de origem das crises (zona epileptogênica). Desta forma, a sua localização poderá guiar-nos até aos circuitos neuronais que são iniciadores de crises epilépticas espontâneas.

É assim de extrema importância e uma mais valia para o estudo e avaliação de uma possível cirurgia ao doente epiléptico, estudar e analisar tanto as pontas ictais como as interictais, determinando assim a localização da zona epileptogênica.

6. EEG-fMRI

Estudos existentes onde se combinam as técnicas de EEG e de fMRI mostram que estes podem ser de grande auxílio científico no que diz respeito ao conhecimento e compreensão do funcionamento do sistema nervoso, onde se incluem as funções e as disfunções cerebrais existentes no cérebro humano.

Tal como já foi referido, o EEG e o fMRI são duas técnicas não invasivas que se complementam, isto é, enquanto o EEG fornece a resolução temporal necessária, o fMRI dar-nos-á uma excelente resolução temporal.

Nos últimos anos inúmeros centros de imagem cerebral desenvolveram técnicas para a aquisição simultânea dos dados de EEG-fMRI sendo de destacar os seguintes estudos efectuados – Krakow *et al*, 2000; Lemieux *et al*, 1997; Lemieux *et al*, 2001; Bonnmassar *et al*, 2001. Estes investigadores avaliaram, cuidadosamente, as interacções entre o sistema de ressonância e o sistema de EEG dando início ao estudo simultâneo do EEG com fMRI. A aquisição de EEG durante a fMRI levanta algumas questões de segurança para o paciente (Lemieux *et al* 1997). A presença de fios eléctricos ligados ao paciente num campo magnético, que se altera rápida e constantemente, resulta em correntes que fluem pelo paciente dando origem a forças electromotrices induzidas (fem). Desta forma, tem de se ter em atenção qual o tipo de EEG e as suas características de forma a poder cumprir as normas de segurança.

Duas formas distintas de correlacionar estas duas técnicas foram sendo desenvolvidas – aquisição em simultâneo ou aquisição não simultânea.

A possibilidade da aquisição simultânea é a que apresenta maiores vantagens uma vez que os dados adquiridos por EEG e por fMRI reflectirem o mesmo processo neuronal. Dentro deste tipo de aquisição poder-se-á recorrer ainda a dois tipos de estudos diferentes – aquisição intercalar e aquisição completamente simultânea.

Na aquisição intercalar os dados de EEG são adquiridos de forma contínua enquanto que os dados de fMRI são adquiridos intermitentemente. Isto é, após ser apresentado um estímulo ou a detecção de, por exemplo, uma ponta epiléptica, começa-se a aquisição dos dados de fMRI.

Em 2001, Lemiux e colaboradores, apresentaram um estudo sobre a aquisição em simultâneo, até então sido impossível devido aos grandes artefactos presentes no sinal de EEG, produzidos sobretudo pelos gradientes do scanner aquando da aquisição dos dados de fMRI. Note-se que para que seja possível detectar e remover os artefactos devido aos gradientes e para prevenir “aliasing” dos artefactos do scanner, a gravação dos dados de EEG necessita de ser feita com uma taxa de amostragem de 10kHz/canal ou superior.

Ao contrário do EEG, tal como já foi referido, o fMRI não mede directamente a actividade neuronal mas sim as alterações de oxigénio, volume sanguíneo e de fluxo – efeito BOLD. Por causa do *lag* da resposta hemodinâmica – o tempo necessário que leva a que o nível de sangue oxigenado atinja o seu pico – faz com que a sua resolução temporal seja limitada a vários segundos (1-6), no entanto a sua alta resolução espacial de aproximadamente 1 mm faz com que haja a complementaridade necessária entre estas duas técnicas.

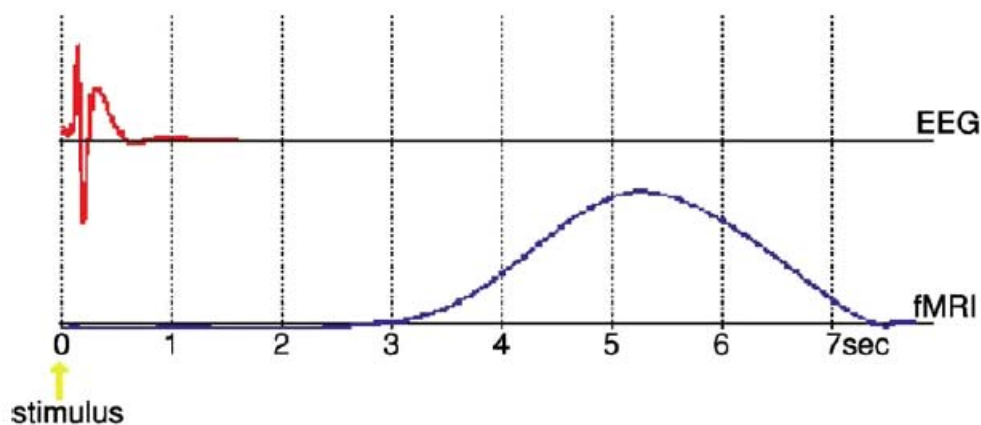


Gráfico 0.6 – Tempo relativo da resposta no EEG e fMRI após a apresentação de um estímulo. [9]

Este facto é facilmente observável no gráfico 6.1 onde após a apresentação de um estímulo se comprova que o sinal no EEG derivado da actividade cerebral para esse estímulo é logo apresentado enquanto que no sinal de fMRI demora 2 segundos a surgir e 4 a 6 segundos a atingir o seu máximo, recuperando o estado inicial em 12 segundos. Esta alteração do sinal devido a um estímulo é designada por função da resposta hemodinâmica (HRF).

Como síntese, pode-se dizer que existem várias metodologias e estudos no que concerne à aquisição simultânea de EEG-fMRI. No entanto, o interesse na aplicação destas duas técnicas aplicadas a eventos espontâneos tem vindo a crescer mais que outro tipo de aplicação. Desta forma, a identificação da

Aquisição Simultânea de EEG – fMRI em Epilepsia

correlação entre a actividade neuronal e as pontas epilépticas, identificáveis pelo EEG, é a área com maior interesse pois podem permitir, em hipótese, localizar o foco epiléptico do paciente em estudo.

7. Metodologia

7.1. Protocolo de Aquisição EEG-fMRI

Antes de se dar início à colocação dos eléctrodos é necessário, no local onde os eléctrodos irão ficar, passar com algodão embebido num gel abrasivo (por ex: um esfoliante) para assim remover células mortas da epiderme aumentando a superfície de contacto entre o escalpe. É então iniciada a fase de colocação dos 31 eléctrodos que compõem o sistema de EEG sendo que são colocados mais dois eléctrodos na caixa torácica, na zona do coração, de forma a receber o sinal cardíaco. Tal como já foi referido, os eléctrodos são colocados segundo as normas do sistema 10/20 (Fig. 7.1).

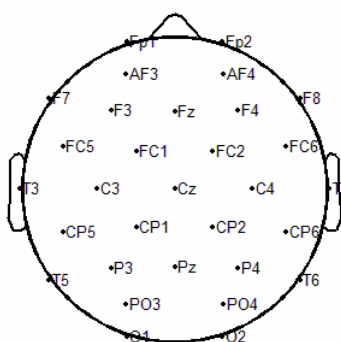


Figura 0.9- Posição dos 31 eléctrodos no escalpe

Os eléctrodos são então colocados juntamente com um gel condutor específico para EEG. De referir que este gel condutivo produz grandes artefactos de imagem sendo que de forma a se poder obter uma impedância aceitável se deve utilizar a mínima quantidade de gel possível (Krakow et al., 2000).

O paciente é informado de toda a metodologia e de todos os passos necessários durante a experiência. Desta forma tenta-se tranquilizar o paciente ao máximo para que este não se mova durante o exame, o que poderia resultar em artefactos no EEG e também no fMRI.

O próximo passo prende-se com a verificação dos valores das impedâncias de cada eléctrodo. Um valor reduzido da impedância significa

maior SNR. O software da Micromed possui um sistema que alerta quando as impedâncias dos eléctrodos são maiores do que o aceitável. Permitindo assim uma fácil optimização de todos os contactos. De referir que os eléctrodos utilizados são compostos por ouro pois são os que dão a melhor combinação entre pequenos artefactos que possa produzir na imagem e facilidade de uso (Krakow et al., 2000). Em seguida é então feita uma primeira aquisição (primeiro *dataset*) do EEG com o objectivo de captar possíveis pontas interictais que o paciente tenha para futura referência. Esta aquisição tem a duração de, aproximadamente, 5 minutos.

Após a aquisição do EEG, o paciente é então encaminhado para a sala da ressonância magnética tendo em atenção de explicar todo o procedimento na fase da ressonância deixando bem claro que é necessário estar o mais imóvel possível. Note-se que, como mais à frente irá ser descrito, qualquer movimento poderá causar artefactos tanto nos dados de fMRI como de EEG. Depois de ser pedido para retirar todos os objectos metálicos que tenha consigo, são fornecidos tampões auditivos ao paciente para minimizar o ruído produzido pelos gradientes, bem como uma almofada para minimizar qualquer desconforto provocado pela touca.

Dentro da sala onde é adquirido a MR apenas é deixada a caixa que recebe o sinal da touca de EEG. É de salientar que os fios provenientes da touca não devem estar em contacto directo com o scanner nem com o chão para minimizar vibrações dos fios que se traduziriam em ruído. Ao ser utilizado uma protecção eficaz (caixa de alumínio e filtro RF) consegue-se diminuir quase na totalidade esse ruído (Krakow et al., 2000).

Ao lado da sala onde vai ser adquirido a MR instala-se o computador da Micromed que recebe o sinal proveniente da touca, tendo também acoplado um hardware capaz de detectar os *triggers* do scanner. Desta forma poderemos saber quando é que o scanner começa a adquirir os volumes o que é de extrema importância para poder analisar detalhadamente tanto o EEG como os dados de fMRI.

É então dado início à aquisição de imagem sendo que normalmente se adquirem 4 a 6 *datasets*. Caso o paciente não se sinta confortável e queira parar o exame, esse *dataset* é de novo adquirido posteriormente desde início.

Os primeiros dados adquiridos são dados estruturais (MRI) onde depois será feito o co-registo dos dados funcionais para assim se obter uma melhor localização espacial. Em seguida, como os dados adquiridos não são funcionais, faz-se um teste ao hardware/software para que tudo esteja perfeito aquando da aquisição da fMRI testando-se, nomeadamente, o sinal de EEG proveniente da touca da paciente e também o do *trigger* proveniente do scanner.

Após estes testes iniciais são inseridos no software, associado ao scanner, alguns parâmetros que determinam a aquisição dos dados de fMRI tal como o seu contraste. Neste caso em estudo o TR utilizado foi de 2.32 segundos tendo sido adquiridos 200 volumes em cada *dataset*, cada um dos quais com 25 *slices* dispostas em matrizes de 64*64. Procedeu-se então à aquisição dos dados funcionais dispostos em 6 *datasets*, sendo que um dos quais não foi completo pois a paciente solicitou uma paragem por se sentir pouco confortável. De seguida gravam-se todos os dados adquiridos em CD para serem posteriormente tratados e analisados.

7.2. Tratamento dos Dados

7.2.1. EEG

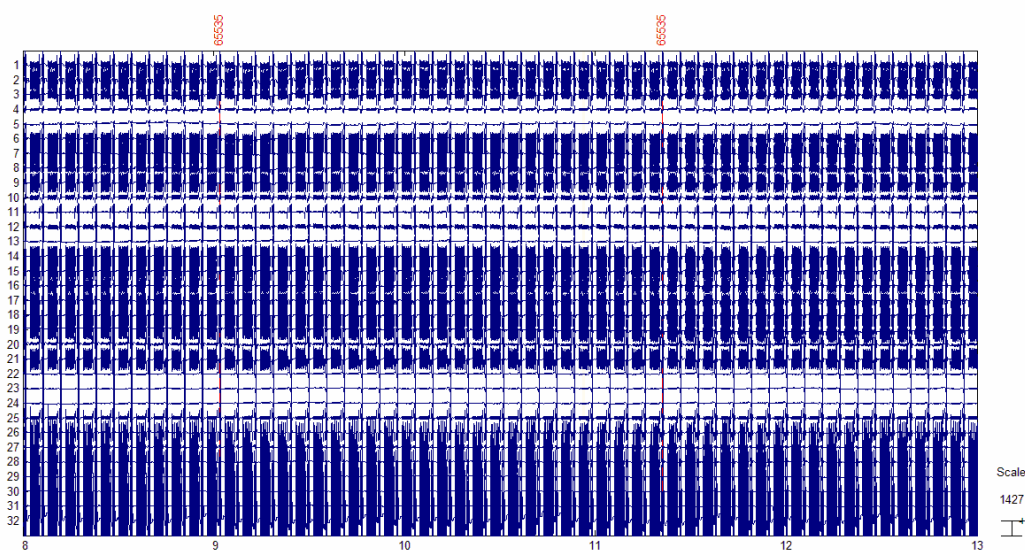


Figura 0.10 – Sinal proveniente do EEG durante a aquisição de fMRI.

No presente estudo a aquisição do EEG é feita em simultâneo com a aquisição dos dados de fMRI. Desta forma, tal como comprova a figura 7.2, é de todo impossível ler o sinal e retirar qualquer informação excepto o início da aquisição dos volumes por parte do scanner.

O pré-requisito para qualquer experiência de EEG com correlação de eventos com os dados de fMRI é a obtenção do maior número de eventos possíveis. Tal como já foi referido, os eventos neste estudo são as pontas epilépticas que, num sinal de EEG, podem ser comparadas a um pulso de Dirac. Como objectivo inicial pretendeu-se limpar o máximo de ruído existente no sinal EEG de forma a se proceder à marcação do momento em que ocorrem as pontas epilépticas.

É importante referir que, numa aquisição simultânea de EEG-fMRI, os artefactos existentes num sinal de EEG provêm essencialmente das correntes induzidas, devido às rápidas variações do campo magnético provocados pelos gradientes responsáveis pela codificação da imagem, e dos batimentos cardíacos (BCG), que promovem um dilatar das artérias e conseqüente movimento dos eléctrodos do sistema de EEG (Niazy et al., 2005).

Um dos estudos pioneiros no tratamento dos dados e remoção do ruído, provocado pelas forças electromagnéticas, do EEG foi efectuado por Hoffmann (Hoffmann et al., 2000). No entanto a remoção do ruído era conseguido aplicando filtros *band-stop* a qualquer frequência de interferência que perturbasse o sinal do EEG e que estivesse dentro da sua janela de aquisição (0.1-40 HZ), já que o restante poderia ser eliminado com filtros do tipo passa-alto ou passa-baixo.

No presente estudo, a remoção dos artefactos provocados pelos gradientes e pelos batimentos cardíacos foi efectuada utilizando o programa Matlab, com respectiva toolbox – EEGlab (Delorme et al., 2003) e add-on para o efeito ‘fmrib version 1.21’. Entre outras funções, o EEGlab permite importar o sinal EEG, informações dos canais e dos eventos, pré-processar os dados (inclui rejeição de artefactos, filtragem, selecção de eventos), *independent component analysis* (ICA) e decomposição no tempo e no espaço do sinal. É possível interagir com esta *toolbox* só a partir da interface gráfica apresentada (figura 7.3) ou através de linhas de comando.

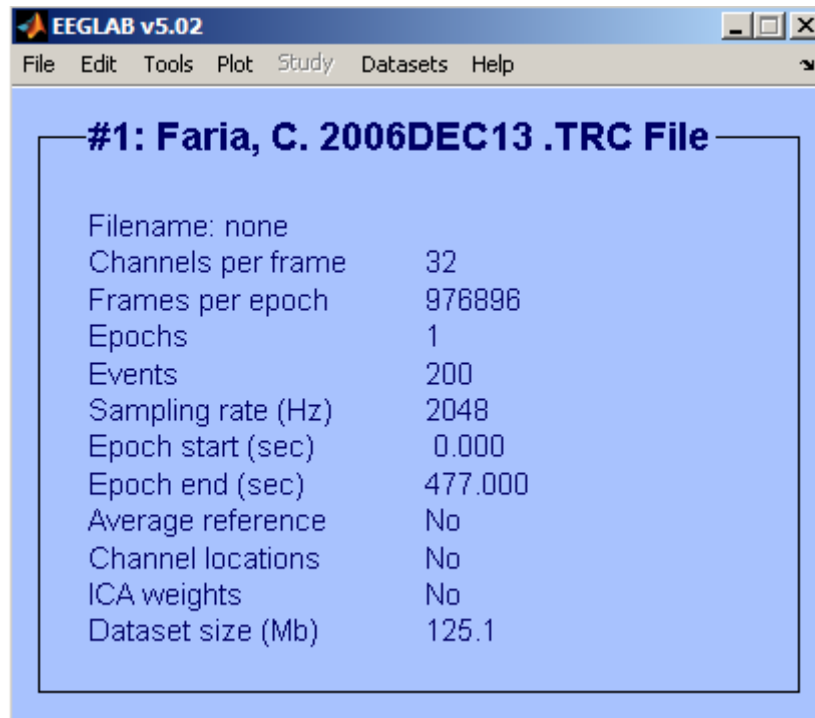


Figura 0.11 – Interface gráfica do EEGLab.

Quando se faz o *load* dos dados do sistema da Micromed, estes automaticamente modificam a extensão de “.TRC” para “.SET”. Tal como documenta a figura 7.3, após ter carregado o EEGLab com dados “.TRC” através da interface gráfica, é apresentada algumas características específicas do EEG em causa, como por exemplo a frequência de amostragem (2048 HZ), o número de canais (31 eléctrodos provenientes da touca + 1 do sinal do Electrocardiograma) e o tempo de começo e do fim da aquisição do EEG. É ainda de referir que o EEGLab usa uma estrutura simples (de nome “EEG”) para gravar os dados, parâmetros de aquisição, eventos, posição dos canais e informações das épocas. Esta estrutura é então utilizada para, em ambiente Matlab, aplicar todos os algoritmos necessários para a remoção do ruído provocado pelos gradientes.

```

>> EEG
EEG =

    setname: 'Faria, C. 2006DEC13 .TRC File'
    filename: ''
    filepath: ''
    subject: ''
    group: ''
    condition: ''
    session: []
    comments: ''
    nbchan: 31
    trials: 1
    pnts: 331722
    srate: 128
    xmin: 0
    xmax: 2.5916e+003
    times: []
    data: [31x331722 single]
    icaact: []

    icawinv: []
    icasphere: []
    icaweights: []
    icachansind: []
    chanlocs: ''
    urchanlocs: []
    chaninfo: [1x1 struct]
        ref: 'common'
        event: [1x4038 struct]
        urevent: [1x4038 struct]
    eventdescription: ([] [] '')
    epoch: []
    epochdescription: {}
    reject: [1x1 struct]
    stats: [1x1 struct]
    specdata: []
    specicaact: []
    splinefile: ''
    icasplinefile: ''
    dipfit: []
    history: [1x399 char]
    saved: 'no'
    etc: []

```

Figura 0.12 – Estrutura dos dados EEG em ambiente Matlab

A figura 7.4 apresenta uma estrutura típica dos dados de EEG quando importados pelo software EEGLab. De referir que os dados apresentados fazem parte de um EEG ao qual já foram aplicados os algoritmos de remoção de ruído a seguir descritos.

7.2.1.1. Remoção dos artefactos associados aos gradientes

Tal como já foi referido, numa sequência de aquisição de imagem eco-planar (EPI), típica da aquisição de dados de fMRI, a modificação dos

Mário João Bártolo

gradientes é repetida sempre que uma nova *slice* é adquirida o que resulta em artefactos que se repetem sempre que uma nova *slice* da fMRI é captada. A amplitude deste tipo de artefactos é 100 vezes maior o que sinal de EEG e a sua frequência sobrepõe-se à do EEG, fazendo com que não possam ser simplesmente filtrados.

O algoritmo aplicado procede à remoção destes artefactos no sinal de EEG construindo um modelo único para cada artefacto provocado pela mudança de *slice* em cada canal de EEG, subtraindo-o de seguida ao sinal original – FASTR (*fMRI artifact template removal*) (Niazy et al., 2000).

Antes de se efectuar a remoção do ruído provocado pelos batimentos cardíacos são aplicados um filtro passa-alto de 1 HZ e um filtro passa-baixo de 45 Hz para remover qualquer frequência no EEG que não esteja dentro desta janela. Modifica-se também a amostragem de frequência de 2048 Hz (confirmado pela figura 7.4 estando esta designada na estrutura por “srate”) para 128 HZ pois assim consegue-se reduzir o tamanho dos dados sem perder informação.

7.2.1.2. Remoção dos artefactos associados aos batimentos cardíacos

O artefacto provocado pelos batimentos cardíacos traduz-se numa distorção do sinal EEG. Num ambiente normal de aquisição de EEG este é normalmente causado por um eléctrodo que se encontra posicionado por cima de uma vaso sanguíneo. Mas dentro de um campo magnético este problema é muito mais pronunciado. Em contraste com os artefactos provocados pelos gradientes, e embora a forma básica do sinal dos artefactos do BCG ser semelhante de uma ocorrência para a outra em cada canal do EEG, existem variações consideráveis na forma do artefacto, amplitude e escala ao longo do tempo (Niazy et at., 2000).

De forma semelhante ao efectuado na remoção dos artefactos dos gradientes, o algoritmo utilizado para remover o ruído cardíaco faz uma decomposição dos dados através de PCA (*Principal Components Analysis*) temporal, em cada canal EEG. Construindo em seguida uma base de funções ortogonais capazes de caracterizar o variável artefacto cardíaco no EEG.

Desta forma obtém-se um EEG ‘limpo’, sem artefactos, e de fácil leitura para o médico especialista em detecção de pontas epilépticas. No entanto, o software da Micromed apenas faz a leitura de ficheiros na extensão “.TRC”, sendo por isso necessário alterar o tipo de ficheiro que, tal como atrás referido se encontra na extensão “.SET”.

