

Quantificação metabólica absoluta *in vitro* por espectroscopia de ressonância magnética

In vitro absolute metabolic quantification by magnetic resonance spectroscopy

Felipe R. Barreto, Carlos E. G. Salmon

Departamento de Física e Matemática, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil

Resumo

Neste projeto estimamos os tempos característicos de relaxação nuclear (T_1 e T_2) do ^1H *in vitro* da água e dos seguintes metabólitos presentes no cérebro humano: N-Acetil-Aspartato (NAA), Colina (Cho), Creatina (Cr) e Mio-Inositol (M-Ins) por meio da análise do sinal de espectroscopia de ressonância magnética nuclear, visando realizar correções de efeito de relaxação transversal e longitudinal no processo de quantificação absoluta. Fantomas com 300 mL de uma solução padrão juntamente com o metabólito em questão foram utilizados para a aquisição dos espectros. Foram utilizadas sequências com tempo ao eco (TE) variável para a determinação de T_2 e tempo de repetição (TR) ou tempo de inversão (TI) variáveis para a determinação de T_1 , sendo sempre adquiridos espectros com e sem a saturação da água. O processamento dos espectros foi feito com os softwares LCModel e MRUI e os ajustes dos dados pelo Origin 8.0. Os seguintes valores de T_1/T_2 (ms) foram os melhores estimados de acordo com a análise da concentração absoluta: (4061/934) para água, (1800/830) para NAA, (2316/717) para Cr, (2356/1095) para Cho e (1537/531) para M-Ins. O software MRUI apresentou melhor desempenho no processo de determinação de T_1 e T_2 para a realização de correções dos efeitos de relaxação no processo de quantificação absoluta.

Palavras-chave: Espectroscopia, quantificação absoluta *in vitro*, efeitos de relaxação.

Abstract

In this project we estimated characteristic nuclear relaxation times (T_1 and T_2) from ^1H *in vitro* of water and the following human brain metabolites: N-Acetyl-Aspartate (NAA), Choline (Cho), Creatine (Cr) and Myo-Inositol (M-Ins) using nuclear magnetic resonance spectroscopy, aiming at relaxation effects correction for absolute quantification. Phantoms with 300 mL of a standard solution with a metabolite were used for spectra acquisition. Variable echo time sequences were used to determinate T_2 while variable repetition or inversion time was used for T_1 determination. Spectra processing was done with MRUI and LCModel softwares. Origin 8.0 was used for data fitting. The following T_1/T_2 values (ms) were the best estimated according to calculated absolute concentration analyses: (4061/934) for water, (1800/830) for NAA, (2316/717) for Cr, (2356/1095) for Cho and (1537/531) for M-Ins. With MRUI better results were obtained in T_1 and T_2 determination for relaxation effects correction in the absolute quantification process.

Keywords: Spectroscopy, *in vitro* absolute quantification, relaxation effects.

Introdução

A espectroscopia localizada de ressonância magnética é uma técnica baseada no fenômeno físico da ressonância magnética nuclear (RMN), que possibilita a medição não invasiva de determinados compostos em organismos vivos. Durante um experimento de ressonância magnética nuclear ocorrem efeitos de relaxação transversal e

longitudinal: a relaxação transversal é ocasionada pela troca de energia dentro do sistema de spins, fazendo com que a magnetização no plano transversal diminua exponencialmente com o decorrer de um tempo característico denominado T_2 enquanto que a relaxação longitudinal ocorre em um tempo característico T_1 , determinado pela recuperação da magnetização longitudinal. A área de um pico do espectro é proporcional a concentração

do metabólito, o número de prótons contribuindo para o sinal e alguns fatores experimentais, dentre esses há o tempo de repetição (TR) e o tempo ao eco (TE). Para o cálculo da concentração metabólica absoluta comparam-se as áreas dos picos dos metabólitos e o pico da água cuja concentração é conhecida. Em condições em que $TR < 4000$ ms e $TE > 30$ ms é necessário relevar os fenômenos de relaxação. Para sequências Spin Eco (90° -TE/2- 180° -TE/2), o fator de correção para os efeitos de relaxação é:

$$F = (1 - e^{-\frac{TR}{T_1}}) \cdot e^{-\frac{TE}{T_2}} \quad (1)$$

No caso de sequências Inversão-Recuperação (180° -TI- 90° -TE/2- 180° -TE/2), o fator de correção é dado por:

$$F = (1 - 2e^{-\frac{TI}{T_1}} + e^{-\frac{TR}{T_1}}) \cdot e^{-\frac{TE}{T_2}} \quad (2)$$

