

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA - MESTRADO

NATHASSIA KADLETZ AURICH

**CONFIABILIDADE EM RESSONÂNCIA MAGNÉTICA FUNCIONAL NO ESTADO
DE REPOUSO EM DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE PRÉ-PROCESSAMENTO**

PORTO ALEGRE

2014

NATHASSIA KADLETZ AURICH

**CONFIABILIDADE EM RESSONÂNCIA MAGNÉTICA FUNCIONAL NO ESTADO
DE REPOUSO EM DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE PRÉ-PROCESSAMENTO**

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do grau de Mestre pelo Programa de
Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia
Elétrica da Pontifícia Universidade Católica do
Rio Grande do Sul

ORIENTADOR: Prof. Dr. Alexandre Rosa Franco

CO-ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Ana Maria Marques da Silva

Porto Alegre

2014



CONFIABILIDADE EM RESSONÂNCIA MAGNÉTICA FUNCIONAL NO ESTADO DE REPOUSO EM DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE PRÉ-PROCESSAMENTO

CANDIDATA: NATHASSIA KADLETZ AURICH

Esta Dissertação de Mestrado foi julgada para obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA ELÉTRICA e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

DR. ALEXANDRE ROSA FRANCO - ORIENTADOR

DRA. ANA MARIA MARQUES DA SILVA - CO-ORIENTADORA

BANCA EXAMINADORA

**DR. JOÃO BATISTA SOUZA DE OLIVEIRA - DEPARTAMENTO DE FUNDAMENTOS DA
COMPUTAÇÃO - FACULDADE DE INFORMÁTICA - PUCRS**

DR. DARIO F. GUIMARÃES DE AZEVEDO - DO PPGE/FENG - PUCRS

DR. RICARDO MEURER PAPALÉO - DO PGETEMA/FENG - PUCRS

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha família, que sempre me apoiou para cumprir essa etapa compreendendo minhas ausências em alguns momentos. Especialmente aos meus pais, Eliane e José Luiz, que desde o início do mestrado me proporcionaram tudo para que eu me sentisse confortável, me apoiando e incentivando para que eu concluísse esse objetivo. Agradeço muito por terem me dado o carinho e incentivo durante toda essa trajetória.

Ao meu namorado, Eduardo, que sempre esteve ao meu lado, me dando conselhos e me tratando com todo o amor e carinho. Trilhamos caminhos parecidos durante boa parte do meu mestrado, nossas dúvidas e angústias puderam ser compartilhadas, e por isso tudo ficou mais leve. Obrigada por ter essa paciência e atenção comigo!

Agradeço ao meu orientador, Prof. Alexandre Franco por ter apostado em mim desde o início, por estar sempre acessível e ter me colocado pra cima nos momentos em que eu estava cansada. Admiro muito o trabalho que fazes hoje como professor, como líder e principalmente para a ciência. Obrigada por me ensinar a ser pesquisadora e sempre querer que eu desse meu melhor!

Agradeço minha co-orientadora, Prof. Ana Maria Marques. Muito obrigada por apostar em mim, desde os tempos de graduação, por me incentivar a entrar no mestrado, por me apoiar nos momentos difíceis em que eu achei que não daria certo e por me mostrar o caminho da ciência. És um exemplo de mulher e de profissional para mim.

Gostaria de agradecer aos meus colegas de laboratório, Mônica, Rafaeli, Guilherme Sehnem, Luiz, Guilherme Peixoto e Caroline Froehlich por todo o apoio. Ao Zé, que quando eu cheguei já estava no Labima e desde o início me ajudou com minhas dúvidas sobre programação. Obrigada pela companhia e pela amizade!

Aos meus amigos, Nelso Bedin, Leandro Chuck, Henrique Lasevitch e Leandro Disiuta pelas tardes de estudo, pela companhia e pelo as risadas. Eu sabia que sempre que se eu precisasse de apoio era só ir até vocês que seria recebida de braços abertos. Obrigada pela amizade!

Agradeço à secretaria de Pós-Graduação em Engenharia, especialmente à Denise e ao Anderson pela disponibilidade, simpatia e gentileza. Obrigada pela ajuda!

Ninguém vence sozinho. Sou muito grata por ter ao meu redor pessoas em quem posso me espelhar e com quem posso contar. Obrigada a todos!