7.2.1.3. Marcação das pontas epilépticas/construção dos regressores

O médico procede então à detecção de pontas epilépticas marcando-as no EEG, acrescentando assim eventos à estrutura. Na figura 7.5 encontra-se um EEG ‘limpo’ e já com pontas epilépticas marcadas a preto com a letra ‘p’. De referir que os 6 diferentes EEG foram concatenados, utilizando uma função do EEGlab, formado agora uma só estrutura contínua e não 6 *datasets* diferentes como inicialmente.

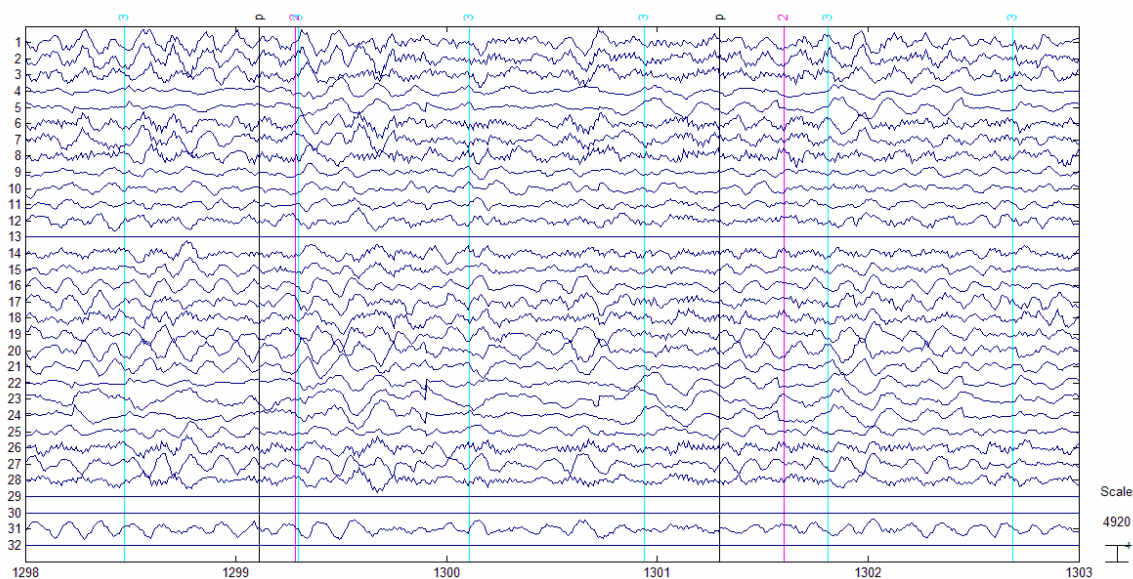


Figura 0.13 – Sinal EEG ‘limpo’.

Para além de a estrutura do EEG apresentar eventos do tipo ‘p’, dá-nos ainda a informação do começo de aquisição de um determinado data ser (eventos do tipo ‘1’), do começo de aquisição de um novo volume de fMRI

(eventos do tipo ‘2’) e do momento em que ocorre o pico QRS (eventos do tipo ‘3’).

Para efectuar a análise dos dados de fMRI correlacionando-os com o momento em que ocorreram pontas epilépticas é necessário a construção de regressores para cada *dataset*.

São então criados ficheiros de texto com a informação relativa a estes regressores que contêm a informação do quando ocorreu a ponta epiléptica (primeira coluna), qual o tempo de duração (estandardizado a 0.25 segundos para todas as pontas – segunda coluna) e a informação relativa à contribuição que queremos dar desse mesmo evento durante o tempo referido (terceira coluna).

```
>> regressor_dataset_1=load('C:\Cygwin\data_local\13_12_06\fMRI\13_12_2006\fMRI\1\pontas.txt')
regressor_dataset_1 =
    1.3000    0.2500    1.0000
    7.1400    0.2500    1.0000
    8.0500    0.2500    1.0000
   10.1000    0.2500    1.0000
   11.6700    0.2500    1.0000
   29.9500    0.2500    1.0000
   47.4600    0.2500    1.0000
   54.5700    0.2500    1.0000
   59.0300    0.2500    1.0000
   60.1700    0.2500    1.0000
   61.0500    0.2500    1.0000
   65.5300    0.2500    1.0000
   65.5600    0.2500    1.0000
   66.1300    0.2500    1.0000
   69.1400    0.2500    1.0000
   71.3700    0.2500    1.0000
   87.5400    0.2500    1.0000
   87.5800    0.2500    1.0000
```

Figura 0.14 – Estrutura do regressor.

A figura 7.6 representa parte da estrutura de um regressor do primeiro *dataset* de aquisição, tendo sido identificadas ao todo 89 pontas epilépticas. Já no segundo *dataset* foram identificadas 26, no terceiro 2, no quarto 3, no quinto 3 e no sexto 4.

7.2.2. fMRI

No que concerne aos dados obtidos por ressonância magnética foram efectuadas seis aquisições de dados fMRI sendo que a terceira aquisição foi interrompida, a pedido do paciente por este se encontrar desconfortável.

O software utilizado para análise destes dados foi o FSL que, para além de outras funções, permite identificar zonas activadas no cérebro humano devido ao já explicado efeito BOLD – FEAT (*fMRI Expert Analysis Tool*). Outras funcionalidades utilizadas do FSL foram: BET (*Brain Extraction Tool*) – capaz de eliminar da imagem da cabeça adquirida por MRI tecido que não faça parte do cérebro (por ex: a parte óssea da cabeça); FLIRT (*FMRIB's Linear Image Registration Tool*) – utilizado para fazer o co-registo de diferentes imagens.

O FSL corre em ambiente Linux e como o sistema operativo utilizado foi o Windows XP, foi necessário recorrer ao Cygwin, que é um software capaz de recriar o ambiente Linux. De salientar que para além de apresentar uma GUI (*Graphical User Interface*), o FSL permite que as suas funções possam ser efectuadas recorrendo à linha de comando no Cygwin.

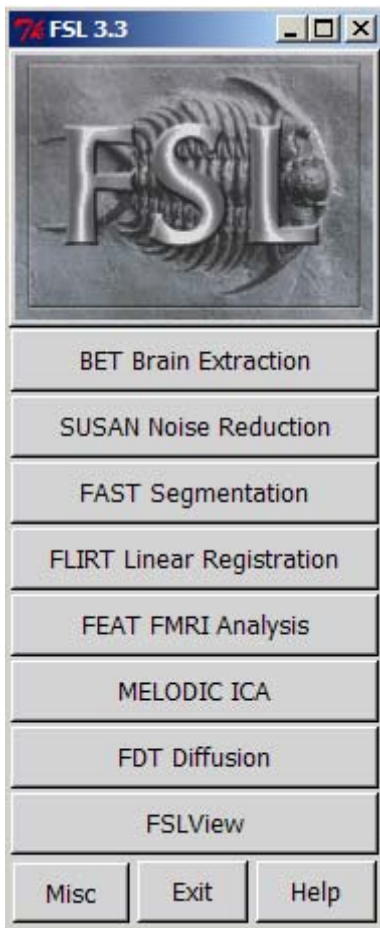


Figura 0.15 – GUI do FSL

7.2.2.1. BET – Brain Extraction Tool

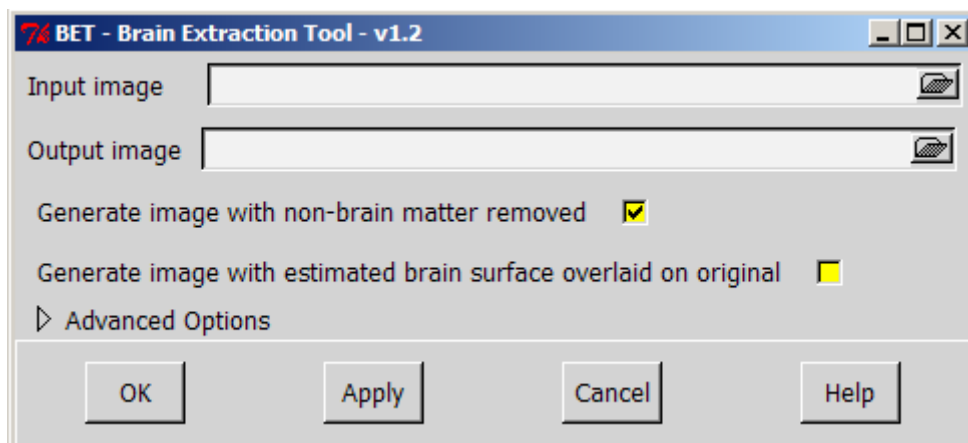


Figura 0.16 - GUI do BET

Para utilizar o BET, tal como documenta a figura 7.8, é necessário introduzir a imagem inicial bem como o destino da imagem final. As figuras seguintes traduzem as diferenças antes da aplicação do algoritmo (figura 7.9) e depois (figura 7.10).

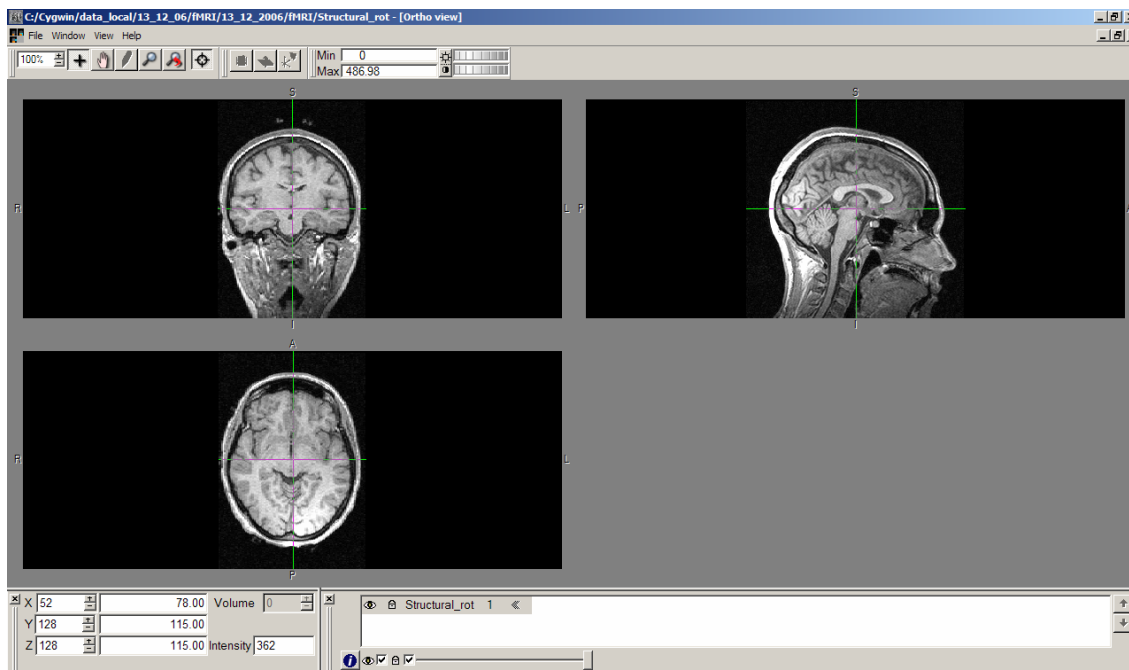


Figura 0.17 – Visualização (FSLview) do cérebro antes da aplicação do algoritmo presente no BET.

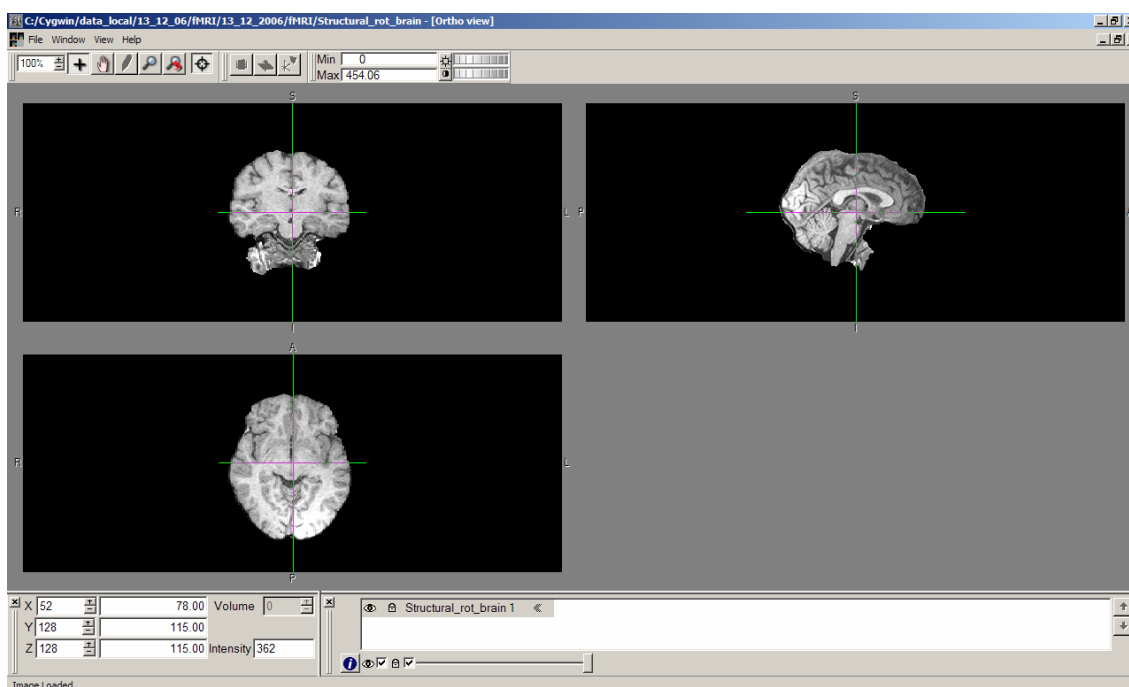


Figura 0.18 – Visualização (FSLview) do cérebro após a aplicação do algoritmo presente no BET.

Desta forma, obtém-se uma imagem que contém apenas tecido do cérebro humano e que será essencial para se poder efectuar o co-registo com os dados funcionais. Este passo é importante porque as imagens EPI, utilizadas para os estudos funcionais, são de baixa resolução espacial e muito sensíveis a distorções e cancelamento de sinal devido a in-homogeneidades do campo magnético que existem nas interfaces entre ar e tecidos. Assim, as regiões

exteriores ao cérebro em imagens funcionais têm desde logo tendência a desaparecer.

7.2.2.2. FEAT – fMRI Expert Analysis Tool

Os dados funcionais obtidos por fMRI são analisados através de um software que permite correlacioná-los com o modelo pretendido. A ferramenta FEAT, tal como o BET, também apresenta uma GUI.

De seguida são explicados os passos necessários para introduzir o modelo bem como a metodologia utilizada na análise dos dados. É de referir que o FEAT permite analisar cada sessão de dados individualmente – análise estatística de primeiro nível (*first-level analysis*) – e combinar os resultados obtidos, por exemplo quando se faz mais do que uma aquisição de dados – análise estatística de nível superior (*higher-level analysis*). Foram efectuados estes dois tipos de análise que são a seguir descritos em dois sub-capítulos distintos (“*first-level analysis*” e “*higher-level analysis*”).

First-Level Analysis

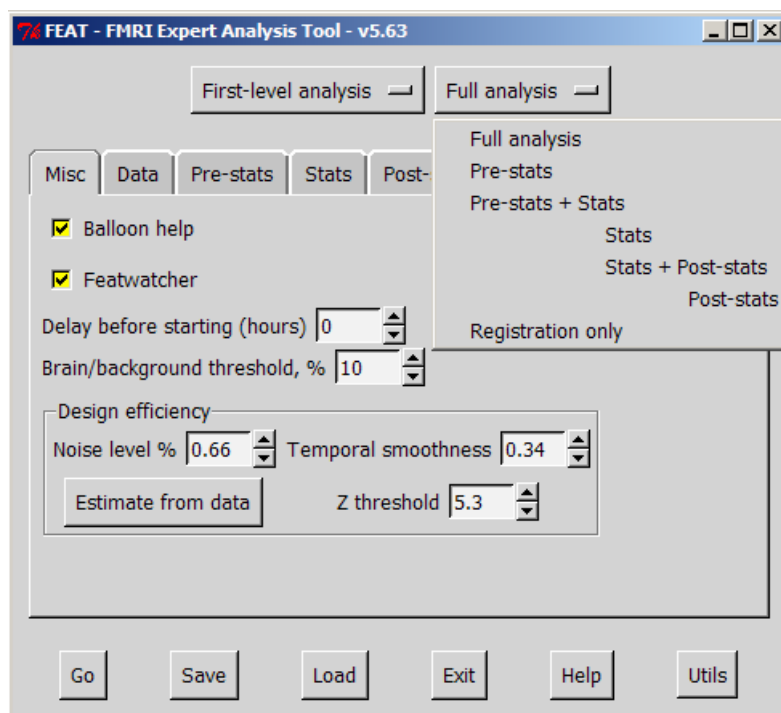


Figura 0.19 - GUI do FEAT.

Na figura 7.11 é possível verificar que uma análise estatística de primeiro-nível é composta por 4 etapas, podendo ser combinadas de forma sequencial. De referir que o separador “*Data*” está sempre presente independentemente da etapa.

Pre-stats + Registration

Numa primeira fase realizou-se uma análise *Pre-stats* e *Registration* aos dados obtidos. Desta forma, tal como documenta a figura 7.12, inserem-se os dados no separador “*Data*” bem como alguns parâmetros, tais como o número de volumes que queremos eliminar, o valor do TR e do filtro passa-alto.

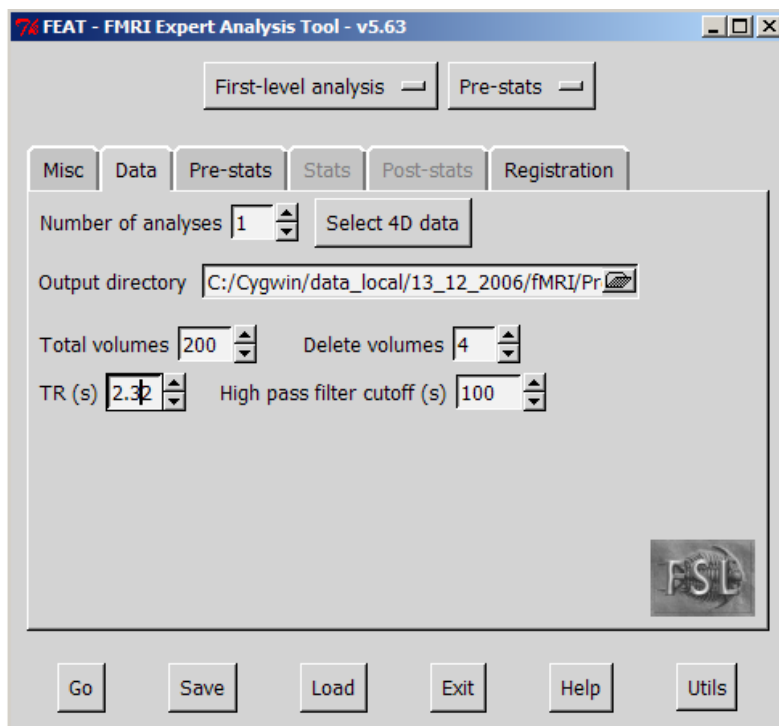


Figura 0.20 – GUI do FEAT – “Data”.

Neste estudo foram eliminados 4 volumes, isto porque quando são adquiridos os primeiros volumes com uma sequência de EPI o sinal não atinge automaticamente o equilíbrio. De referir ainda que após estes volumes serem eliminados todo o estudo posterior é feito sem os mesmos. O valor do TR tem de ser concordante com o utilizado na aquisição de dados que no caso concreto foi de 2.32 segundos.

O algoritmo presente no *Pre-stats* aplica correcção de movimentos (*Motion Correction*) reduzindo eventual ruído que possa aparecer quando o paciente mexe a cabeça durante a experiência, sendo designado por MCFLIRT

(*Motion Correction FMRIB's Linear Registration Tool*). De referir ainda que caso este movimento seja muito grande, normalmente superior a 1 mm, é aconselhável remover esses dados da análise pois a quantidade de ruído que possuem é muito grande.

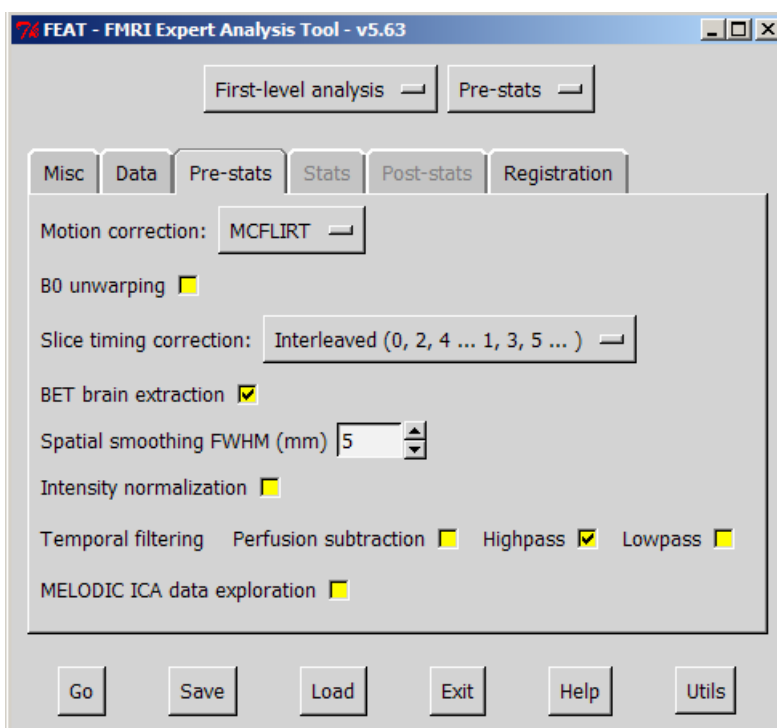


Figura 0.21 – GUI do FEAT – “Pre-stats”.