Para o cálculo da concentração absoluta de um metabólito tendo como referência o pico de água sem supressão, pode ser utilizada a seguinte expressão:

$$C = \frac{NP_a \cdot Ca \cdot Am \cdot Fa}{Aa \cdot NP_m \cdot Fm} \quad (3)$$

Sendo na equação 3: NP_a o número de prótons da água gerando sinal, Ca a concentração de água no voxel selecionado, Am a área do pico metabólico, Fa o fator de correção do efeito de relaxação da água, Aa a área do pico de água, NP_m o número de prótons do metabólito contribuindo para o sinal, Fm o fator de correção do efeito de relaxação do metabólito.

Material e métodos

Os fantasmas utilizados eram compostos de um recipiente esférico de vidro de 300 mL totalmente preenchido por uma solução padrão composta por:

- 72 mM de Na₂HPO₄;
- 28 mM de NaH₂PO₄;
- 200 mM de HCOONa;
- 1g/L de NaN₃;
- 2 mM de DSS.

Além da solução padrão, para cada fantoma foi adicionado um dos seguintes metabólitos:

- 50 mM de Ácido N-Acetil-Aspartático (NAA);
- 50 mM de Creatina (Cr);
- 100 mM de Colina (Cho);
- 200 mM de Mio-Inositol (M-Ins).

Os sais Na₂HPO₄ e NaH₂PO₄ foram utilizados para formar uma solução tampão que estabilizasse o pH. HCOONa e DSS são substâncias utilizadas como marcadores pois geram singletos em 8.44 e 0 ppm, respectivamente, e NaN₃ não permite o desenvolvimento de microorganismos na solução. A aquisição dos dados foi feita na máquina de ressonância magnética Achieva 3 T do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, com temperatura mantida constante em $37 \pm 2^\circ\text{C}$ e o pH das soluções em $7,2 \pm 0,2$. Foi utilizada uma sequência PRESS com um volume cúbico de interesse de 8 cm³ localizado no centro do fantoma. Foram adquiridos espectros com 4096 pontos, uma largura de banda de 3200 Hz e 32 médias. Para a determinação de T2 foram adquiridos seis espectros com um tempo de repetição fixo (TR=1660 ms) e variando o tempo ao eco (TE): 35, 80, 125, 170, 215, 260 ms. Para T1 foi mantido o TE= 35 ms e variado o TR= 1500, 1800, 2100, 2400, 2700, 3000, 3300, 3600 ms. Adicionalmente o T1 foi obtido adicionando um pulso de inversão e mudando o tempo de inversão (TI): 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 ms com TR/TE=2535/35 ms. O processamento dos espectros foi feito pelo software LCModel e pelo software MRUI com o uso do algoritmo AMARES. Durante o processamento os espectros as fases foram ajustadas manualmente e fixadas para que não fosse necessária a remoção do resíduo do pico da água. Os valores de área de pico em função do parâmetro variado foram ajustados com o software Origin 8.0 à expressão do sinal correspondente à sequência utilizada. A determinação de T2 do Mio-Inositol foi feita de maneira diferente dentre os softwares: pelo MRUI foi utilizado o pico de 4.05 ppm por sofrer menos influência do acoplamento J enquanto pelo LCModel foi calculado através da variação da área total dos picos. Para a realização da quantificação absoluta foram utilizados os espectros com TE variável e TR variável.

Resultado

Os valores de T1 e T2 *in vitro* (Tabela 1) foram maiores aos valores reportados *in vivo*¹⁻³, fato conhecido e esperado pela mobilidade mais restrita no organismo vivo. Entretanto a proporção entre os valores não foi a mesma observada *in vivo* (M-Ins < Cr < Cho < NAA), pois os metabólitos estão localizados em regiões com estruturas diferentes enquanto *in vitro* estão sujeitos as mesmas condições.

A variabilidade nas medições de área e consequentemente a dificuldade na determinação dos tempos de relaxação está diretamente relacionado com a proximidade do pico metabólico de interesse ao pico da água. Com a utilização da ferramenta HLSVD do

Tabela 1. Valores de T1 e T2.