RESUMO

A Ressonância Magnética Funcional no estado de repouso (rs-fMRI, do inglês *resting state functional Magnetic Resonance*) permite obter informações a respeito das áreas de conectividade funcional do cérebro. Porém, a visualização dessa conectividade só é possível após aplicar uma série de etapas de processamento de imagens antes que se possa avaliar a conectividade cerebral. Considerando a limitação na quantificação dos dados de rs-fMRI, e sabendo que uma fonte de variação crítica para a comparação entre os estudos é o fato de cada um deles remover, incluir ou mudar parâmetros nos passos de pré-processamento de rs-fMRI, é necessário um estudo para analisar a confiabilidade de diferentes metodologias de pré-processamento de dados de rs-fMRI. Para tanto, a Teoria dos Grafos (TG) foi utilizada como parâmetro final para avaliar a conectividade. Neste presente trabalho, foram testadas sete estratégias de pré-processamento e foi avaliada a confiabilidade entre elas quando são feitas medidas de TG. A amostra utilizada neste trabalho é de uma base de dados pública e é composta por indivíduos controle. As medidas de TG foram calculadas nas diferentes estratégias, após aplicar um método de parcelamento do cérebro em 190 regiões. Foram calculadas as seguintes medidas: eficiência global, comprimento do caminho característico, coeficiente de agrupamento e eficiência local. Os resultados indicaram que existe uma diferença significativa nas medidas de teoria dos grafos quando o pré-processamento é feito de diferentes maneiras. Foi encontrado também que parâmetros de estimativa de ruído são correlacionados com as medidas de TG. Além disso, observa-se que o nível de limiarização escolhido na matriz de conectividade pode afetar significativamente as medidas de TG, sendo necessário um estudo mais aprofundado a respeito deste tema. Concluiu-se, baseado na amostra utilizada neste trabalho, que o método de *scrubbing* por *outliers* pode aumentar a confiabilidade das medidas de TG e reduzir a sua dependência com o movimento da cabeça do paciente.

Palavras-chave: Ressonância Magnética Funcional. Estado de Repouso. Teoria dos Grafos. Confiabilidade. Conectividade Funcional.

ABSTRACT

Resting State functional Magnetic Resonance Imaging (rs-fMRI) provides information about the functional connectivity of brain areas. However, prior to calculating the functional connectivity of the brain, there is a choice of several preprocessing steps that need to be selected. A critical source of variation between studies arises from distinct preprocessing approaches prior to the functional connectivity analysis. Therefore, a study to examine the reliability of different methods for pre-processing data from rs-fMRI is necessary. In this study, seven preprocessing strategies were tested and the reliability was evaluated between them in Graph Theoretical (GT). The sample used in this study is from a public database and consists of control subjects. Measures of GT were calculated using different strategies, after applying a method of subdividing the brain into 190 regions of interest. The following measures were calculated: global efficiency, characteristic path length, clustering coefficient and local efficiency. The results indicate that there is a significant difference in measurements of GT depending on the preprocessing strategy selected. It was also found that noise estimation parameters are correlated with GT measures. Moreover, it is observed that the level of thresholding chosen in the connectivity matrix can affect the measurements of GT, therefore further studies regarding this topic are needed. It was concluded, based on the sample used in this work that the method of scrubbing by outliers could increase the reliability of measurements of GT and reduce dependence on the movement of the patient's head.

Key Words: fMRI. Resting State. rs-fMRI. Graph Theoretical Measurements. Reliability. Functional Connectivity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Resposta BOLD	17
Figura 2 - Diferença na aquisição do sangue oxigenado e desoxigenado com as sequências de pulso SE e GRE.	18
Figura 3 - Relaxação T2 e T2*	19
Figura 4 - À direita: preenchimento do espaço k em uma sequência convencional. À esquerda: preenchimento do espaço k em um sequência EPI.	20
Figura 5 - Sete redes obtidas no estado de repouso.	21
Figura 6 - Fluxograma das etapas de pré-processamento.	23
Figura 7 - Máscara CC200.	35
Figura 8 - Construção da Matriz de Conectividade (MC).	36
Figura 9 – Esquema do teste 1 - ANOVA.	40
Figura 10 - Esquema do teste post-hoc - teste <i>t</i> pareado.	40
Figura 11 – Teste 2 – cálculo da matriz de desvio padrão da matriz de conectividade entre os 102 sujeitos.	41
Figura 12 - Esquema do teste 3 - correlação das estimativas de ruído <i>versus</i> medidas de TG.	42
Figura 13 - Representação gráfica da média da E_{glob} em diferentes estratégias de pré-processamento.	43
Figura 14 - Média da E_{glob} em diferentes níveis de limiarização, separadas por estratégia de pré-processamento.	44
Figura 15 - Representação gráfica da média do CCC em diferentes estratégias de pré-processamento.	45
Figura 16 - Média da CCC em diferentes níveis de limiarização, separadas por estratégia de pré-processamento.	45
Figura 17 - Representação gráfica da média do CA em diferentes estratégias de pré-processamento.	46
Figura 18 - Média da CA em diferentes níveis de limiarização, separadas por estratégia de pré-processamento.	47
Figura 19 - Representação gráfica da média do E_{loc} em diferentes estratégias de pré-processamento.	48
Figura 20 - Média da E_{loc} em diferentes níveis de limiarização, separadas por estratégia de pré-processamento.	48
Figura 21 - Desvio padrão da matriz de conectividade.	50