Para além de se efectuar correcção de movimento torna-se também necessário inserir o tipo de aquisição das *slices* efectuada pelo scanner. Tal como comprova a figura a aquisição foi ‘*Interleaved*’ tendo as *slices* sido adquiridas segundo a seguinte sequência – 0, 2, 4 ... 1, 3, 5 ...).

No separador “*Registration*” é possível fazer o co-registo dos dados funcionais com diferentes imagens estruturais. O algoritmo presente é baseado no FLIRT (*FMRIB's Linear Image Registration Tool*) e permite co-registar imagens do mesmo (intra-modais) ou de diferentes tipos (inter-modais). Este co-registo é feito em duas etapas. Primeiro é feito o co-registo dos dados funcionais de baixa resolução com a imagem estrutural de alta resolução, identificada na figura 7.14 por “*Main structural image*”. De referir que esta imagem não deve possuir tecido não-cerebral, objectivo já previamente conseguido quando se efectuou o BET. Este resultado por sua vez irá ser co-registado com a imagem presente no “*Standard space*”, que é uma imagem de

referência utilizada na comunidade de imagiologia e que é fornecida pelo software.

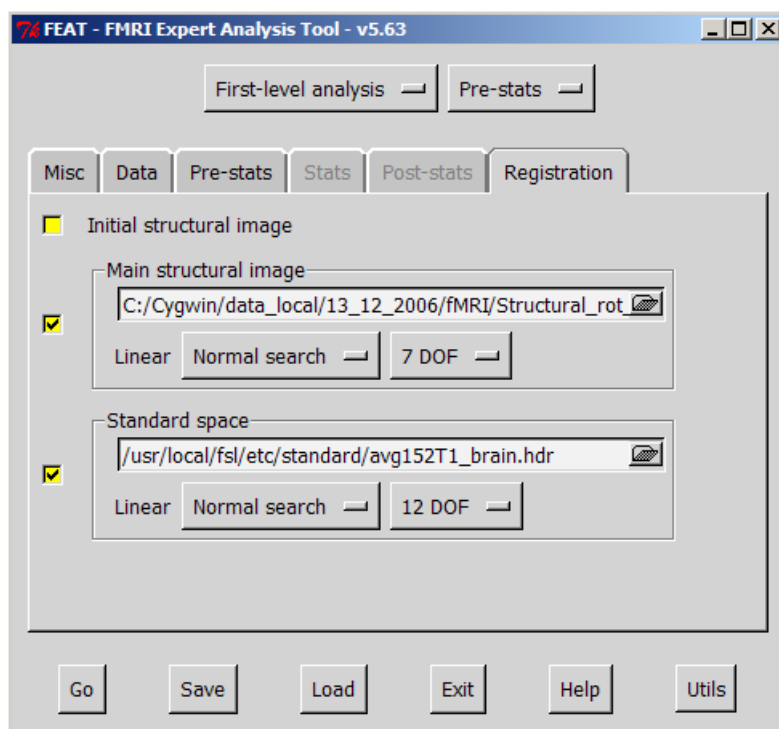


Figura 0.22 – GUI do FEAT – “Registration”

Como resultado da aplicação do algoritmo da correcção de movimento, MCFLIRT, obtém-se, neste caso, uma matriz 196×6 com os valores referentes a cada movimento da cabeça do paciente, sendo que as três primeiras colunas correspondem a translações segundo os eixos x , y e z enquanto que as últimas colunas correspondem a rotações segundo estes eixos.

Utilizando o Matlab (figura 7.15) podemos verificar quais são esses valores e criar um novo ficheiro de texto que poderá ser utilizado como regressor na aplicação estatística posteriormente.

```

>> size(MotionCorrectionParameters)

ans =

    196     6

>> MotionCorrectionParameters

MotionCorrectionParameters =

    0.0051    0.0052    0.0000   -0.1616   -0.2932    0.1489
    0.0056    0.0052   -0.0003   -0.1528   -0.3056    0.1154
    0.0054    0.0052   -0.0002   -0.1821   -0.2659    0.1380
    0.0061    0.0052    0.0003   -0.1659   -0.2781    0.1190
    0.0053    0.0051   -0.0002   -0.1759   -0.2614    0.1344
    0.0064    0.0052    0.0002   -0.1847   -0.2925    0.1654
    0.0061    0.0057   -0.0002   -0.1600   -0.2865    0.1532
    0.0056    0.0052   -0.0003   -0.1688   -0.2586    0.1472
    0.0064    0.0048    0.0001   -0.1455   -0.2813    0.0825
    0.0051    0.0043   -0.0003   -0.1729   -0.2357    0.1486
    0.0054    0.0043   -0.0005   -0.1507   -0.2356    0.0034
    0.0046    0.0043   -0.0013   -0.1775   -0.2162    0.1693
    0.0053    0.0045   -0.0012   -0.1654   -0.2484    0.1570

>> MotionCorrection_Regressor_1

MotionCorrection_Regressor_1 =

    2.3200    2.3200    0.0051
    4.6400    2.3200    0.0056
    6.9600    2.3200    0.0054
    9.2800    2.3200    0.0061
   11.6000    2.3200    0.0053
   13.9200    2.3200    0.0064
   16.2400    2.3200    0.0061
   18.5600    2.3200    0.0056
   20.8800    2.3200    0.0064
   23.2000    2.3200    0.0051
   25.5200    2.3200    0.0054
   27.8400    2.3200    0.0046
   30.1600    2.3200    0.0053
   32.4800    2.3200    0.0049
   34.8000    2.3200    0.0051

```

Figura 0.23 – Tamanho e Parâmetros da matriz elaborada por MC; Estrutura do regressor.

A figura 7.15 apresenta parte do regressor utilizado correspondente à translação da cabeça ao longo do eixo dos x . Tal como o regressor elaborado para as pontas epiléticas, este é composto por 3 colunas e 196 linhas. Desta forma, o primeiro valor da coluna 3 do “MotionCorrection_Regressor_1” irá

corresponder ao primeiro valor da coluna 1 do “MotionCorrectionParameters”, o segundo valor da coluna 3 ao segundo da coluna 1 e assim sucessivamente.

É ainda de referir que foram elaborados três regressores sendo um para cada eixo x , y e z .

- *Stats + Post-stats*

Numa segunda fase efectuou-se o estudo *Stats* e *Pos-Stats* com particular interesse na alteração do valor do *lag* da resposta hemodinâmica que irá ter os seguintes valores: 3, 6 e 9 segundos.

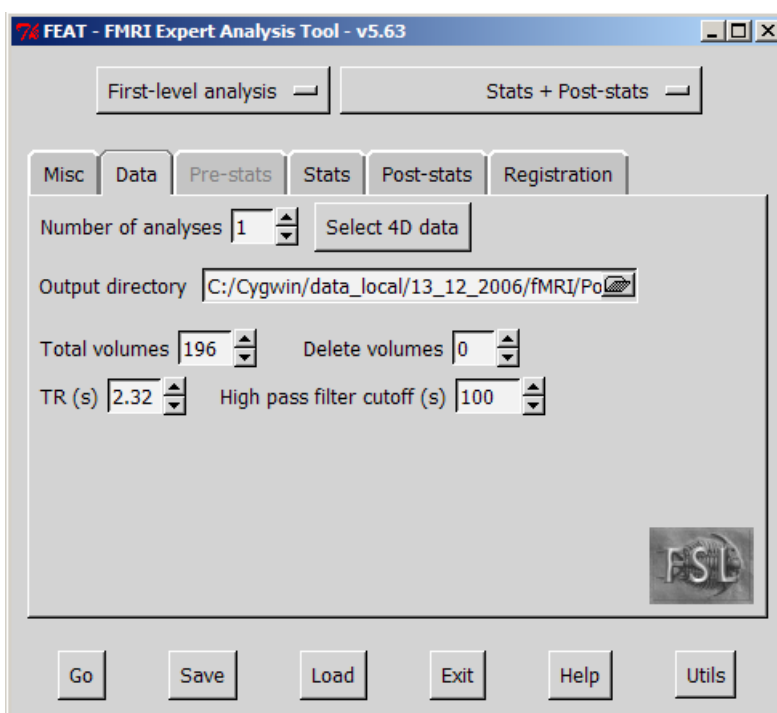


Figura 0.24 – GUI do FEAT – “Data”.

Tal como na fase anterior é feito inicialmente um *load* dos dados a analisar sendo este método aplicado para cada um dos 6 *datasets*. É ainda de referir que foi feito o *load* dos dados já analisados na primeira fase e verificamos por isso a inclusão de apenas 196 volumes, sendo que os primeiros quatro já tinham sido eliminados, tal como atrás descrito (figura 7.16).

No separador “*Stats*” podemos então definir o modelo linear geral descrevendo assim um ou mais tipos de estímulos e contrastes. Para modelos

complexos, tais como os utilizados neste estudo, deve-se utilizar a opção “*Full model setup*” (figura 7.17).

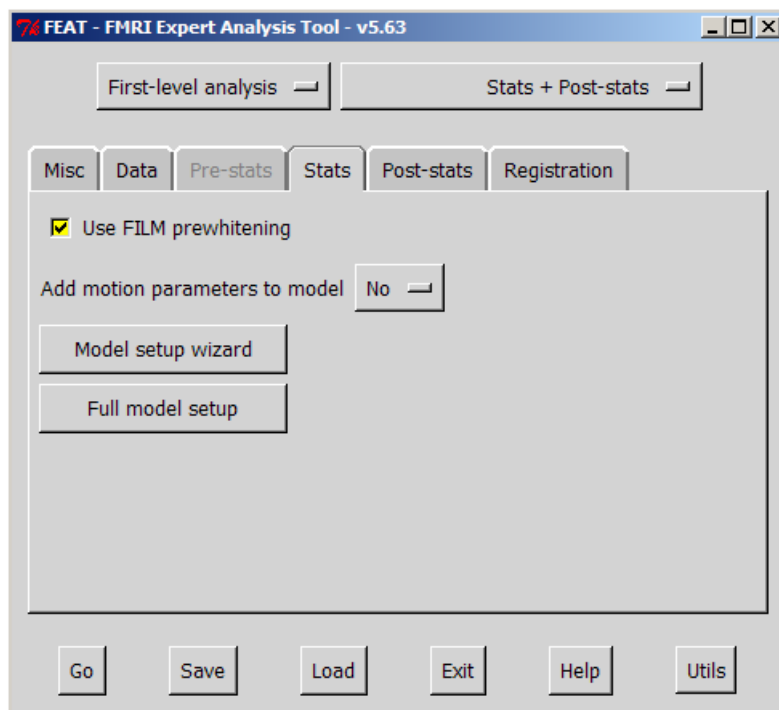


Figura 0.25 – GUI do FEAT – “Stats”.

São então adicionados quatro eventos já na forma de regressores de três colunas específico do FSL. No caso ilustrado o evento um identifica o regressor das pontas epiléticas para o primeiro *dataset* e que foi construído em ambiente Matlab (passo explicado no capítulo XXX). Já os eventos 2, 3 e 4 correspondem aos regressores construídos também em ambiente Matlab e que possuem a informação do algoritmo do *Motion Correction*.

A opção “Convolution” presente na formação do GLM permite escolher a forma de convolução da função da resposta hemodinâmica (HRF) aplicada. Este passo vai fazer com que a forma original da onda, i.e. da onda caracterizadora do estímulo, apresente um atraso e *blur*. Desta forma, é possível passar da função entrada (actividade neuronal) para a função de saída (resposta hemodinâmica medida nos dados de fMRI). Para os 6 *datasets* a convolução foi feita utilizando a função *gamma*.

De salientar os diferentes atrasos (*lag*) utilizados de 3, 6 e 9 segundos correspondendo a um atraso no pico das funções gama após uma ponta epilética. Ao usarmos múltiplas HRF será de esperar um aumento na

percentagem de *datasets* com activações significantes nos dados de fMRI (Bagshaw et al., 2004). Ao estarmos próximos da HRF que melhor corresponde à actual resposta BOLD, o valor Z de estimação de um determinado *cluster* irá aumentar, reflectindo a maior correlação entre dados e modelo.

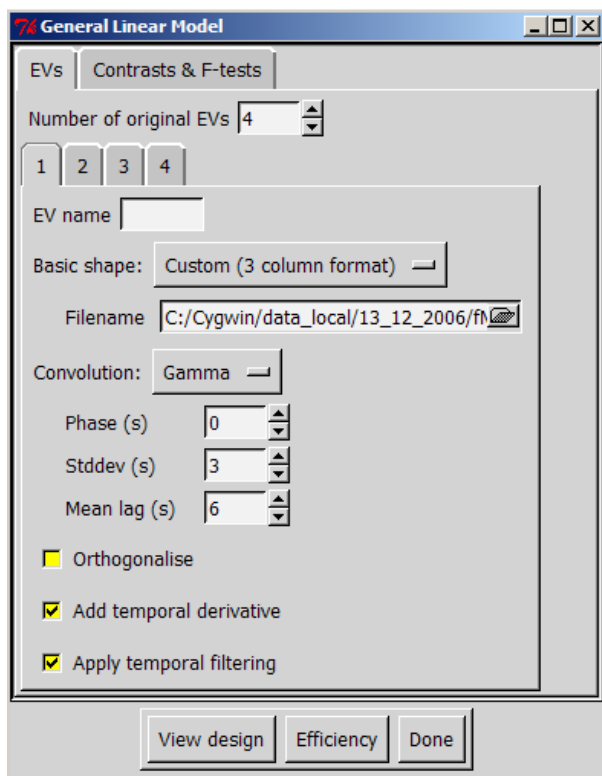


Figura 0.26 – General Linear Model – “Events”.

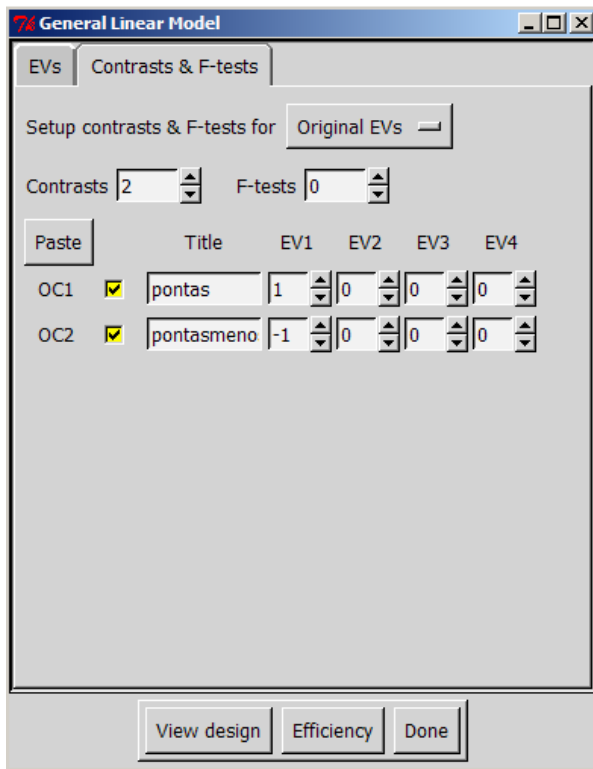


Figura 0.27 – General Linear Model – “Contrasts & F-tests”.

No separador “Contrasts & F-tests” foi introduzida a informação dos tipos de contraste a efectuar e do número. Neste estudo foram efectuados dois contrastes: um para evidenciar as activações positivas das pontas epilépticas (EV 1) ignorando as activações produzidas pelo movimento da cabeça do paciente (EV 2, 3 e 4) e o outro para identificar as activações negativas produzidas pelas pontas epilépticas.

A figura seguinte (figura 7.20) traduz o modelo aplicado em forma de gráfico produzido pelo FSL ao se ‘clique’ no botão “*View design*”.

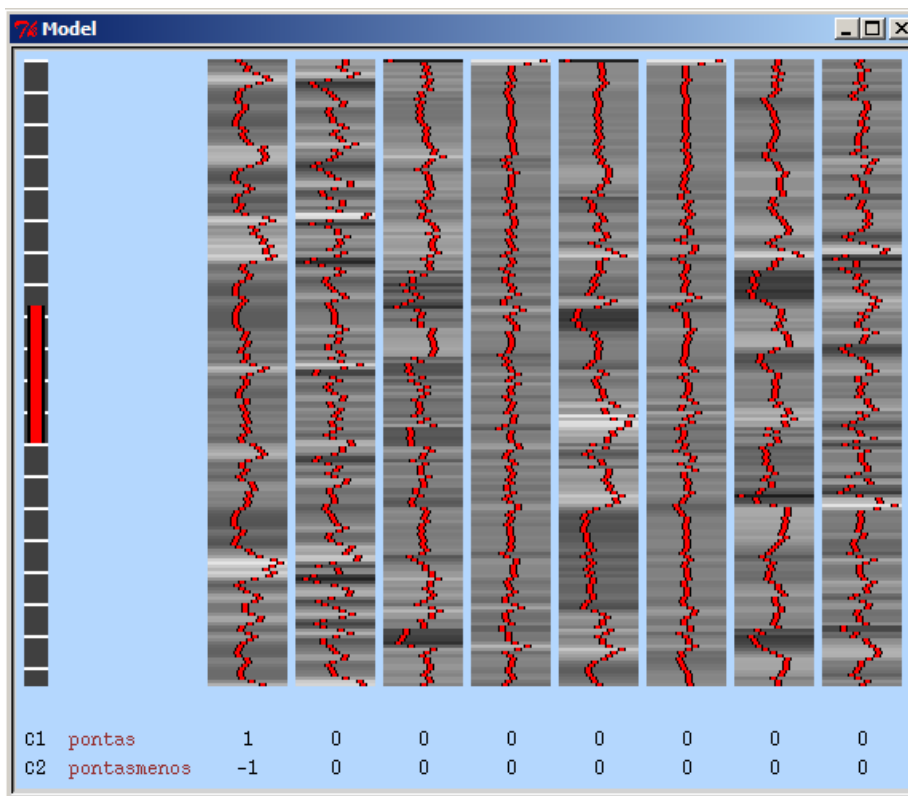


Figura 0.28 – Modelo dos regressores e dos contrastes utilizados.

A barra da esquerda representa o tempo, que começa no topo. A cada dez volumes no tempo é apresentada uma barra branca. Tanto as linhas vermelhas como a imagem que se encontra por baixo, a preto e branco, representam o mesmo – a forma do estímulo.

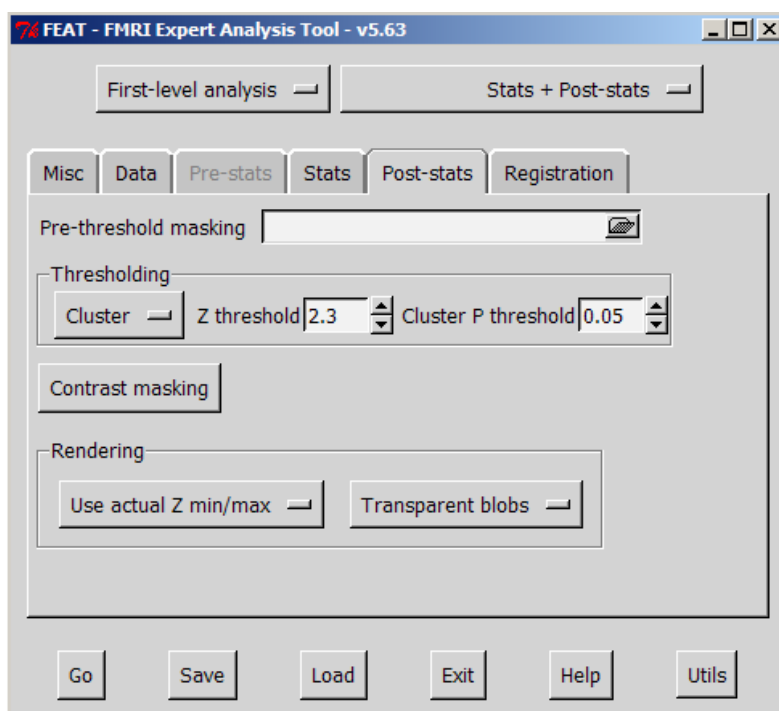


Figura 0.29 – GUI do FEAT – “Post-stats”

No separador “*Post-stats*” é escolhido um limiar estatístico Z para definir *clusters* contíguos. Depois cada nível de significância estimado de um *cluster* é comparado com o limiar de probabilidade (“*cluster P threshold*”). Neste estudo o limiar de probabilidade utilizado foi de 0.05. *Clusters* significantes são depois utilizados como máscara sobre a imagem estatística Z inicial.

O resultado da análise é apresentada numa página html onde são incluídas activações na imagem, através de cores, bem como uma representação gráfica das *time-courses* dos dados vs modelo. Para além de incluir as zonas activadas no cérebro no relatório em página html, o FEAT gera séries temporais (*time-series*) para os dados vs modelo do voxel com mais significância no contraste utilizado. Numa análise mais profunda é possível obter a localização exacta desse mesmo voxel bem como uma análise semelhante para a média dos voxels.

Higher-Level Analysis

De seguida é mostrada a metodologia da análise estatística de alto nível. Foram efectuadas 3 análises sendo que cada uma combina as 6 análises estatísticas de primeiro nível para um determinado *Mean Lag*. Desta forma iremos obter uma análise estatística de alto para um *Mean Lag* da HRF de 3, 6 e 9.