Substância	MRUI		LCModel	
	T1 (ms)	T2 (ms)	T1 (ms)	T2 (ms)
Água (Cr)	3811±107	782±25	7905±5082	500±21
Cr	2316±190	717±128	3365±2162	788±82
Água (NAA)	3444±148	1200±97	3683±31	2067±38
NAA	1800±180	830±30	1718±18	952±185
Água (Cho)	4776±334	1360±86	3712±997	476±154
Cho	2356±111	1095±35	4222±632	699±54
Água (M-Ins)	4456±511	1022±39	3588±299	1100±119
M-Ins	3412±882	130±18	1537±55	531±431

software MRUI para a remoção do resíduo do pico da água é frequente a remoção parcial da base de picos de metabólitos, o que gera o aumento da dispersão dos resultados.

Os valores de T1 estimados com os dados da sequência que utiliza o pré-pulso de inversão mostraram se menores do que aqueles determinados com a série de espectros com TR variável. Tal diferença foi verificada com o uso de ambos os softwares e pode ter sido ocasionada por imperfeições no angulo de inversão. A utilização da área total dos picos de M-Ins para o cálculo de T2 pelo LCModel provocou um desvio maior do que o observado nas outras medidas, devido a influência do acoplamento J. Houve diferenças entre os valores de T1 e T2 da Cho calculados a partir do processamento usando ambos os softwares, provavelmente geradas por um alargamento da base do pico no espectro (Figura 1). Ao se realizar a quantificação absoluta sem correção dos efeitos de relaxação o valor encontrado é maior do que o real. Para minimizar tais efeitos deve se utilizar $TR \gg T1$ e $TE \ll T2$, caso contrário a correção dos efeitos de relaxação é de extrema importância (Figura 3).

A estimativa da concentração do M-Ins não se aproximou dos valores esperados, pois a determinação de T2 é muito afetada pelo efeito de acoplamento J. Análises *in vitro* podem se tornar problemáticas com o software LCModel quando não há sinais de Cr, Cho ou NAA no espectro, sendo necessário estipular quais serão os picos de referência, embora muitas vezes o software não os reconheça e não faça o *Water Scaling (WS)*. Para realizar a quantificação com os valores de T1 e T2 calculados pelo LCModel foram utilizadas as áreas dos picos metabólitos e da água determinados pelo MRUI, pois segundo a seção 11.2 do manual do software⁴, ao se utilizar o WS os efeitos de relaxação *in vitro* são corrigidos. As concentrações médias estimadas pelo LCModel com WS foram, em mM: 46,38±1,62 para NAA; 43,16±3,03 para Cr; 112±5,93 para Cho e 223,61±29,89 para M-Ins. Esses valores foram estimados com a correção dos efeitos de

relaxação inerentes à base de dados obtida com o fornecedor do programa. A figura 2 demonstra alguns ajustes dos dados feitos pelo software Origin.

A quantificação com a série de espectros com TR variável gera valores de concentração absoluta mais próximos dos esperados (Figura 4) pois os espectros não estão suscetíveis a evolução temporal do acoplamento J observados com a variação de TE. A quantificação da Cr pela série de TE variável (Figura 5) apresentou os maiores desvios apesar de não apresentar acoplamento J, possivelmente devido a uma contaminação do fantoma.

Conclusão

Os valores de T1 e T2 encontrados que mais se aproximam do esperado, através de análises pela quantificação absoluta são, em ms (T1/T2): (4061/934) para água, (1800/830) para NAA, (2316/717) para Cr, (2356/1095) para Cho e (1537/531) para M-Ins. O metabólito que apresentou os valores mais similares em ambos os processamentos e a concentração estimada mais próxima da real foi o NAA, devido ao seu afastamento em relação ao pico da água. O software MRUI permite uma maior liberdade durante a análise do espectro enquanto o LCModel possui a característica de automatizar ao máximo o processo, embora sua utilização tenha sido menos eficaz, em comparação com o MRUI na determinação dos tempos de relaxação. A determinação de T1 e T2 e a quantificação pode ser bastante complexa devido à influência do sinal da água e também em metabólitos que apresentam efeitos de acoplamento J.

Agradecimentos

FAPESP (processo 2009/00270-2) e ao técnico Carlos Alberto Brunello. Este trabalho faz parte do programa CInAPCe.

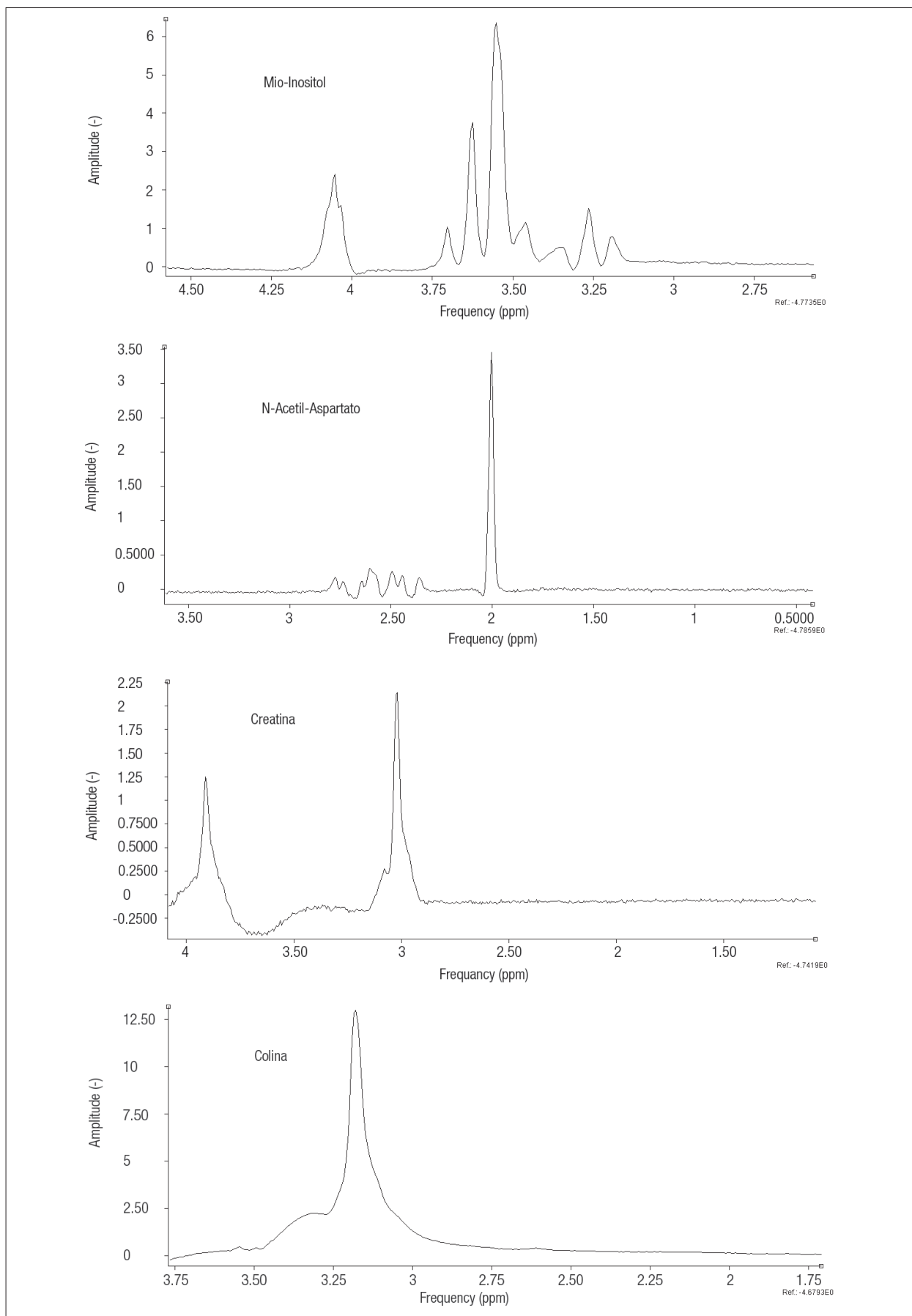


Figura 1. Exemplos dos espectros adquiridos.