Tal como comprova a figura seguinte ao ser efectuado uma análise de alto nível apenas se encontram disponíveis as opções “Stats” e “Post-stats” que no entanto diferem das anteriormente descritas

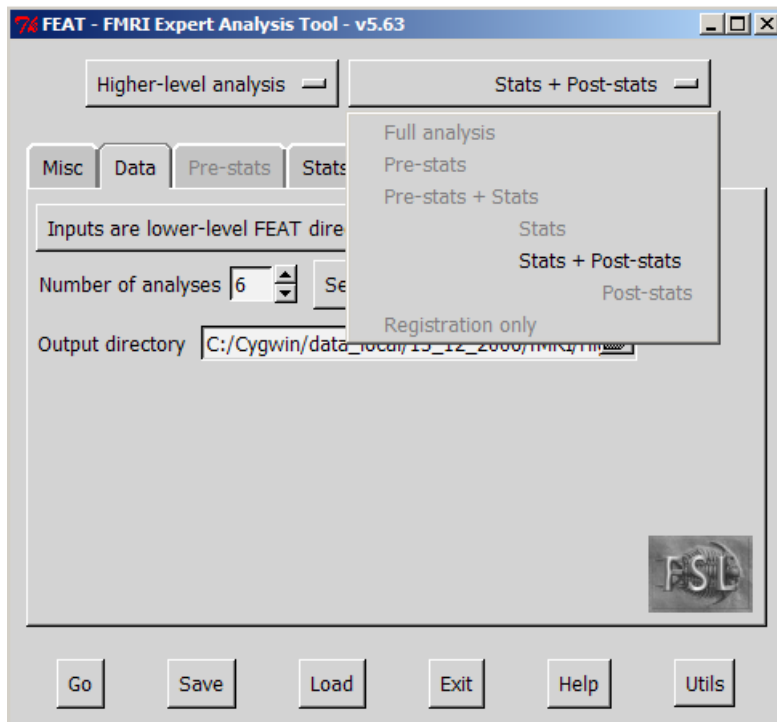


Figura 0.30 – GUI do FEAT

No separador “*Data*” introduzimos o local onde está gravado a análise estatística de primeiro nível efectuado para os 6 diferentes *datasets* (“*Number of analysis*”) com um determinado *Mean Lag* (figura 7.23 “Select FEAT directories”).

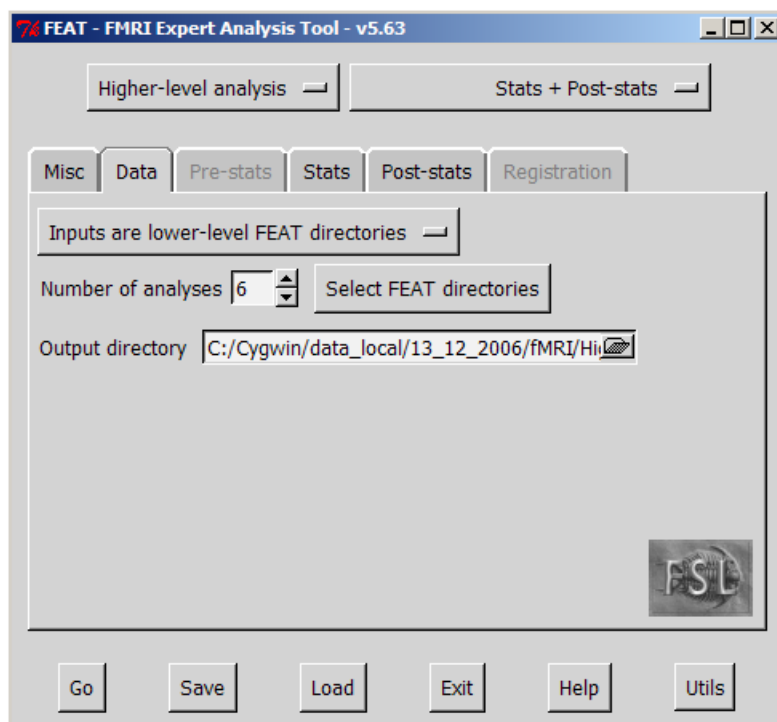


Figura 0.31 – GUI do FEAT – “Data”

8. Resultados

Neste capítulo irão ser apresentados os resultados obtidos em alguns *datasets*, nomeadamente o *dataset 1* e o *dataset 2*, após se efectuar uma análise estatística de primeiro nível. A apresentação destes dois *datasets* prende-se com o facto de serem os que têm maior número de pontas epilépticas registadas durante a aquisição.

De seguida irão ser mostrados os 3 resultados obtidos na análise estatística de alto nível (ou segundo nível dependendo do software analisado para fazer a análise), cada um correspondendo ao *mean lag* utilizado para cada uma das HRF.

8.1. *Análise Estatística de Primeiro Nível (First-Level Analysis)*

Dataset 1

Lag da HRF – 3 segundos

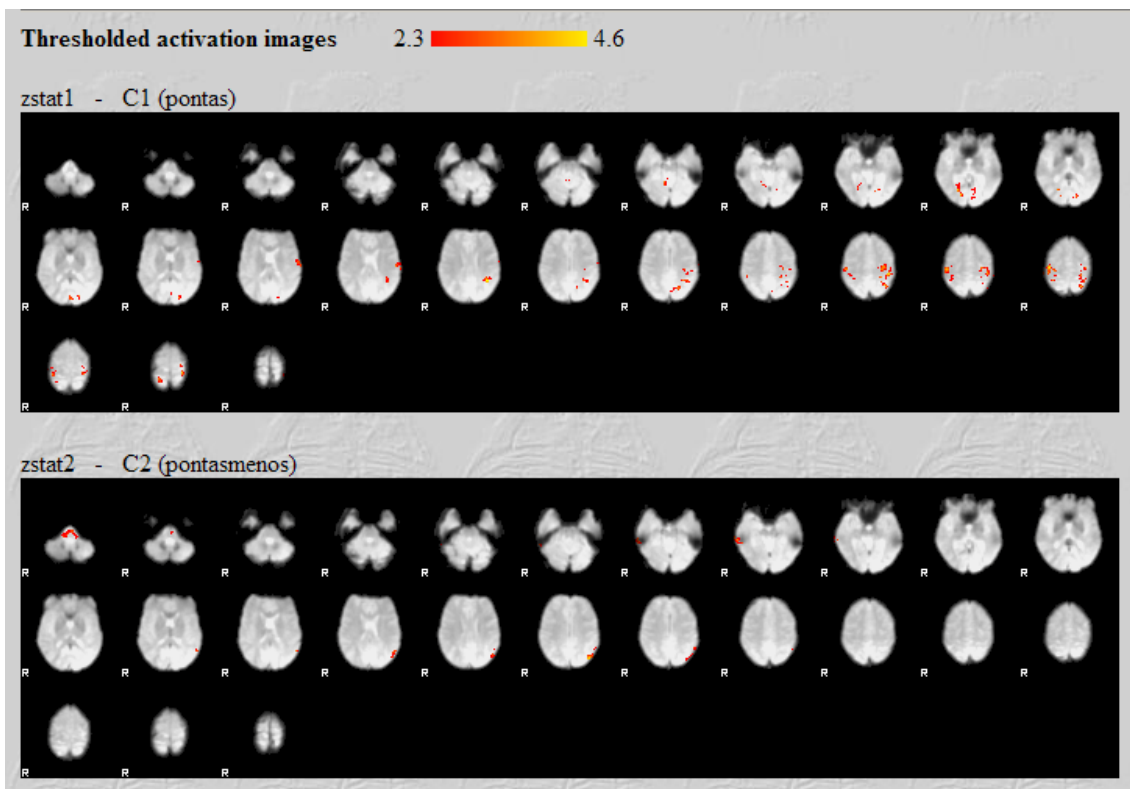


Figura 0.32 – Mapa das ativações (C1 – contraste ativações positivas; C2 – contraste ativações negativas)

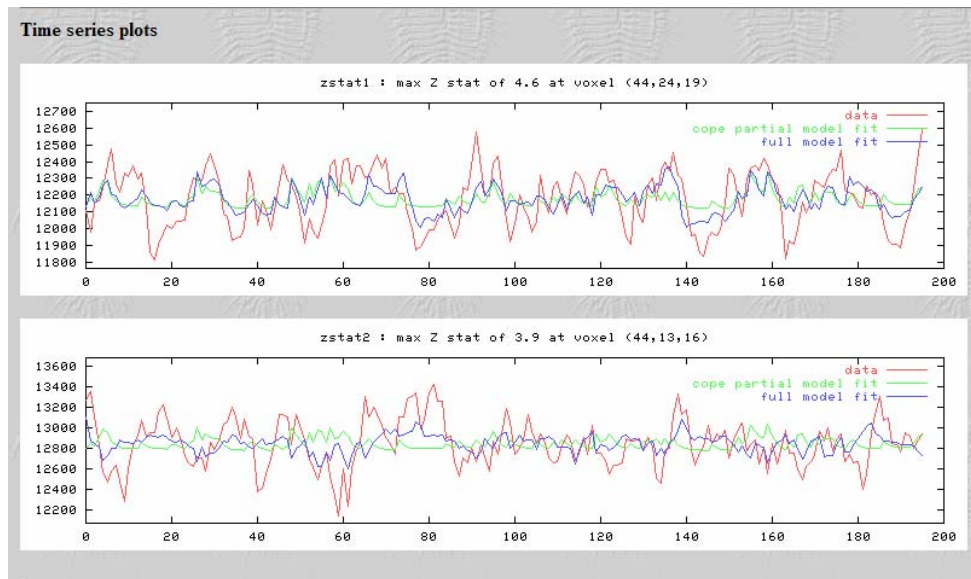


Gráfico 0.7 – Representação gráfica das time-courses dos dados vs modelo.

Lag da HRF – 6 segundos

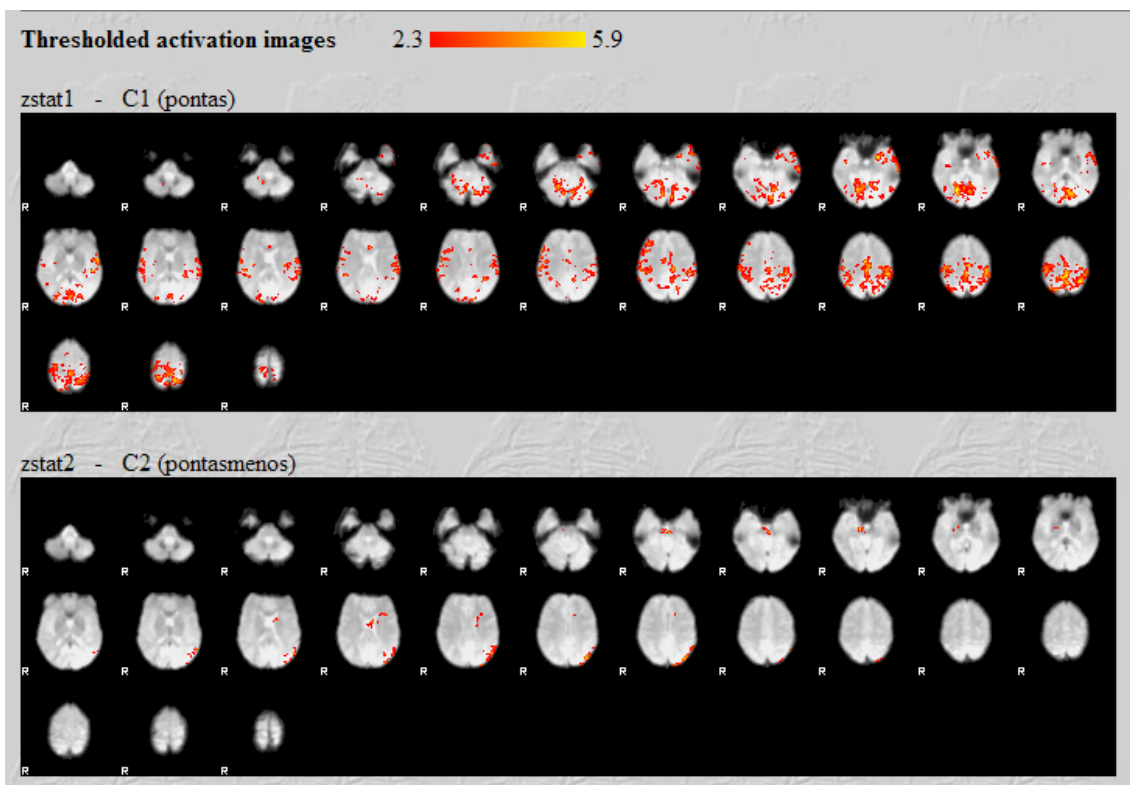


Figura 0.33 - Mapa das activações (C1 – contraste activações positivas; C2 – contraste activações negativas)

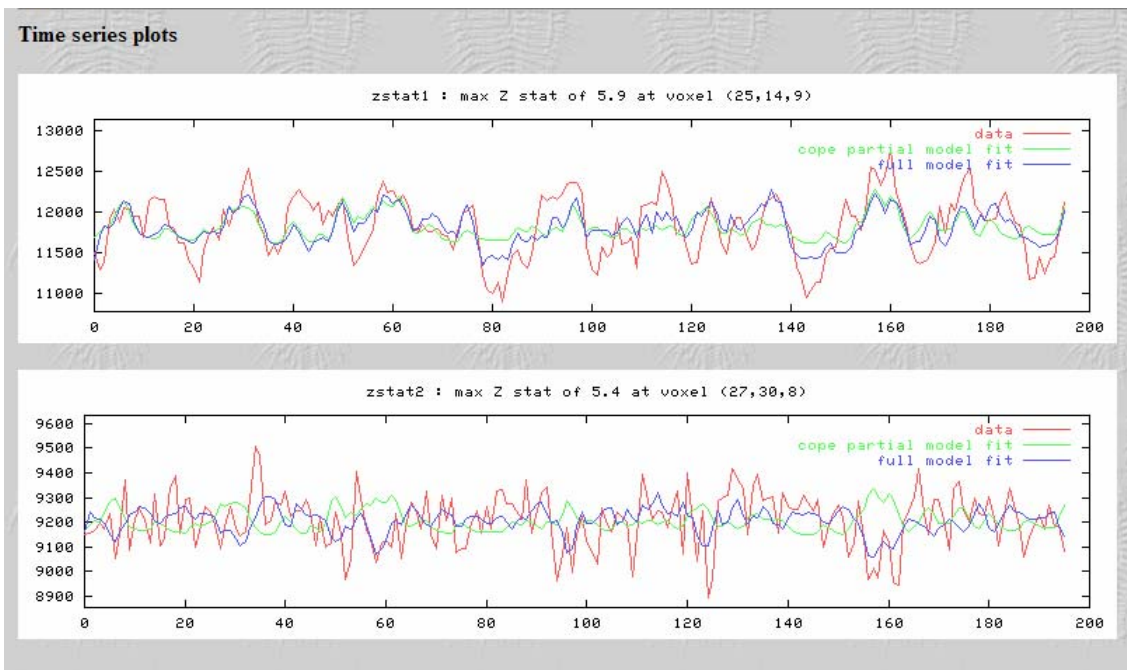


Gráfico 0.8 - Representação gráfica das time-courses dos dados vs modelo.

Lag da HRF – 9 segundos

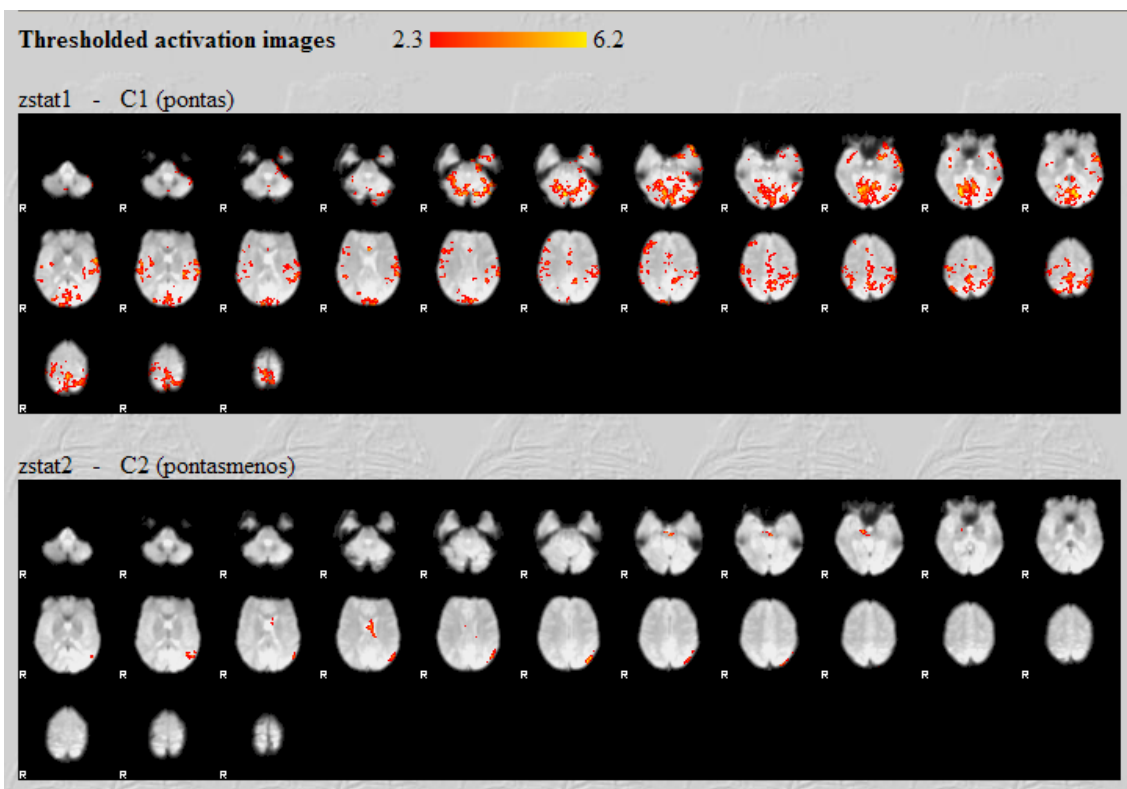


Figura 0.34 - Mapa das activações (C1 – contraste activações positivas; C2 – contraste activações negativas).

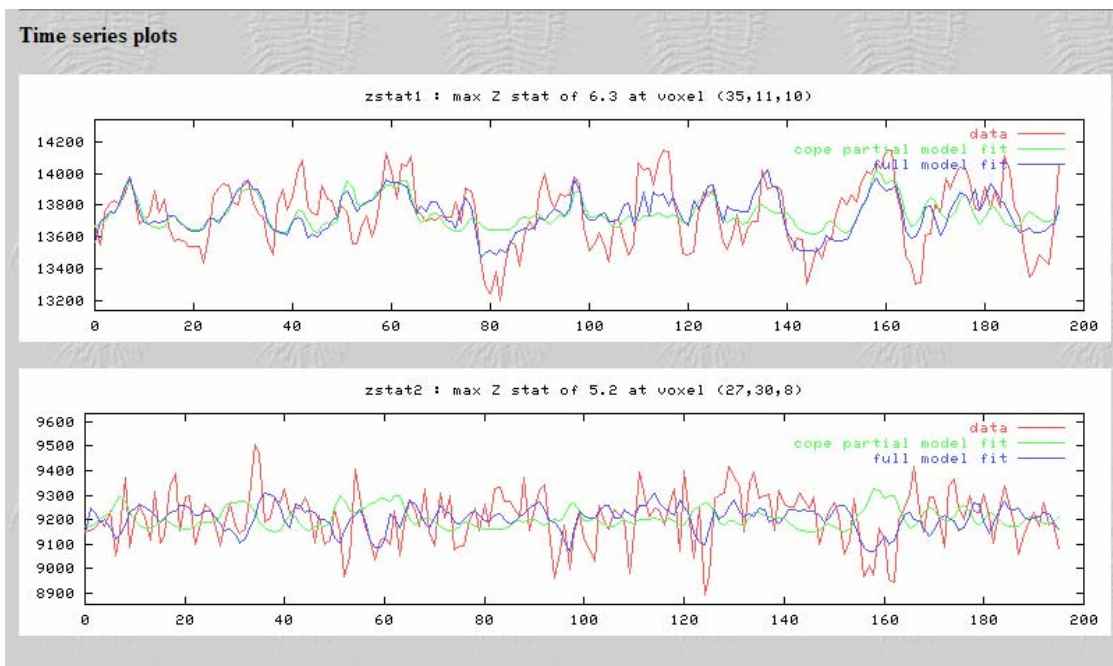


Gráfico 0.9 - Representação gráfica das time-courses dos dados vs modelo.

Dataset 4

Lag da HRF – 3 segundos

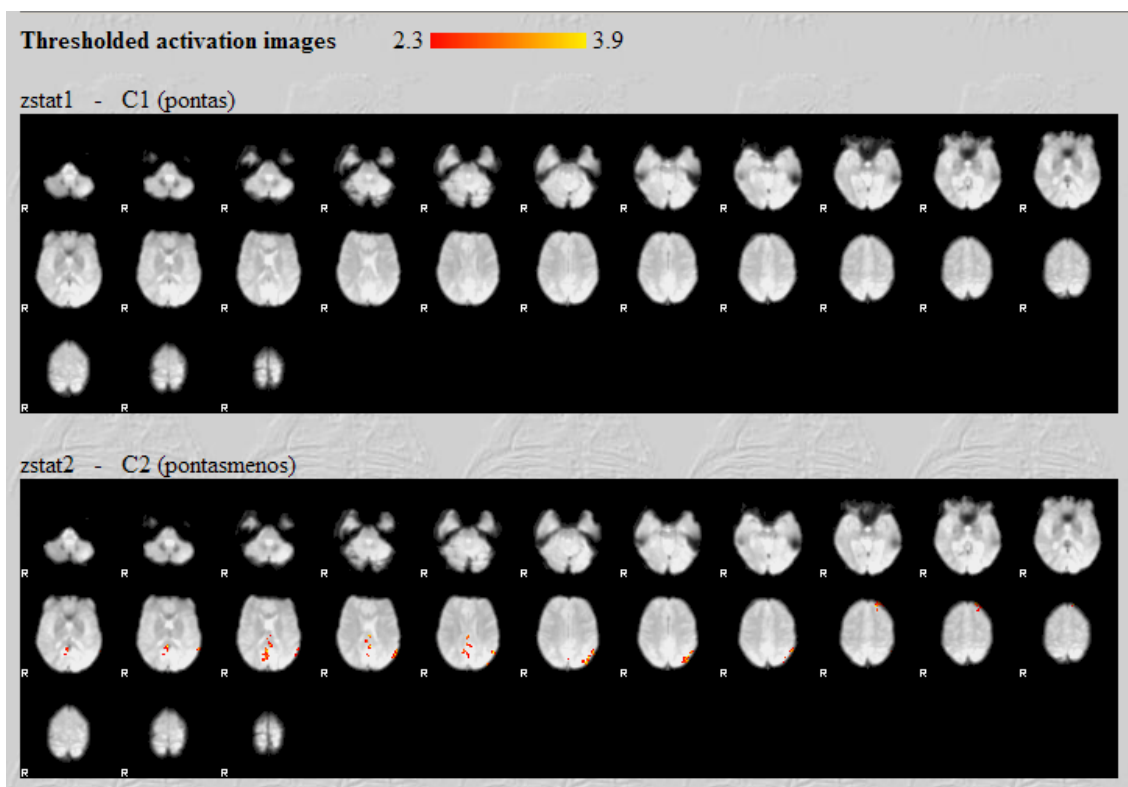


Figura 0.35 - Mapa das activações (C1 – contraste activações positivas; C2 – contraste activações negativas).