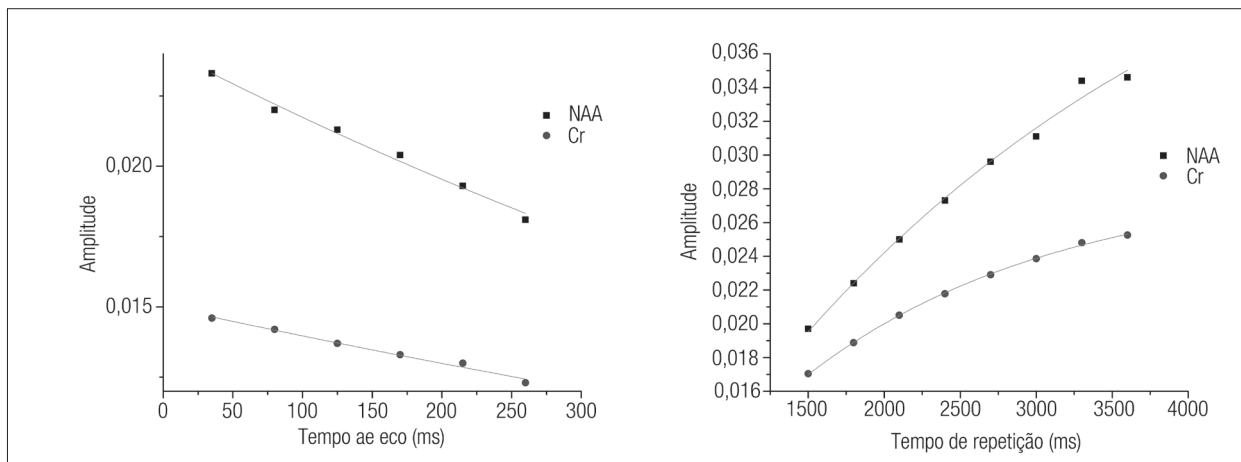


Figura 2. Ajuste dos pontos pelo software Origin.

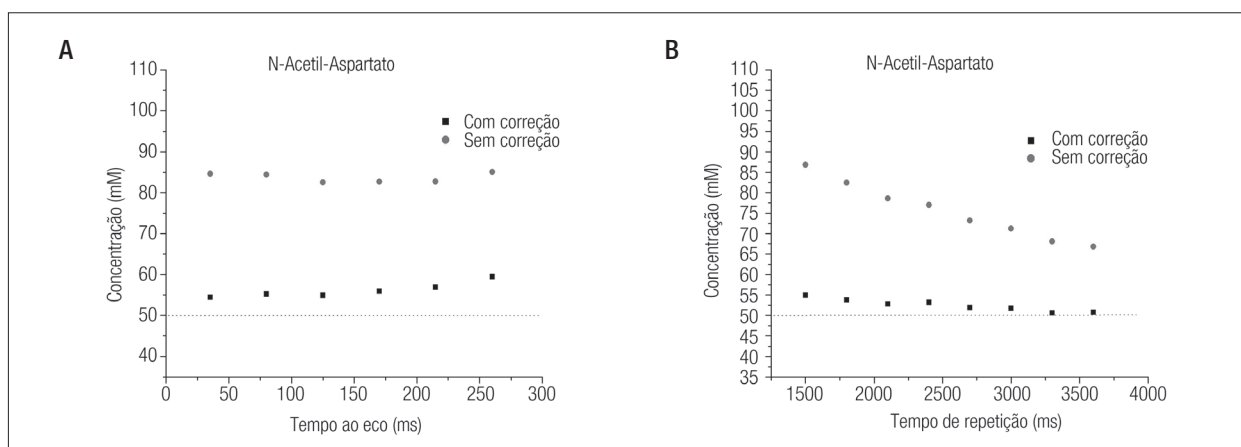


Figura 3. A) Concentrações estimadas de NAA com e sem correção dos efeitos de relaxação na série de espectros com TE variável. B) Concentrações estimadas de NAA com e sem correção dos efeitos de relaxação na série de espectros com TR variável. Em ambos os gráficos a linha tracejada representa a concentração esperada.