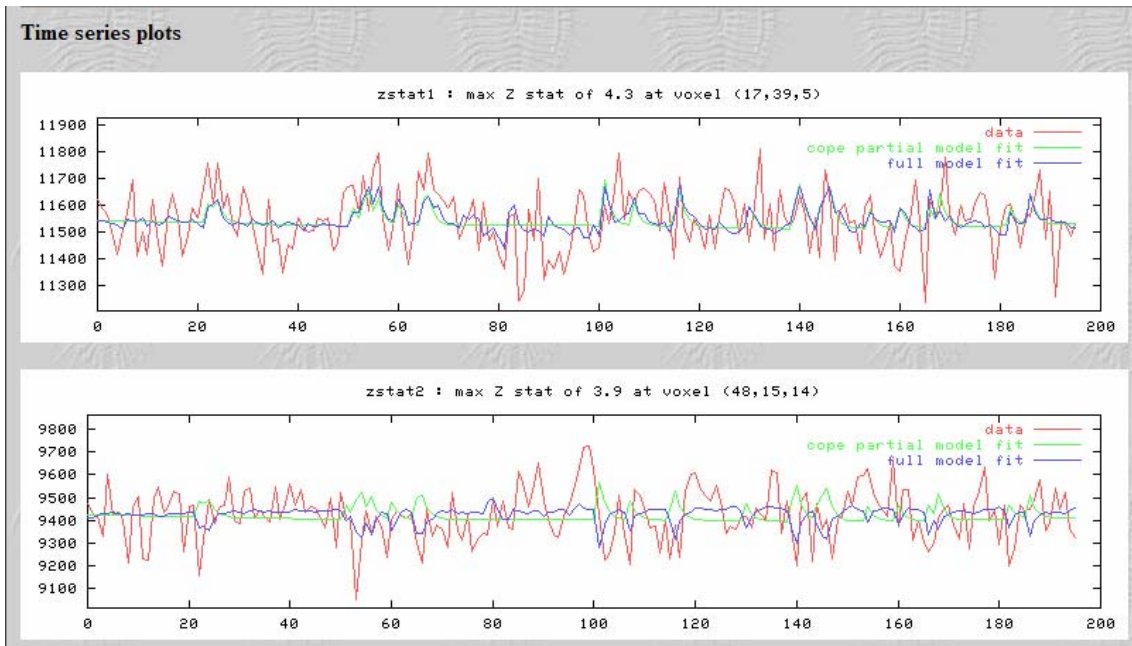


Gráfico 0.10 - Representação gráfica das time-courses dos dados vs modelo.

Lag da HRF – 6 segundos

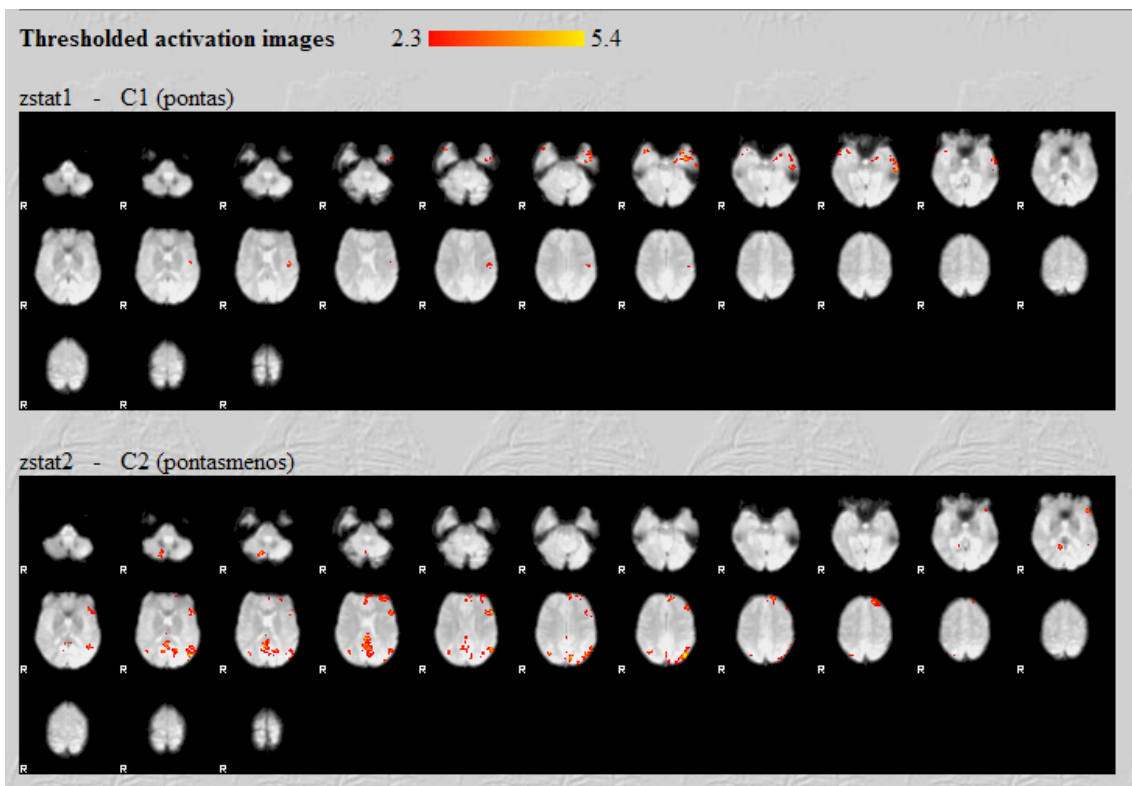


Figura 0.36 - Mapa das activações (C1 – contraste activações positivas; C2 – contraste activações negativas).

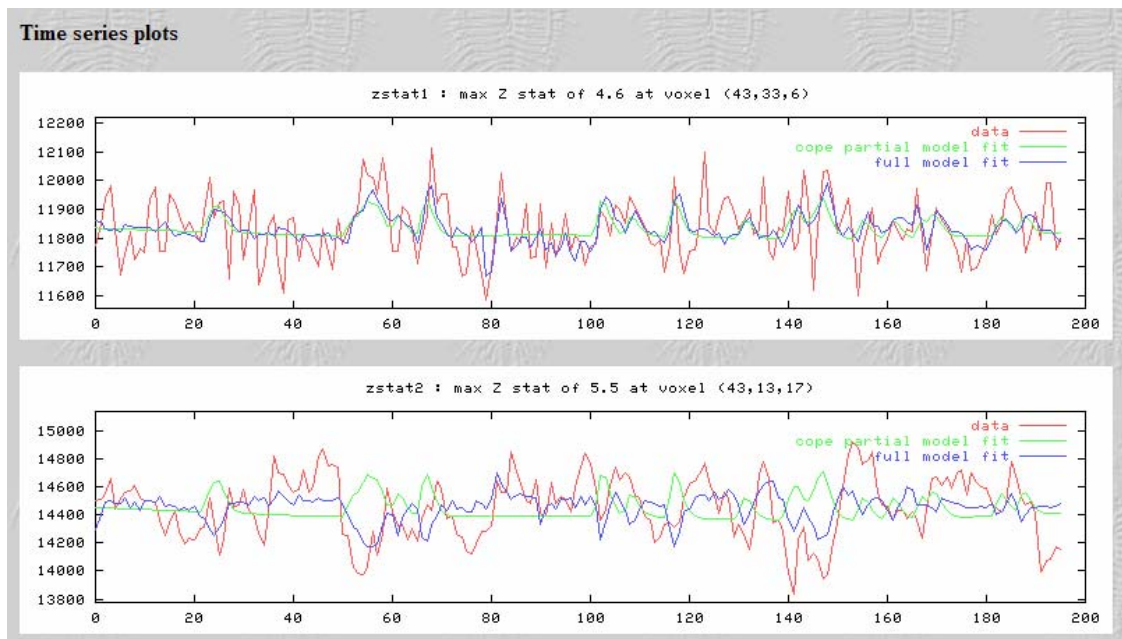


Gráfico 0.11 - Representação gráfica das time-courses dos dados vs modelo.

Lag da HRF – 9 segundos

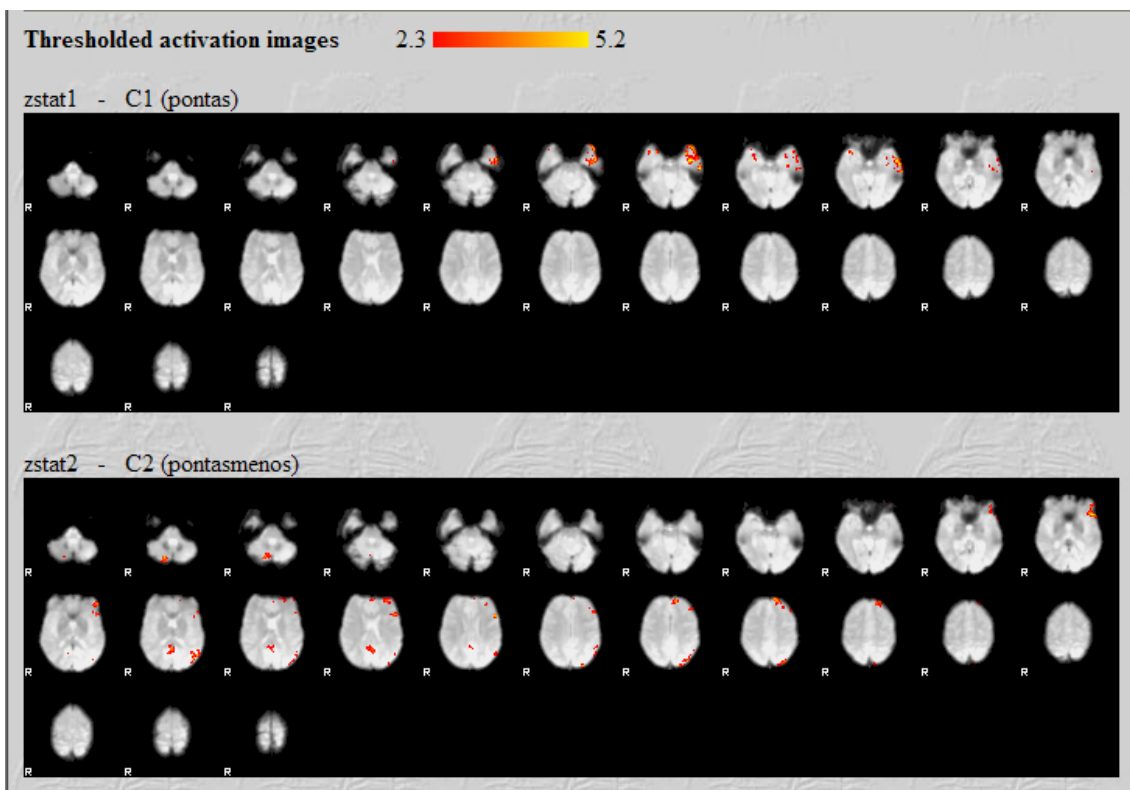


Figura 0.37 - Mapa das ativações (C1 – contraste ativações positivas; C2 – contraste ativações negativas).

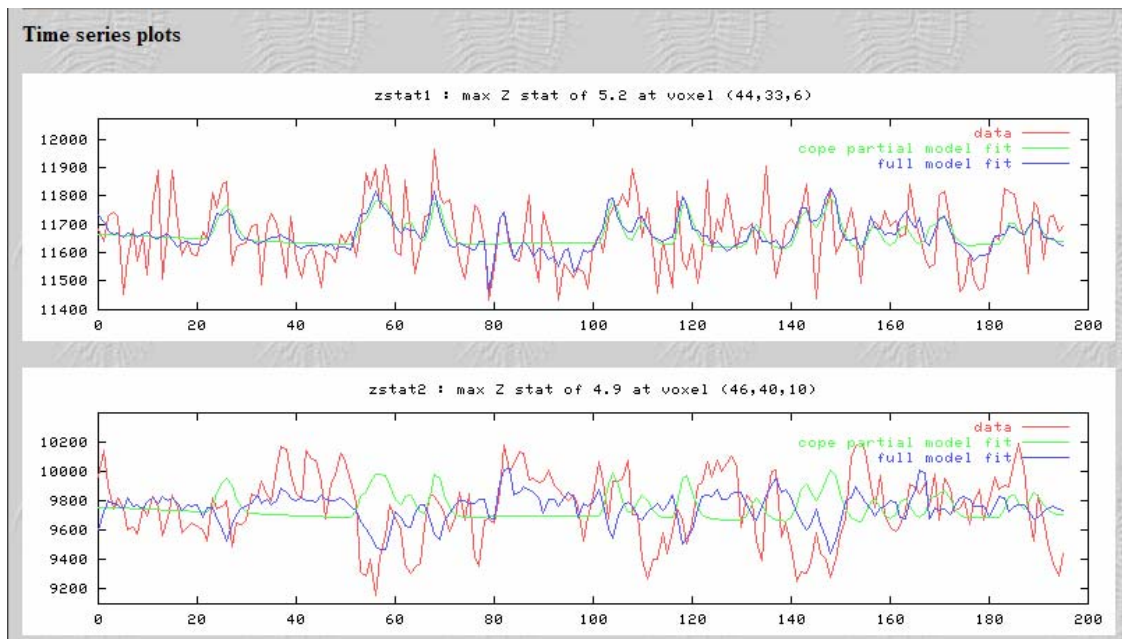


Gráfico 0.12 - Representação gráfica das time-courses dos dados vs modelo.

8.2. *Análise Estatística de Alto Nível (Higher-Level Analysis)*

Lag da HRF – 3 segundos

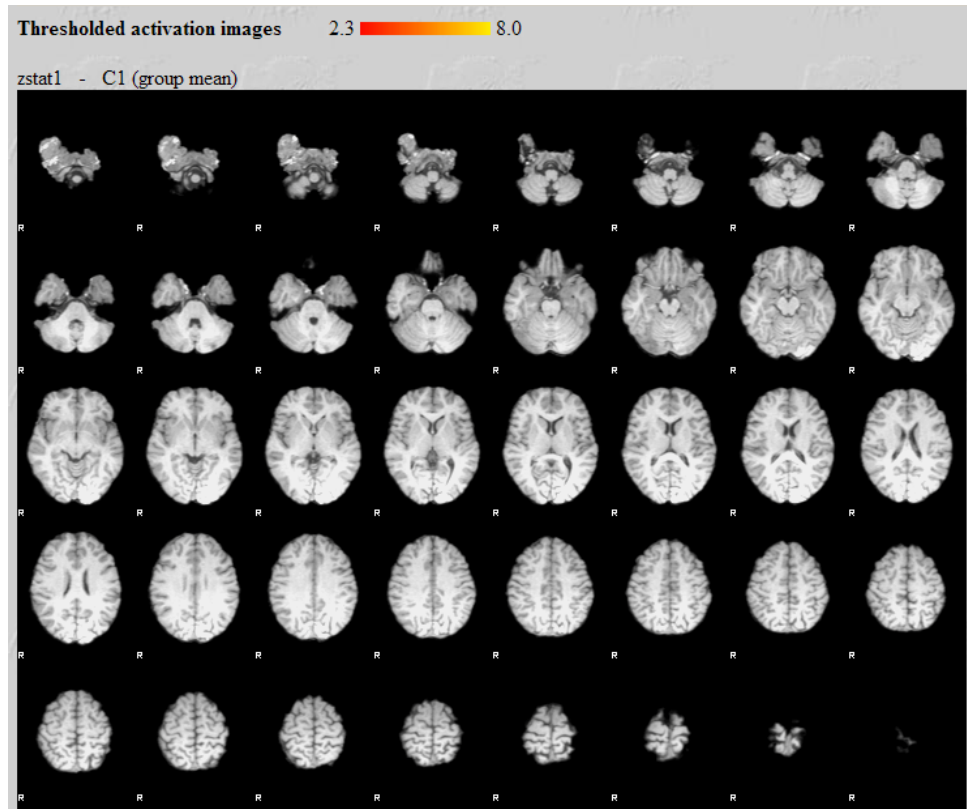


Figura 0.38 – Mapa das activaões positivas de todos os *datasets*.

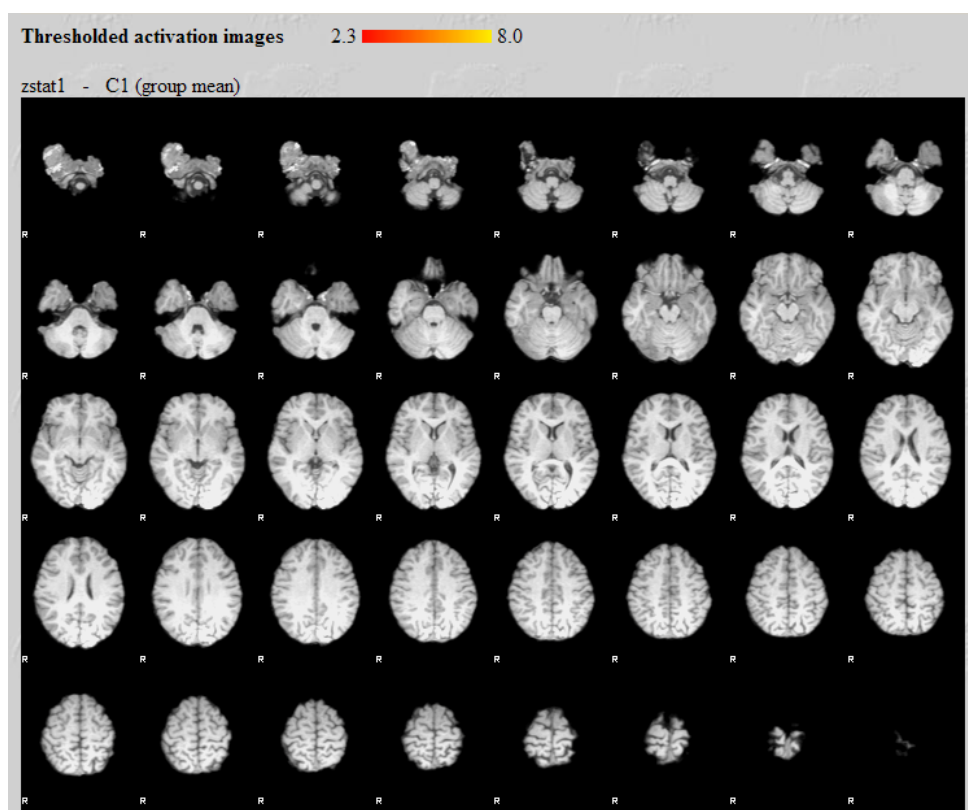


Figura 0.39 - Mapa das activações negativas de todos os *datasets*.

Lag da HRF – 6 segundos

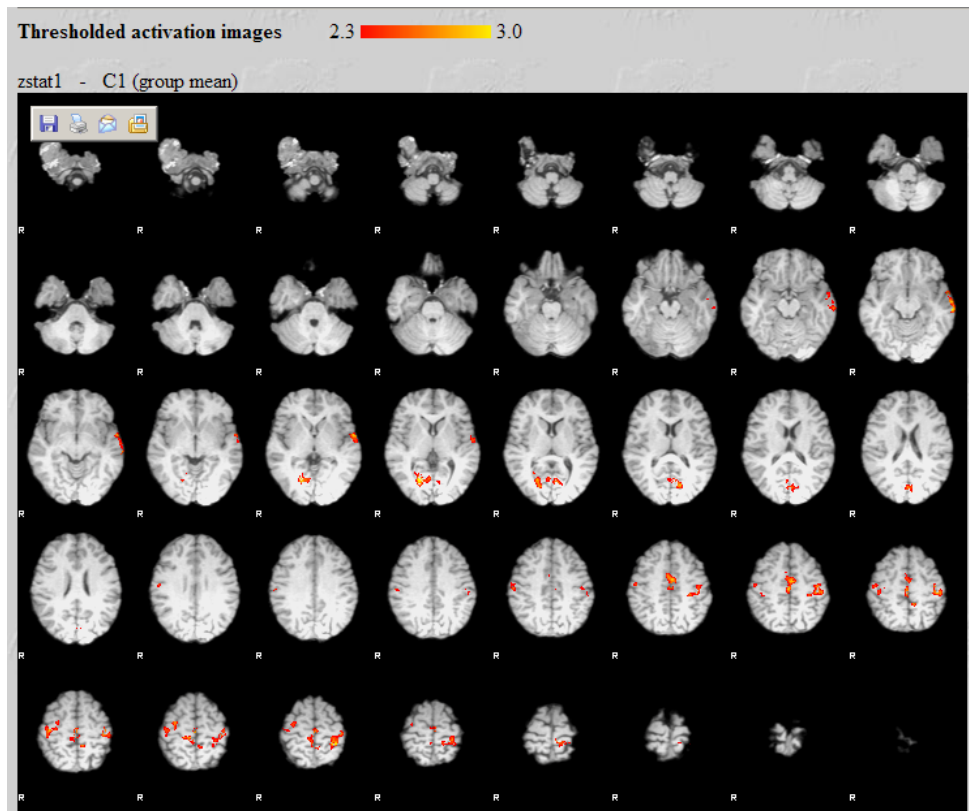


Figura 0.40 - Mapa das activações positivas de todos os *datasets*.