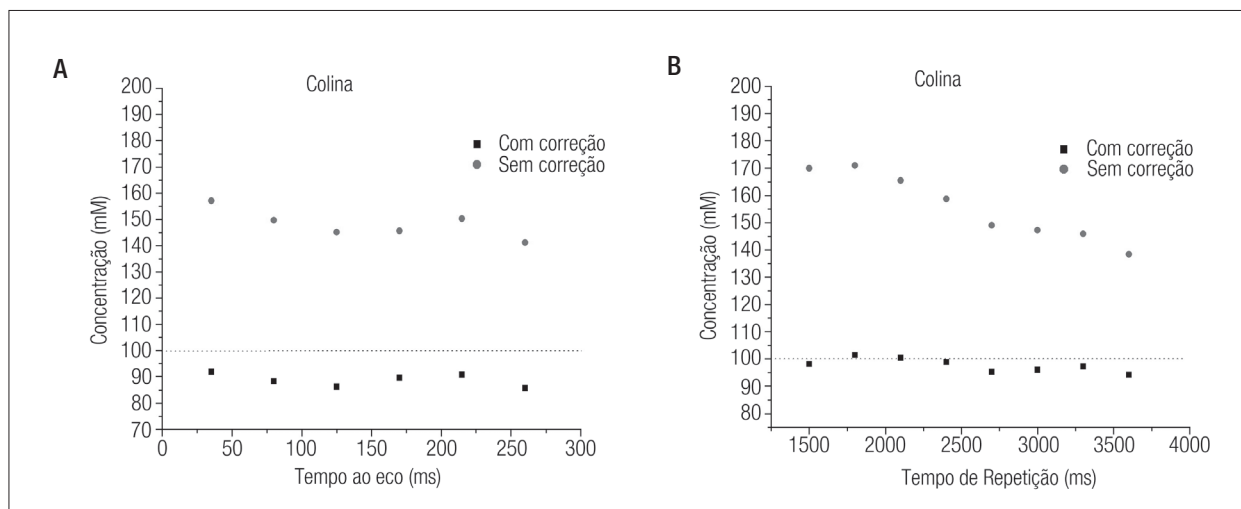


Figura 4. A) Concentrações estimadas de Cho com e sem correção dos efeitos de relaxação na série de espectros com TE variável. B) Concentrações estimadas de Cho com e sem correção dos efeitos de relaxação na série de espectros com TR variável. Em ambos os gráficos a linha tracejada representa a concentração esperada.

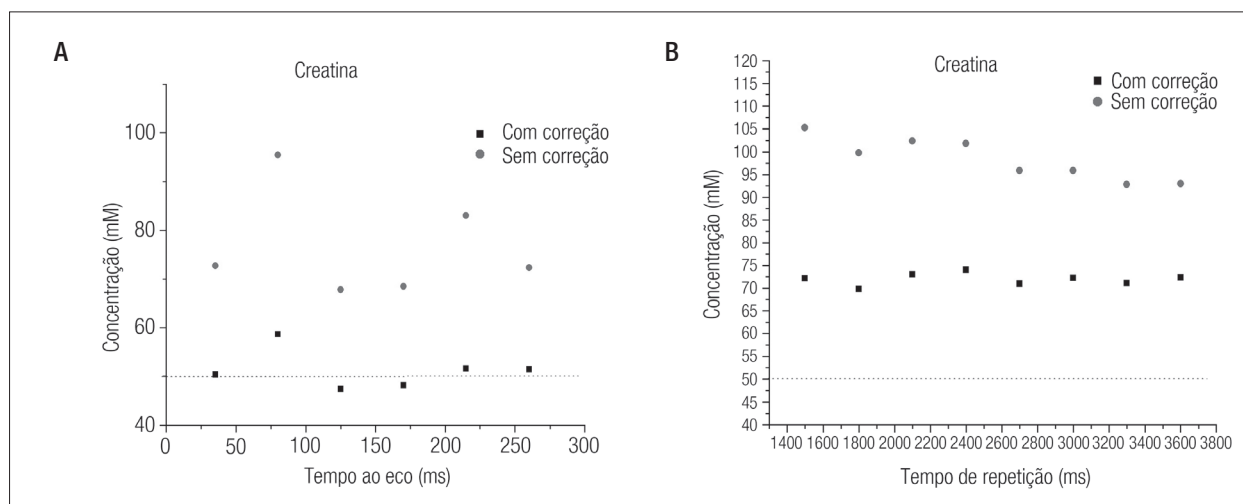


Figura 5. A) Concentrações estimadas de Cr com e sem correção dos efeitos de relaxação na série de espectros com TE variável. B) Concentrações estimadas de Cr com e sem correção dos efeitos de relaxação na série de espectros com TR variável. Em ambos os gráficos a linha tracejada representa a concentração esperada.

Referências

1. Brief EE, Whittall KP, Li DKB, MacKay AL. Proton T2 relaxation of cerebral metabolites of normal human brain over large TE range. *NMR Biomed.* 2005;18(1):14-8.
2. Brief EE, Whittall KP, Li DKB, MacKay AL. Proton T1 relaxation times of cerebral metabolites differ within and between regions of normal human brain. *NMR Biomed.* 2003;16(8):503-9.
3. Mlynárik V, Gruber S, Moser E. Proton T1 and T2 relaxation times of human brain metabolites at 3 T. *NMR Biomed.* 2001;14(5):325-31.
4. Provencher S. LC Model and LC Mgui User's Manual. [citado 17 mar 2010]. Disponível em: <http://s-provencher.com/pub/LCModel/manual/manual.pdf>.