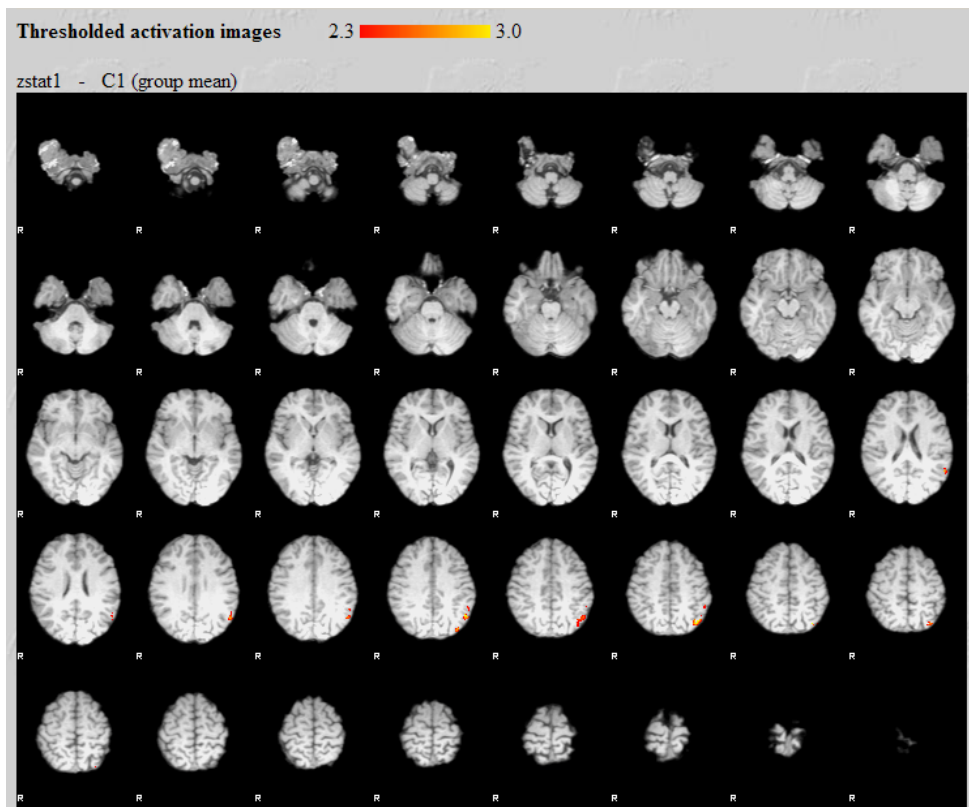


Figura 0.41 - Mapa das activações negativas de todos os *datasets*.

Lag da HRF – 9 segundos

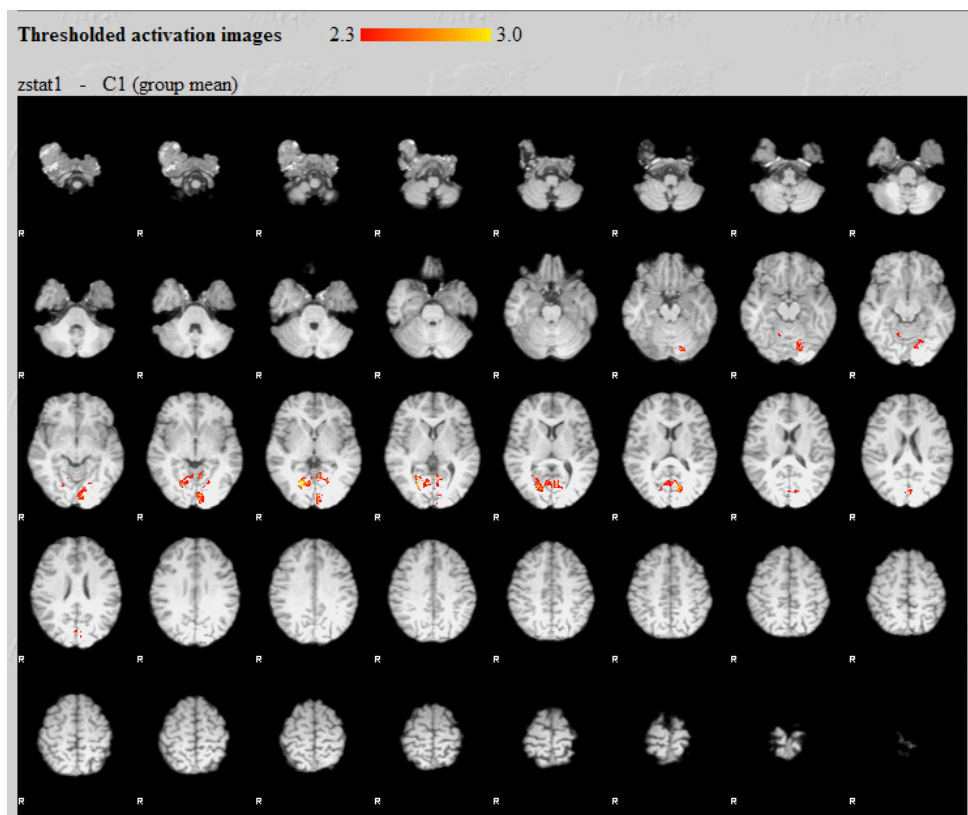


Figura 0.42 - Mapa das activações positivas de todos os *datasets*.

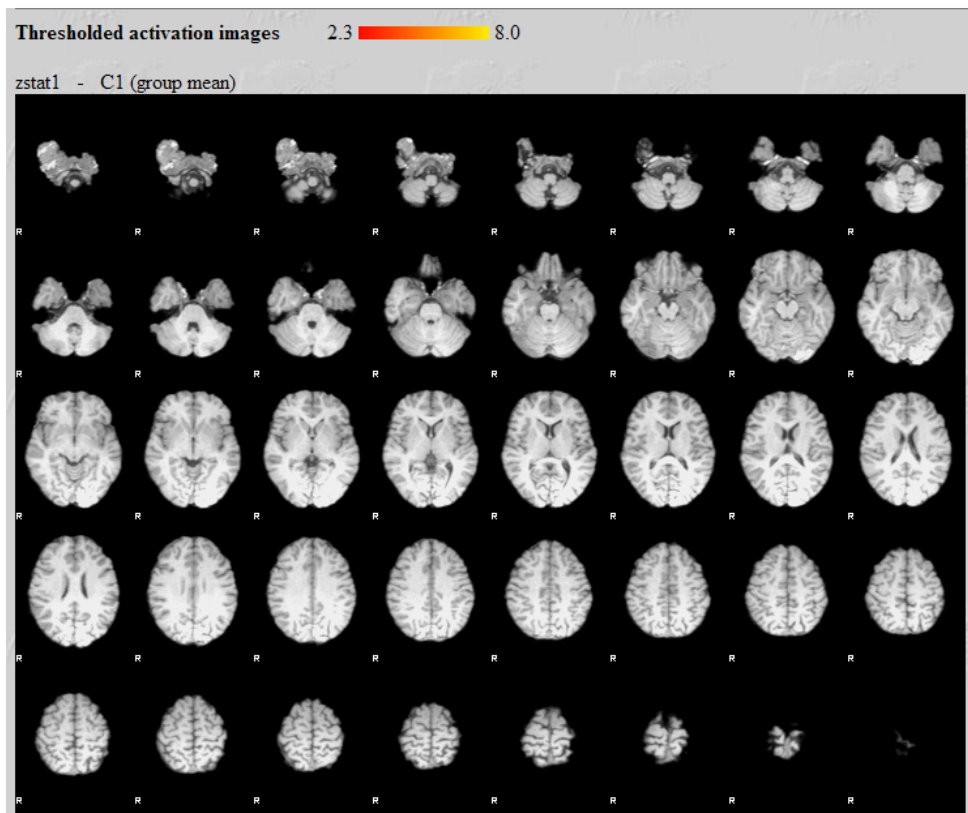


Figura 0.43 - Mapa das activações negativas de todos os *datasets*.

9. Discussão & Conclusão

Embora o papel de examinar sobre quais as áreas do cérebro principalmente activadas, face ao resultados obtidos, bem como o de avaliar a situação do paciente pertença ao médico neurologista, pode-se concluir que o paciente em estudo apresenta algumas zonas activadas associadas às pontas epilépticas. A mais expressiva é a que se encontra na zona temporal corroborando os dados já existentes utilizando outras modalidades para o paciente em causa, que evidenciavam um foco epiléptico nessa mesma área.

De entre os três atrasos utilizados para a HRF pode-se afirmar que o que fornece menores resultados satisfatórios é quando se promove a um atraso de apenas 3 segundos. Note-se, ainda, que quando o atraso da HRF passa a ser de 9 segundos deixa de haver activações na zona temporal talvez confirmando que o foco epiléptico se propaga activando outras zonas cerebrais.

No que concerne às zonas activadas negativamente pouco se pode afirmar sendo que esta área ainda se encontra aberta a novas investigações. Tal como Bagshaw e colaboradores afirmam (Bagshaw et al., 2004) as respostas positivas e negativas não se sobrepõem espacialmente demonstrando assim que as respostas negativas não são apenas parte do *undershoot* provocado por uma resposta positiva. De salientar que, para além de se poderem utilizar HRF estandardizadas, seria um importante avanço conseguir desenvolver HRF singulares e que representem a resposta de um foco epiléptico (Kang et al., 2003).

É ainda de referir que algumas activações nos resultados obtidos podem resultar de artefactos presentes durante a aquisição dos dados funcionais. Posteriormente poderão ser realizados novos estudos para reduzir ao máximo os artefactos existentes em imagem funcional, já enunciados nos capítulos anteriores.

O objectivo deste estudo foi conseguido apesar da escassez de pacientes para análise devido a problemas na touca de EEG. No entanto, um aumento do número de análises estatísticas em diferentes pacientes poderia proporcionar uma maior validação e credibilidade dos resultados.

10. Melhoria do Sinal de fMRI Através da Remoção do Ruído Fisiológico – Batimentos Cardíacos

Como complemento do projecto efectuado foi desenvolvido um algoritmo capaz de modelar e remover um dos ruídos fisiológicos presentes no sinal de fMRI, mais especificamente o ruído provocado pelos batimentos cardíacos. O objectivo inicial é comparar as activações provocadas pelas pontas epilépticas nos dados originais de fMRI e as activações existentes em dados após ter sido aplicado o algoritmo e, portanto, sem a presença deste ruído.

De seguida irá ser feita uma breve referência a estudos já existentes sendo depois demonstrado o algoritmo desenvolvido e os resultados obtidos. Tal como no estudo anterior, foi utilizado o EEGLab para estudo e tratamento dos dados EEG e o FSL para análise estatística.

10.1. *Modelação do sinal cardíaco*

A razão sinal-ruído representa um importante factor na capacidade dos dados de fMRI revelarem uma boa correlação entre o efeito BOLD e as alterações cerebrais. Quanto maior esta razão, melhor será o sinal de fMRI e mais precisa será a análise estatística (Liston et al., 2005). De entre os ruídos existentes num sinal de fMRI os mais significativos são os provocados por alterações fisiológicas como é o caso dos batimentos cardíacos, da respiração e dos ritmos eléctricos cerebrais.

A eficiência de um estudo EEG-fMRI pode ser aumentada removendo-se dados cuja variação está relacionada com os batimentos cardíacos antes de se efectuar a análise estatística ou então incluindo o ruído como uma variável explanatória (Liston et al., 2005). Alguns estudos já efectuados promoveram correcção do *k-space*, correcção da imagem, filtragem dos dados, análise por

decomposição da *time-series* da imagem e análise espacial de componentes independentes (ICA – *Independent Component Analysis*).

O algoritmo desenvolvido tem como objectivo ordenar as *slices* de cada volume consoante a fase em que são captadas relativamente aos batimentos cardíacos.

10.2. Métodos

10.2.1. Análise do EEG

A estrutura do sinal de EEG inclui também o sinal proveniente dos batimentos cardíacos ECG, sendo possível obter e armazenar a informação do momento em que ocorre o pico de cada batimento (*QRS peak*). Entre dois picos QRS consecutivos são captadas várias *slices* correspondente a um ou a dois volumes distintos. É então feita uma leitura pico a pico sendo que é dado o valor 0 ao primeiro e o valor 10 ao segundo. Qualquer *slice* que seja adquirida entre os picos marcados terá um valor compreendido entre 0 e 10, consoante a fase em que se encontra. É então construído um vector com toda a informação em relação à fase de todas as *slices* dos 196 volumes (neste caso específico) (Figura XXX – “fasesordenadas”). De seguida esse vector é ordenado por ordem crescente para então ser utilizada na ordenação das imagens funcionais (Figura XXX – “volumesordenados”).

Aquisição Simultânea de EEG – fMRI em Epilepsia

```
>> size(fasesordenadas)

ans =

    25   196

>> fasesordenadas

fasesordenadas =

Columns 1 through 9

    0         0         0         0    0.0885    0.2703    0.3540    0.4167    0.4615
0.1145    0.1302    0.1302    0.1339    0.1935    0.2086    0.2141    0.2999    0.3226
0.0671    0.2379    0.2503    0.3128    0.3315    0.4317    0.5249    0.6034    0.6197
0.0242    0.0254    0.1138    0.1148    0.2108    0.3053    0.3302    0.3581    0.4647
0.0631    0.0636    0.0658    0.1301    0.1428    0.1440    0.1555    0.1722    0.2356
0.0163    0.0997    0.1120    0.1798    0.1860    0.1909    0.4174    0.4386    0.5324
0.0525    0.0562    0.1308    0.1329    0.1386    0.2196    0.3275    0.3831    0.4735
0.0909    0.0933    0.0933    0.0976    0.1741    0.2118    0.2727    0.3465    0.4109
0.0451    0.1241    0.1261    0.2011    0.2205    0.2327    0.2978    0.5816    0.5963
0.2365    0.2444    0.2465    0.3361    0.3794    0.4077    0.4252    0.4709    0.4709
0.1180    0.1993    0.2117    0.2215    0.3029    0.3722    0.4279    0.4569    0.4772
0.1535    0.1548    0.1603    0.2343    0.2510    0.3818    0.4843    0.5872    0.5872
0.0244    0.1008    0.1974    0.2637    0.2795    0.3619    0.4977    0.5649    0.5860
0.1385    0.1482    0.1579    0.1673    0.2187    0.2603    0.3236    0.3876    0.5080
0.0128    0.0134    0.0138    0.0934    0.1747    0.1852    0.1990    0.2149    0.3457
0.1216    0.1352    0.1363    0.1479    0.2158    0.2176    0.2214    0.2949    0.3654
0.0022    0.0023    0.0024    0.0942    0.1778    0.2441    0.3248    0.3356    0.3564
0.0323    0.1236    0.1291    0.1365    0.1973    0.2848    0.3314    0.4079    0.6104
0.0748    0.1601    0.3616    0.3745    0.4841    0.6005    0.6480    0.6757    0.6757
0.1051    0.1921    0.2257    0.2577    0.2818    0.2818    0.2916    0.2942    0.4119
0.0676    0.0706    0.2263    0.2464    0.2578    0.3127    0.3153    0.4702    0.5211
0.0180    0.2059    0.2059    0.3787    0.3856    0.4300    0.4372    0.5541    0.6952
0.0576    0.0656    0.1662    0.2907    0.4604    0.5165    0.5330    0.5844    0.6439
0.0066    0.0070    0.0074    0.0090    0.0901    0.1565    0.2547    0.2680    0.2727
0.0407    0.0447    0.0466    0.2269    0.2951    0.3662    0.3881    0.3949    0.5451

>> volumesordenados

volumesordenados =

Columns 1 through 16

    76    99    148    177    184    166    45    153    194    155    163    170    110    32    121    62
181    46    87    16    33    35    191    37    137    125    140    164    78    186    26    157
174    52    101    28    172    3    91    25    106    43    48    123    11    135    73    14
169    127    116    81    84    23    1    150    102    12    118    57    132    114    144    59
55    179    159    144    157    112    30    50    130    41    9    71    161    93    21    78
97    183    19    147    44    162    176    154    31    4    122    138    7    193    63    189
167    164    57    114    33    181    80    191    140    125    15    69    49    35    142    132
27    24    105    98    100    18    72    90    173    171    47    165    42    92    77    10
102    61    169    189    1    16    150    46    127    22    95    87    59    137    118    67
34    143    40    70    139    129    160    88    131    178    75    13    111    156    2    27
44    183    53    81    74    154    51    4    120    12    84    23    193    92    63    176
180    79    68    113    5    117    190    38    103    29    192    56    20    64    54    124
10    178    42    111    173    171    156    147    138    100    17    162    31    7    77    134
108    45    32    48    175    195    58    60    163    149    184    166    14    94    126    136
143    13    2    192    124    139    24    187    40    70    19    160    88    165    27    129
110    153    119    15    182    73    3    43    76    96    21    133    185    195    91    106
94    68    117    8    103    126    36    113    145    34    149    66    85    75    168    98
148    172    30    80    128    177    22    52    170    99    11    155    83    50    110    153
151    108    5    96    175    188    60    82    141    190    20    54    64    79    94    68
28    142    16    65    69    39    26    104    137    71    89    159    9    194    123    130
43    91    155    106    48    153    73    119    32    110    182    184    133    115    121    62
84    23    138    12    186    125    35    140    37    157    191    112    55    179    164    93
52    185    49    123    172    194    148    50    99    101    11    135    177    21    170    128
132    107    53    18    57    127    150    187    19    7    74    116    81    181    144    33
174    179    39    6    142    93    159    130    71    9    41    30    161    28    65    15
```

Figura 0.44 – Representação de parte dos vectores ‘fasesordenadas’ e ‘volumes ordenados’.
Mário João Bártolo

Na figura 10.1 é apresentada uma parte do referido vector (“fasesordenadas”) que, tal como documenta a função “size” do Matlab, contém 25 *slices* por 196 volumes. A matriz volumes ordenados tem a mesma dimensão que a matriz fases ordenadas e indica a ordem pela qual as *slices* adquiridas devem ser reordenadas para ficarem agora ordenadas no espaço das fases.

10.2.2. Filtro Passa-Baixo

Depois de ordenados os dados verificou-se que estes continham ainda alguma informação desnecessária de altas-frequências, como comprova a figura 10.2.

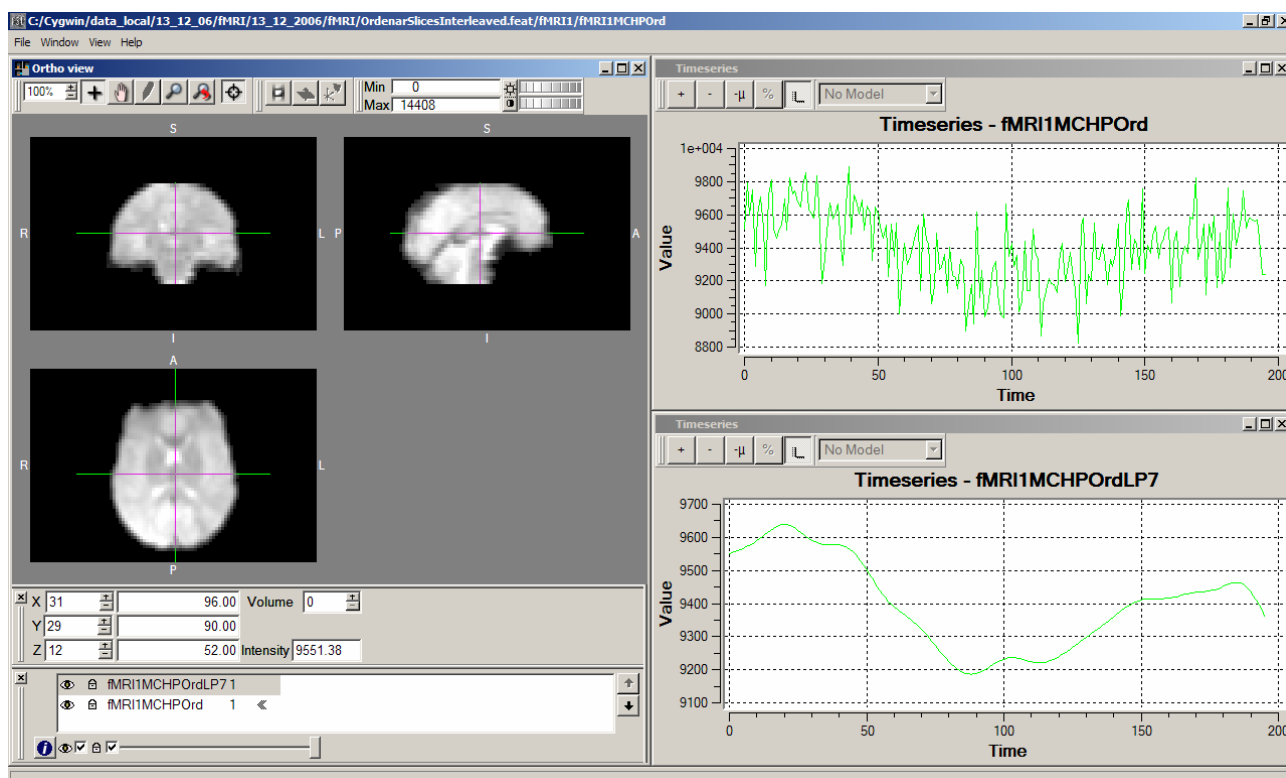


Figura 0.45 – Timeseries de um determinado ponto nos dados ordenados antes (fMRI1MCHPOrd) e após (fMRI1MCHPOrdLP7) aplicação do filtro passa-baixo.

Na figura anterior é apresentada a *timeseries* referente a um ponto na imagem funcional antes (fMRI1MCHPOrd) e após (fMRI1MCHPOrdLP7) a aplicação do filtro. Note-se as altas-frequências presentes na *timeseries* referente aos dados funcionais onde não foi

aplicado filtro passa-baixo. A *timeseries* referente ao mesmo ponto, mas já com a aplicação do filtro passa baixo, mostra que estes dados já contêm apenas informação relativa aos batimentos cardíacos.

De referir, que foram aplicados quatro filtros passa-baixo lineares Gaussianos, em ambiente Cygwin, com os seguintes valores: 1, 3, 5 e 7.

10.2.3. Máscaras

Já com as imagens ordenadas e filtradas foram aplicadas algumas funções presentes no Matlab, especificamente a função “Mean” e a função “Std”, Média e de Desvio Padrão respectivamente. Estas funções foram aplicadas às diferentes imagens originadas pelos diferentes filtros.

O algoritmo desenvolvido continha as funções referidas com o objectivo de criar uma imagem com apenas um volume e que esse reflectisse as diferentes áreas que continham sinal proveniente dos batimentos cardíacos.

Foram então criadas quatro diferentes máscaras em cada um dos datasets, sendo que cada uma delas evidencia uma determinada área do cérebro. Na figura 10.3, essas áreas encontram-se marcadas com um círculo vermelho à volta na imagem oito da 1ª linha, na segunda imagem da 2ª linha e na 5ª imagem da segunda linha. De referir que a quarta máscara criada corresponde à parte anterior do cérebro encontrando-se representada na figura 10.4.

De referir que as máscaras foram criadas sobre a imagem originada após a aplicação do filtro de valor 7 e do algoritmo referente ao desvio padrão, pois este era o que apresentava melhor contraste na imagem.

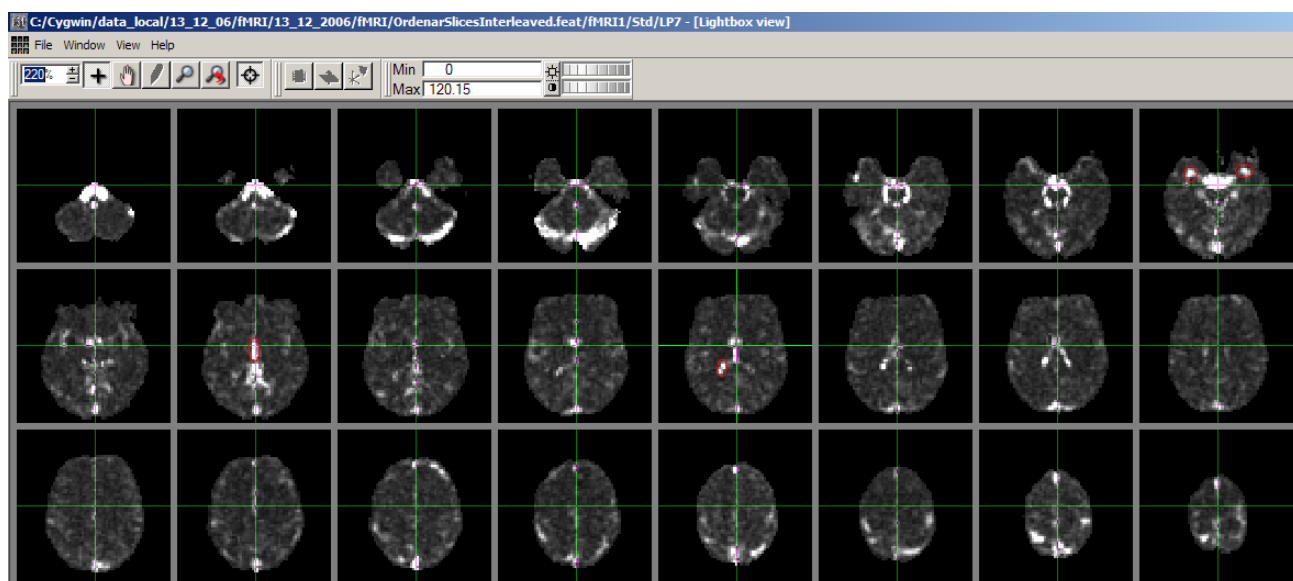


Figura 0.46 – Esquematização do local da aplicação das máscaras.

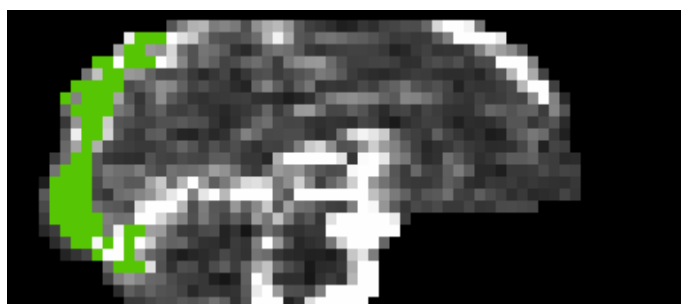


Figura 0.47 – Esquematização do local da 4ª máscara (zona posterior do cérebro)

10.2.4. Regressores

As diferentes máscaras obtidas evidenciam apenas sinal originado pelos batimentos cardíacos sendo então utilizadas na aplicação do algoritmo. De referir que foram criadas quatro máscaras por cada *dataset*.

Procedeu-se então à multiplicação de cada máscara pelos dados ordenados 4D. Em seguida, a média dos voxels presentes em cada um desses 4 volumes foi calculada, obtendo-se então quatro diferentes regressores (cada regressor tem dimensão 1×196), para cada *dataset*, posteriormente utilizados na análise estatística.

Cada um dos seguintes gráficos representa os regressores resultantes da aplicação de máscaras semelhantes nos cinco diferentes *datasets*. Desta forma, cada gráfico corresponde a uma das quatro zonas atrás referidas.

Aquisição Simultânea de EEG – fMRI em Epilepsia

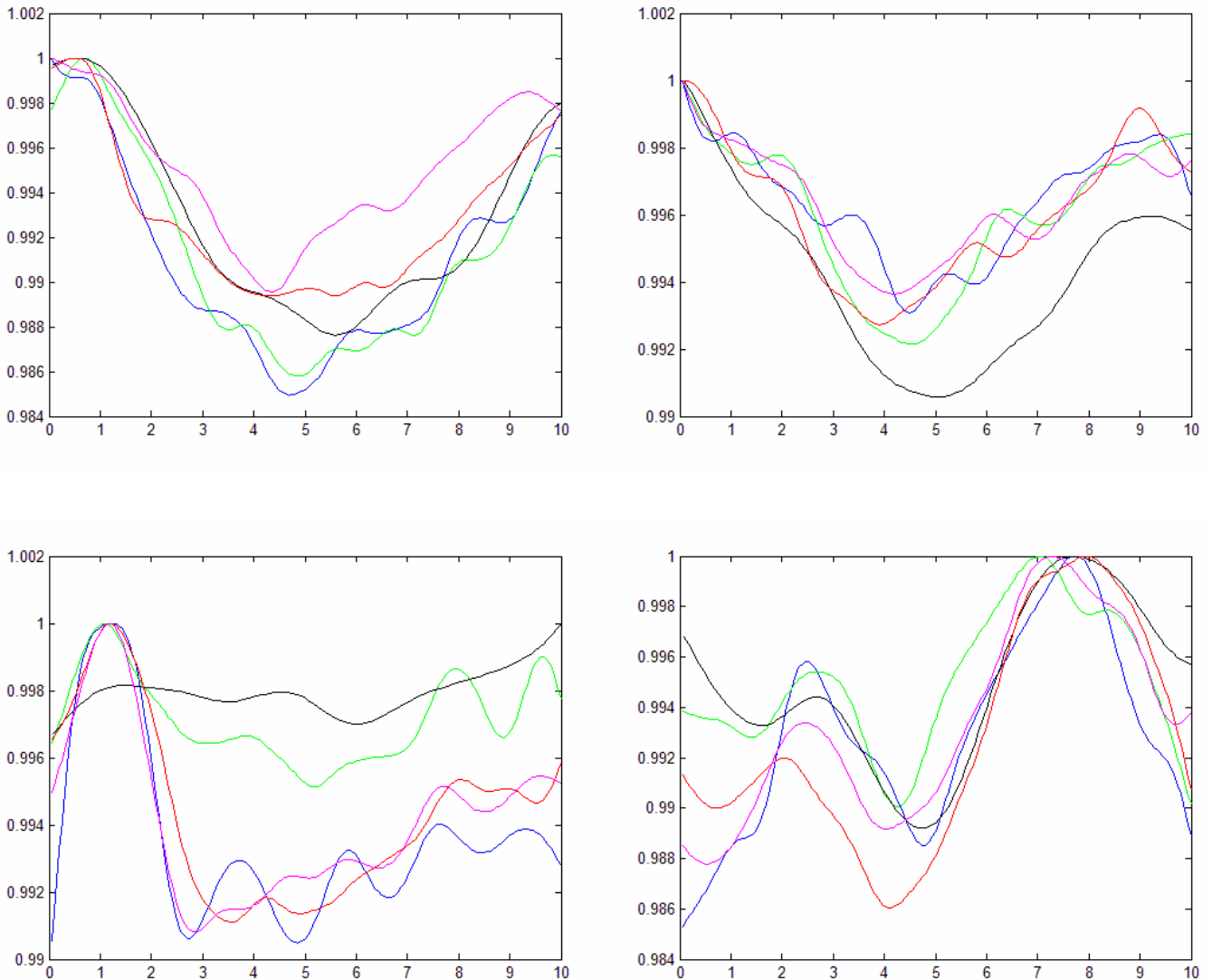


Gráfico 0.13 – Traçado dos regressores utilizados para cada uma das 4 máscaras obtidas.

Pode-se afirmar que, de uma maneira geral, os regressores criados em cada *dataset*, para uma determinada zona do cérebro, são muito semelhantes representando o ruído fisiológico associado ao batimento cardíaco em cada uma dessas regiões.

10.2.5. Análise Estatística – FEAT

Tal como no estudo inicial, o software utilizado na análise estatística dos dados foi o FSL, nomeadamente o FEAT. Como os *datasets* utilizados são os mesmos que no estudo anterior não foi necessário utilizar de novo a função BET, tendo sido o co-registo feito com a imagem anteriormente criada.

De seguida são evidenciados os principais passos efectuados na análise estatística de primeiro nível num *dataset*.

- *Stats + Post-stats*

Neste estudo foram efectuados cinco análises estatísticas de primeiro nível. Nas imagens funcionais utilizadas já foi previamente efectuada a correcção de movimentos, designada no nome do ficheiro por ‘MC’, e a ordenação das *slices* dos 196 volumes em relação à fase. Desta forma, na opção “*Select 4D data*” a imagem funcional seleccionada é que foi ordenada pelo algoritmo atrás apresentado, por ex: fMRI1MCHPOrd.

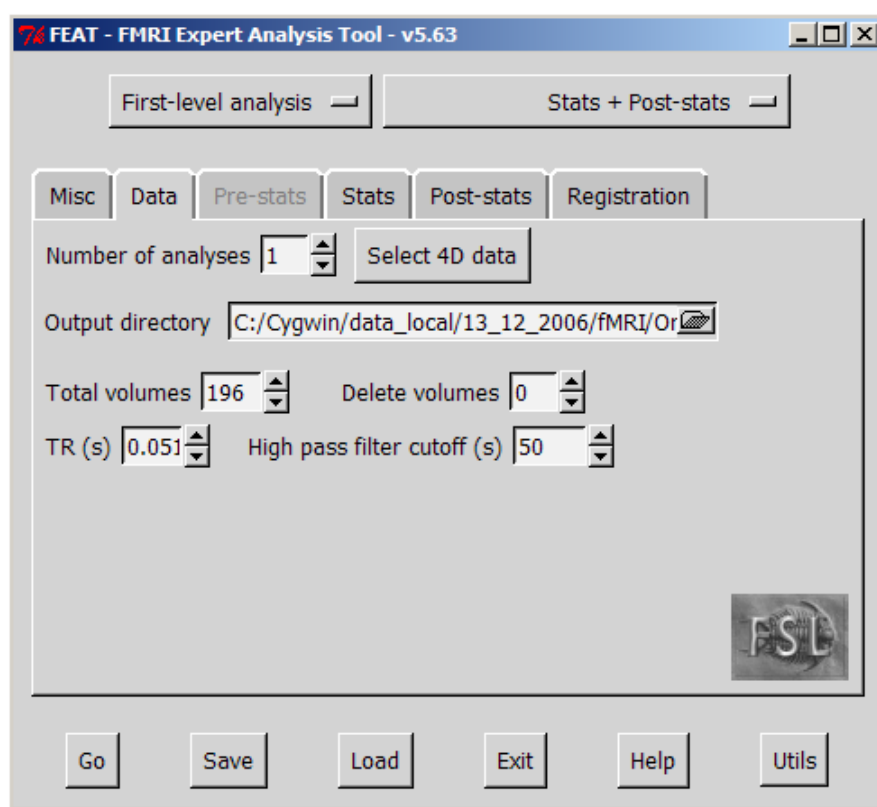


Figura 0.48 - GUI do FEAT – “Data”.

De referir que neste caso o TR irá ter o valor de 0.051 segundos pois já não se trata de dados provenientes do scanner mas sim de dados alterados na sua estrutura. Como a fase, tal como atrás demonstrado, varia de 0 a 10, o valor máximo no tempo é de 10 segundos. Logo, ao terem sido adquiridos 196 volumes, existe 1 volume por cada 0.051 segundos.

No separador “*Stats*” é feita a construção do GLM para esta análise. De referir que foram utilizados 4 eventos, cada um dos quais correspondendo a um regressor. Neste caso específico não foi efectuada nenhuma convolução pois o regressor foi construído com base nos dados funcionais.

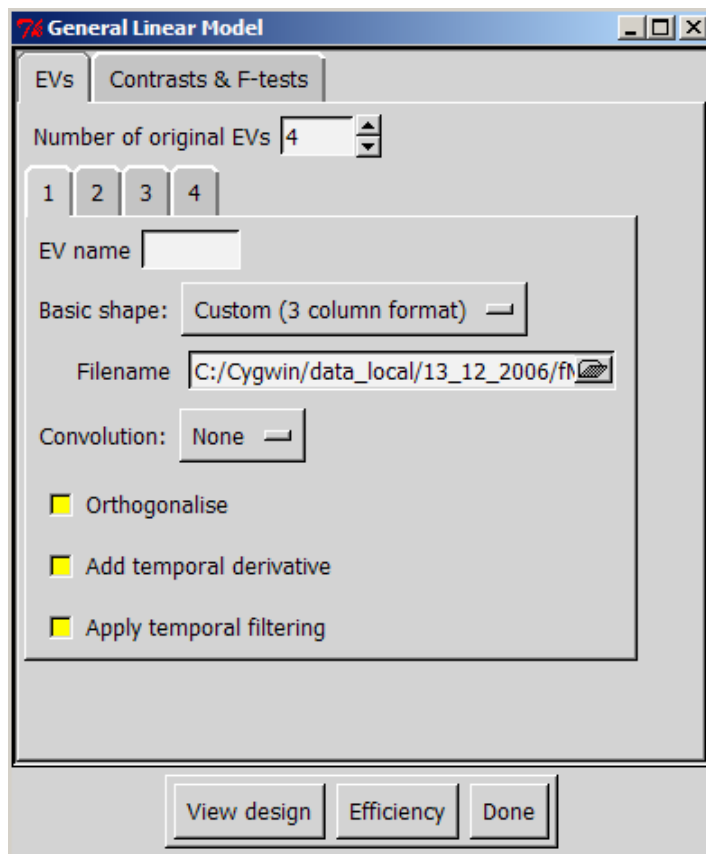


Figura 0.49 – General Linear Model – “Events”

A figura seguinte representa o GLM aplicado aos dados funcionais. É de referir que foram aplicados dois contrastes por regressor, um para as activações positivas e um para as activações negativas, perfazendo um total de oito contrastes.

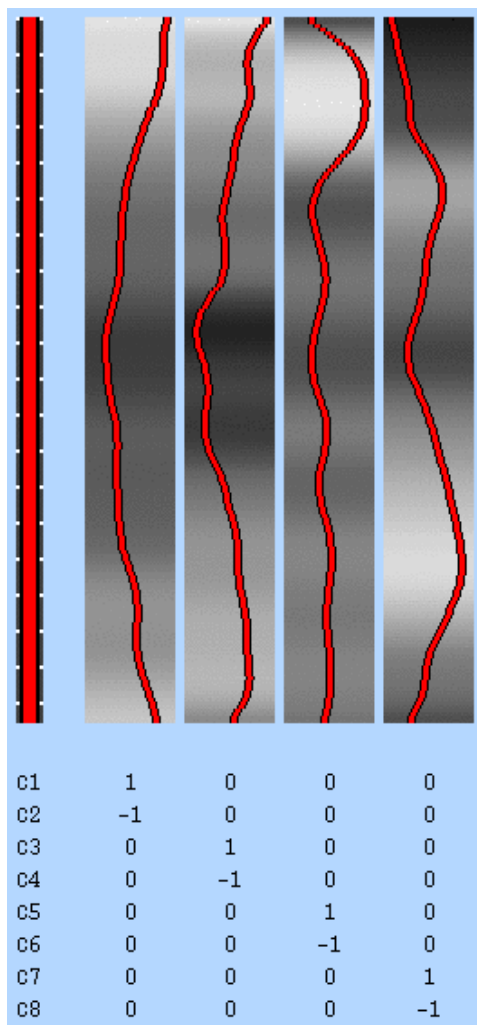


Figura 0.50 - Modelo dos regressores e dos contrastes utilizados.

No que concerne ao separador “*Post-stats*” o valor P utilizado foi de 0.05 e para o limiar de Z de 2.3, tal como no estudo anterior.

10.3. Resultados

De seguida são apresentados os resultados de quatro das cinco análises efectuadas, isto porque a terceira análise feita (correspondente ao 3º *dataset*) não possuía o mesmo número de volumes que as restantes por motivos já explicados.

Por uma questão de simplicidade e facilidade na análise das activações produzidas não vão ser aqui expostos os resultados tal como o FEAT automaticamente os produz onde, juntamente com os dados da activação, apresenta as *timecourses* dos voxels analisados. No entanto foi

utilizada uma outra função do FSL – FSLView – para visualizar as zonas activadas pelos 8 contrastes.

Dataset 1

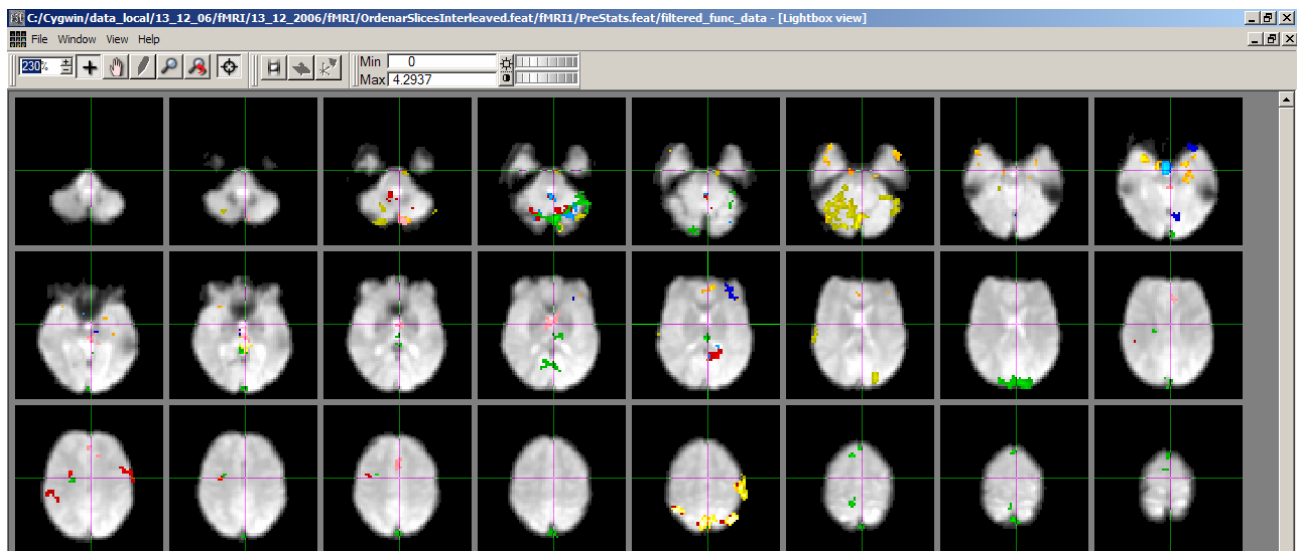


Figura 0.51 – Activações associadas ao batimento cardíaco (corte transversal).

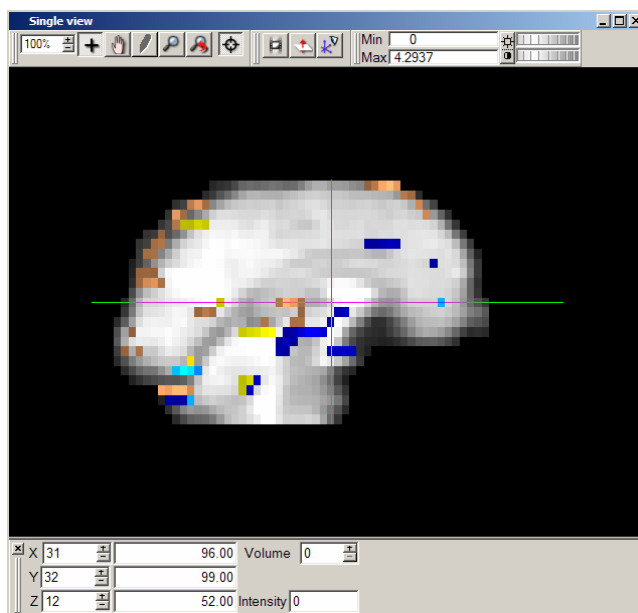


Figura 0.52 – Activações associadas ao batimento cardíaco (corte sagital).

Dataset 2

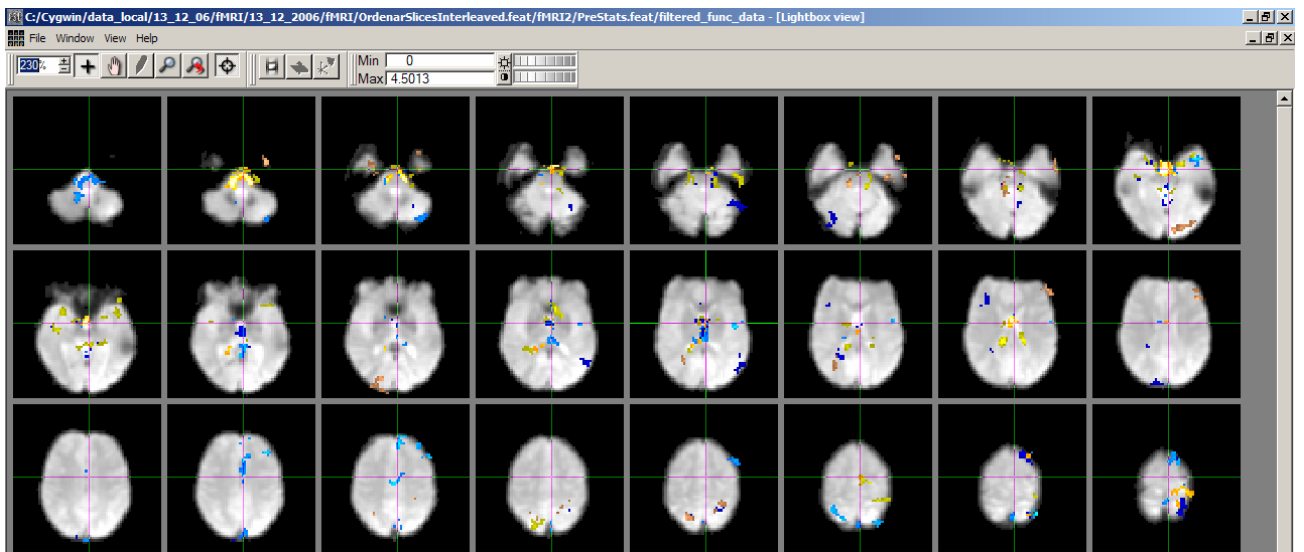


Figura 0.53 - Activações associadas ao batimento cardíaco (corte transversal).

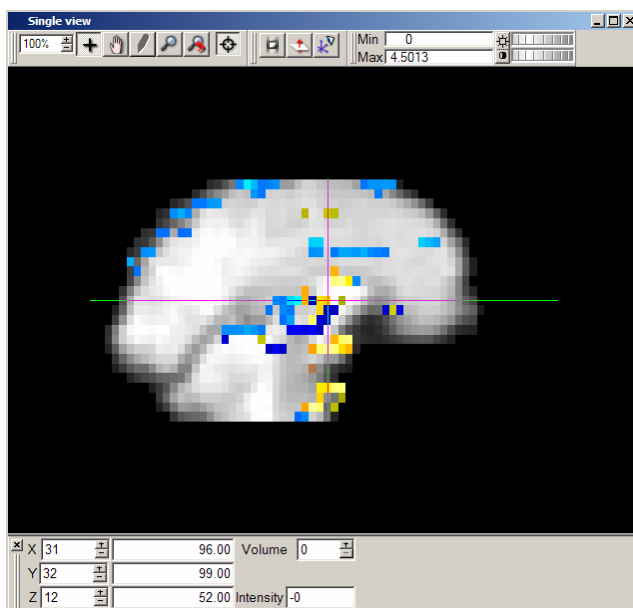


Figura 0.54 – Activações associadas ao batimento cardíaco (corte sagital).

Dataset 4

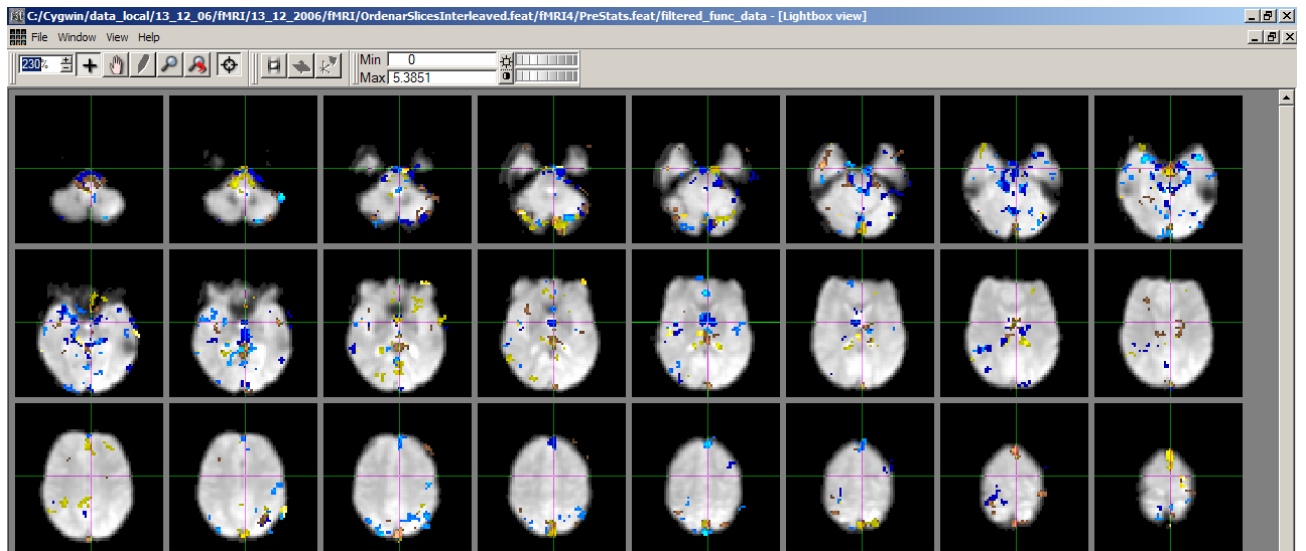


Figura 0.55 - Ativações associadas ao batimento cardíaco (corte transversal).

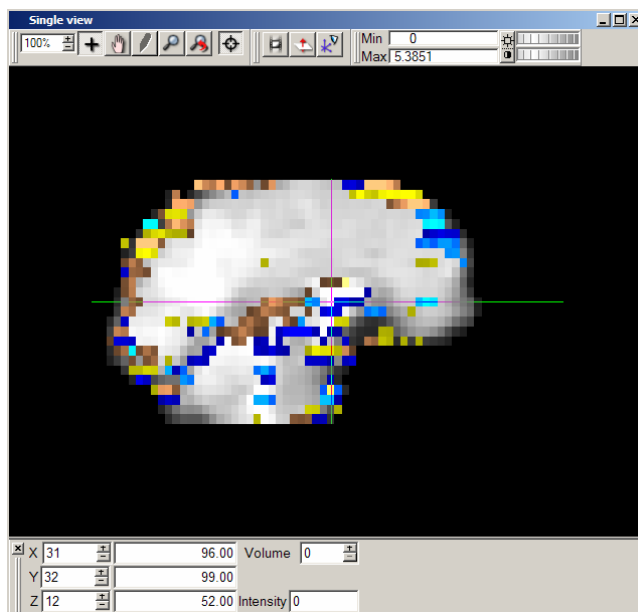


Figura 0.56 - Ativações associadas ao batimento cardíaco (corte sagital).

Dataset 5

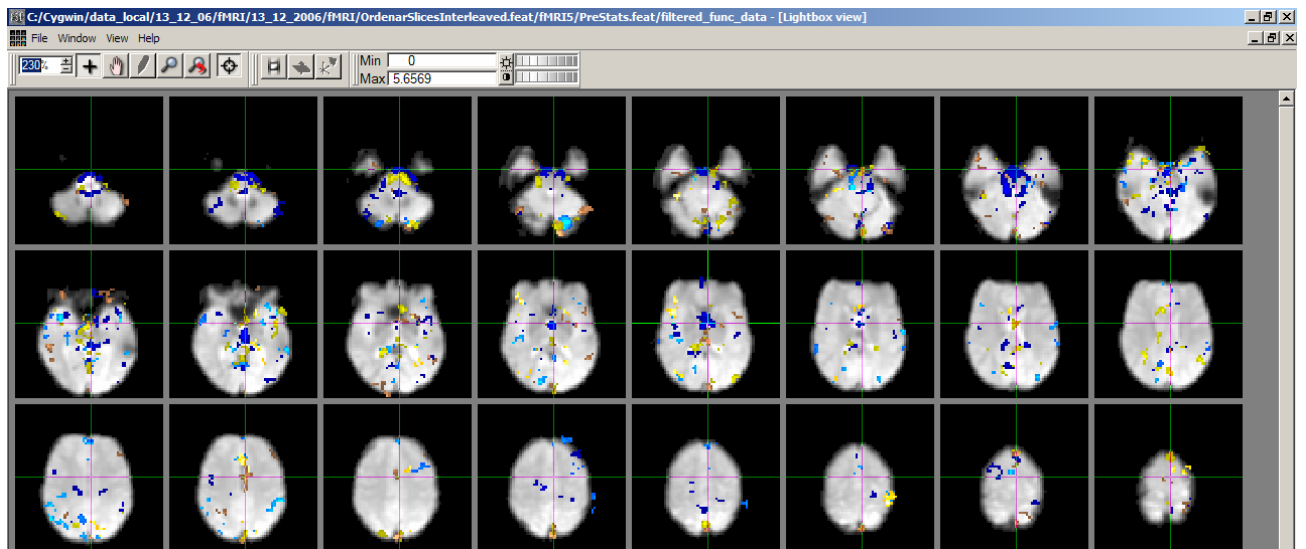


Figura 0.57 - Ativações associadas ao batimento cardíaco (corte transversal).

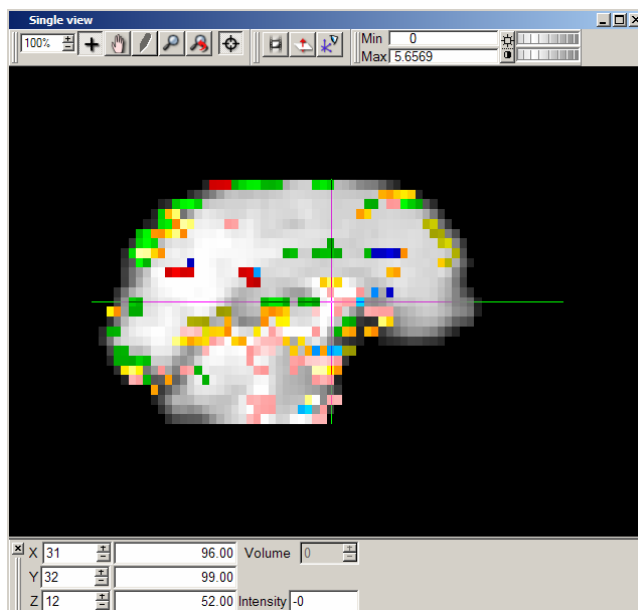


Figura 0.58 - Ativações associadas ao batimento cardíaco (corte sagital).

10.4. Discussão & Conclusão

Os resultados obtidos para cada *dataset* são muito semelhantes entre si demonstrando a fiabilidade deste método quando se pretende demonstrar as activações provocados pelo ruído fisiológico – batimentos cardíacos.

Para cada *dataset*, para além de serem demonstradas as activações em corte transversal, é também apresentado um corte sagital com as activações específicas de cada um.

Comparando os cortes sagitais entre si verifica-se uma concordância entre os mesmos ao longo de toda a zona onde se pode encontrar o líquido céfalo-raquideano (CSF – *Cerebrospinal Fluid*). Este líquido ocupa todo o espaço subaracnóide e o sistema ventricular à volta e em torno do cérebro. De referir que o espaço subaracnóide esta envolvido superiormente pelo seio longitudinal superior, que é composto por sangue venoso, sujeito por isso a alterações constantes provocadas pelos batimentos cardíacos. Deste facto podemos concluir que se conseguiu modelar o sinal resultante dos batimentos cardíacos e que este está presente, como forma de ruído, no sinal de fMRI.

Ao serem analisados os dados do primeiro *dataset* verifica-se que muitas activações presentes na parte anterior do cérebro no sinal original (figura 8.2) poderão ter sido activadas pelo sinal relativo aos batimentos cardíacos isto porque essas mesma áreas são activadas quando os regressores utilizados modelam o sinal do batimento cardíaco (por ex. na figura 10.8).

Da mesma forma, verifica-se uma activação na parte anterior esquerda do cérebro (lobo parietal) tanto no estudo estatístico de alto nível com as pontas epiléticas como regressores (por ex. na figura 8.5) como neste estudo. Note-se a repetição constante destas activações em qualquer dos *datasets* analisados.

Os objectivos propostos para este segundo estudo não foram totalmente conseguidos. Com o software utilizado não foi possível

subtrair o sinal resultante dos batimentos cardíacos ao sinal original. Se tal fosse possível poder-se-ia fazer uma comparação das activações cerebrais produzidas por pontas epilépticas antes e após a remoção do ruído, um importante progresso no melhoramento do sinal de fMRI.

É ainda de referir que para além do ruído provocado pelos batimentos cardíacos, o ruído provocado pela respiração e pelos ritmos eléctricos cerebrais também faz parte do sinal funcional. Caso se consiga modelar e remover estes tipos de ruídos fisiológicos conseguir-se-á aumentar a razão sinal-ruído nos dados funcionais.

11. Referências Bibliográficas

[1] Hoa, D., Micheau, A., Gahide, G., Campus Medica, Disponível em: <http://www.e-mri.org> [Consultado: Setembro, 2006].

[2] Cohen, M. S., “Echo-planar imaging (EPI) and functional MRI”, Disponível em: http://airto.bmap.ucla.edu/BMCweb/BMC_BIOS/MarkCohen/Papers/EPI-fMRI.html [Consultado: Setembro 2007]

[3] Hornak, J. P., The Basics of MRI, Disponível em: <http://www.cis.rit.edu/htbooks/mri> [Consultado: Setembro, 2006].

[4] Worsley, K. J., “fmristat - A general statistical analysis for fMRI data”, Disponível em: <http://www.math.mcgill.ca/keith/BICstat/> [Consultado: Agosto, 2007].

[5] FMRIB Centre, Department of Clinical Neurology, University of Oxford, “Other brain imaging techniques”, Disponível em: <http://www.fmrib.ox.ac.uk/education/fmri/introduction-to-fmri/other-brain-imaging-techniques> [Consultado: Maio, 2007].

[6] Wikimedia Foundation, Inc., “Electroencephalography”, Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/EEG> [Consultado: Maio 2007]

[7] Instituto da Inteligência, “imagens da mente”, Disponível em: <http://neuroimagens.blog.com/> [Consultado: Maio 2007]

[8] Priory Lodge Education, “Aspectos Psiquiátricos das Epilepsias”, Disponível em: <http://www.polbr.med.br/ano04/art1104ab.php>
[Consultado em Maio 2007]

[9] Menon, V., Crottaz-Hetbette, S.. Combined EEG and fMRI studies human brain function. *International Review Neurobiology*. 2005;66:291-321.

[10] Krakow, K., Allen, P.J., Symms, M.R., Lemieux, L., Josephs, O., Fish, D.R.. EEG recording during fMRI experiments: image quality. *Hum. Brain. Mapp*. 2000;10:10–15.

[11] Lemieux, L., Allen, P.J., Franconi, F., Symms, M.R., Fish, D.R.. Recording of EEG during fMRI experiments: patient safety. *Magn. Reson. Med*. 1997;38:943–952.

[12] Goldman, R.I., Stern, J.M., Engel, J. Jr., Cohen, M.S.. Acquiring simultaneous EEG and functional MRI. *Clin. Neurophysiol*. 2000;111:1974–1980.

[13] Hoffmann, A., Jager, L., Werhahn, K.J., Jaschke, M., Noachtar, S., Reiser, M.. Electroencephalography during functional echo-planar imaging: detection of epileptic spikes using post-processing methods. *Magn. Reson. Med*. 2000;44:791–798.

[14] Krakow, K., Woermann, F.G., Symms, M.R., Allen, P.J.. EEG-triggered functional MRI of interictal epileptiform activity in patients with partial seizures. *Brain* 1999;122:1679–1688.

[15] Seeck, M., Lazeyras, F., Michel, C.M., Blanke, O.. Non-invasive epileptic focus localization using EEG-triggered functional MRI and

electromagnetic tomography. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 1998;106:508–512.

[16] Allen, P.J., Josephs, O., Turner, R.. A method for removing imaging artifact from continuous EEG recorded during functional MRI. *Neuroimage* 2000;12:230–239.

[17] Allen, P.J., Polizzi, G., Krakow, K., Fish, D.R., Lemieux, L.. Identification of EEG events in the MR scanner: the problem of pulse artifact and a method for its subtraction. *Neuroimage* 1998;8:229–239.

[18] Lemieux, L., Salek-Haddadi, A., Josephs, O.. Event-related fMRI with simultaneous and continuous EEG: description of the method and initial case report. *Neuroimage* 2001;14:780–787.

[19] Bagshaw, A.P., Aghakhani, Y., Bénar, C.G.. EEG-fMRI of focal epileptic spikes: analysis with multiple haemodynamic functions and comparison with gadolinium-enhanced MR angiograms. *Hum. Brain. Mapp.* 2004;22:179–192.

[20] Kang, J.K., Bénar, C., Al-Asmi, A.. Using patient-specific hemodynamic response functions in combined EEG-fMRI studies in epilepsy. *Neuroimage* 2003;20:1162–1170.

[21] Stefanovic, B., Warnking, J.M., Kobayashi, E.. Hemodynamic and Metabolic Responses to Activation, Deactivation and Epileptic Discharges. *Neuroimage* 2005;28:205–215.

[22] Bénar C.G., Grova, C., Kobayashi, E.. EEG-fMRI of epileptic spikes: Concordance with EEG source localization and intercranial EEG. *Neuroimage* 2006;30:1161-1170.

[23] Salek-Haddadi, A., Diehl, B., Hamandi, K., Merschhemke, M., Liston, A., Friston, K.. Hemodynamic correlates of epileptiform discharges: an EEG-fMRI study of 63 patients with focal epilepsy. *Brain Res.* 2006:1:148–66.

[24] Delorme, A., Makeig, S.. EEGLAB: an open source toolbox for analysis of single-trial EEG dynamics including independent component analysis. *Journal of Neuroscience Methods* 2004:134:9-21.

[25] Niazy, R.K., Beckmann, C.F., Iannetti, G.D.. Removal of FMRI environment artefacts from EEG data using optimal basis sets. *NeuroImage.* 2005:28:720-737.

[26] Gotman, J., Kobayashi, E., Bagshaw, A.P., Bénar, C.G.. Combining EEG and fMRI: a multimodal tool for epilepsy research. *Journal of Magnetic Resonance Imaging.* 2006:23:906-920.

[27] Lengler, U., Kafadar, I., Neubauer, B.A.. fMRI correlates of interictal epileptic activity in patients with idiopathic benign focal epilepsy of childhood: A simultaneous EEG – functional MRI study. *Epilepsy Research.* 2007:75:29-38.

[28] Liston, A., Lund, T.E., Salek-Haddadi, A., Hamandi, K., Friston, K.J., Lemieux, L.. Modelling cardiac signal as a confound in EEG-fMRI and its application in focal epilepsy studies. *NeuroImage.* 2006:30:827-834.

[29] Zijlmans, M., Huiskamp, G., Hersevoort, M., et al.. EEG-fMRI in the preoperative work-up for epilepsy surgery. *Brain.* 2007:1-11.

[30] Hawco, C., Bagshaw, A., Lu, Y., Dubeau, F., et al.. BOLD changes occur prior to epileptic spikes seen on scalp EEG. *NeuroImage*. 2007:35:1450-1458.

[31] Liston, A., Lund, T., Salek-Haddadi A., Hamandi K., et al..Modelling cardiac signal as a confound in EEG-fMRI and its application in focal epilepsy studies. *NeuroImage*. 2006:30:827-834.

[32] Cohen, M.S., Disponível em: www.brainmapping.org [Consultado: Setembro, 2006].

[33] Clare, S., *Functional Magnetic Resonance Imaging: Methods and Applications*, Disponível em: <http://users.fmrib.ox.ac.uk/~stuart/thesis/fmri.pdf> [Consultado: Setembro, 2006].

[34] Bio-Medical Instruments, “Specs”, Disponível em: http://bio-medical.com/product_info.cfm?inventory__imodel=t9305m [Consultado: Maio, 2007].

[35] Wikimedia Foundation, Inc., “Functional magnetic resonance imaging”, Disponível em: http://en.wikipedia.org/wiki/Functional_magnetic_resonance_imaging [Consultado: Maio, 2007].

[36] Columbia University functional MRI, “About functional MRI (General)”, Disponível: <http://www.fmri.org/fmri.htm> [Consultado: Junho, 2007].

[37] Piedmont Radiology, “Services & Procedures”, Disponível em: <http://www.raadocs.com/index.php?page=service&PKID=56> [Consultado: Junho, 2007].

[38] Busis, N. A., Gregg, T. R., “Use of Functional Magnetic Resonance Imaging to Investigate Brain Function”, Disponível em: <http://www.neuroguide.com/gregg.html> [Consultado: Setembro, 2006].

[39] Imagilys, “fMRI: Functional Magnetic Resonance Imaging”, Disponível em: <http://www.imagilys.com/functional-MRI-fMRI/> [Consultado: Maio, 2007].

[40] The University of Oxford, “FMRIB Software Library“, Disponível em: <http://www.fmrib.ox.ac.uk/fsl/> [Consultado: Outubro, 2006].

[41] Swartz Center for Computational Neuroscience, “The EEGLAB Toolbox - Version 6”, Disponível em: <http://www.sccn.ucsd.edu/eeglab> [Consultado: Outubro, 2006].

[42] Johnson, K. A., and Becker, J. A., The whole brain Atlas, “NEW: Normal Anatomy in 3-D with MRI/PET”, Disponível em: <http://www.med.harvard.edu/AANLIB/cases/caseNA/pb9.htm> [Consultado: Setembro, 2007].

[43] Delorme, A., Serby, H., and Makeig, S., *EEGLAB Tutorial*, University Of San Diego California, 2004.

[44] Jezzard, P., Matthews, P.M., Smith, S. M., *Functional MRI: An Introduction to Methods*. USA: Oxford University Press, 2003.

[45] Merck & Co., “Epilepsia”, Disponível em: <http://www.manualmerck.net/?url=/artigos/%3fid%3d86%26cn%3d829> [Consultado: Maio 2007]