LISTA DE ABREVIATURAS

AFNI - Analysis of Functional NeuroImages

ALFF - Amplitude of Low Frequency Fluctuations

ANOVA - Analysis of variance

BCT - Brain Connectivity Toolbox

BOLD - Blood Oxygenation Level Dependent

CA - Coeficiente de Agrupamento médio

CCC - Comprimento do Caminho Característico

DP - Densidade de Prótons

E_{glob} - Eficiência Global

E_{loc} - Eficiência Local

EPI - Echo Planar Imaging

FCS - Fluido Cerebrospinal

FSL - FMRIB's Software Library

GRE - Gradiente Recalled Echo

ICA - Independent Component Analysis

ICC - Intraclass Correlation Coefficient

INDI - International Neuroimaging Data-sharing Initiative

MC - Matriz de Correlação

NITRC - Neuroimaging Informatics Tools and Resources Clearinghouse

ReHo - Regional Homogeneity

RER - Redes do Estado de Repouso

RF - Radiofrequência

RM - Ressonância Magnética

RMf - Ressonância Magnética funcional

rs-fMRI – resting state functional Magnetic Resonance

ROI - Region of Interest

SB - Substância Branca

SE - Spin Echo

SG - Sinal Global

SPM - Statistical Parametric Mapping

TDAH - Transtorno por Déficit de Atenção/Hiperatividade

TE - Tempo de Eco

TG - Teoria dos Grafos

TR - Tempo de Repetição

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	OBJETIVO GERAL.....	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3	FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	15
3.1	O SINAL E O CONTRASTE EM RESSONÂNCIA MAGNÉTICA.....	15
3.1.1	Formação da Imagem de RM.....	15
3.2	EFEITO BOLD.....	16
3.2.1	Relaxação T2*.....	17
3.3	SEQUÊNCIA DE PULSO.....	19
3.4	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA FUNCIONAL NO ESTADO DE REPOUSO E A CONECTIVIDADE FUNCIONAL CEREBRAL.....	21
3.5	ANÁLISE DE DADOS DE er-RMf.....	22
3.5.1	Pré-processamento de dados de Rs-fMRI.....	23
3.6	TEORIA DOS GRAFOS APLICADA EM IMAGENS DE RS-fMRI.....	28
3.7	CONFIABILIDADE DE MEDIDAS DE CONECTIVIDADE FUNCIONAL.....	30
4	METODOLOGIA.....	33
4.1	AMOSTRA.....	33
4.2	PRÉ-PROCESSAMENTO DOS DADOS.....	33
4.3	REGIÕES DE INTERESSE (NODOS).....	34
4.4	MEDIDAS DE TEORIA DOS GRAFOS.....	35
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
4.5.1	Teste 1 – Confiabilidade entre diferentes estratégias.....	39
4.5.2	Teste 2 – Confiabilidade da matriz de conectividade.....	41
4.5.3	Teste 3 – Correlação estimativas de ruído <i>versus</i> medidas de TG.....	41
5	RESULTADOS.....	43
5.1	TESTE 1 – CONFIABILIDADE ENTRE DIFERENTES ESTRATÉGIAS.....	48
5.2	TESTE 2 – CONFIABILIDADE DA MATRIZ DE CONECTIVIDADE.....	50
5.3	TESTE 3 – CORRELAÇÃO DE ESTIMATIVAS DE RUÍDO <i>VERSUS</i> MEDIDAS DE TG.....	51
6	DISCUSSÃO.....	53
7	CONCLUSÃO.....	59

REFERÊNCIAS	61
APÊNDICE A – Script gerador	65
APÊNDICE B – Script do pré-processamento	66
APÊNDICE C – Resultado completo do teste t pareado	74
APÊNDICE D – Resumo aceito na <i>Resting State Conference</i>	81
APÊNDICE E – Artigo submetido para a <i>Frontiers in Neuroscience</i>	83
APÊNDICE F – Artigo submetido para Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica.....	98

1 INTRODUÇÃO

O equipamento de Ressonância Magnética (RM) permite gerar imagens do corpo humano, mapeando características físicas que diferem entre os diversos elementos existentes na sua estrutura. Técnicas mais avançadas de imagem por RM permitem obter informações quantitativas do tecido estudado. Por exemplo, a Ressonância Magnética Funcional (RMf) permite obter informações a respeito das áreas de ativação ou da organização funcional (áreas de conectividade funcional) do cérebro. Porém, a visualização dessas áreas só é possível após aplicar uma série de métodos de processamento de imagens.

A RMf baseia-se no efeito BOLD (do inglês, *Blood Oxygenation Level Dependent*). O efeito BOLD explora as características magnéticas do sangue oxigenado e desoxigenado para obter diferenças de sinal necessárias para localização da ativação (OGAWA et al., 1990), por isso o BOLD é uma medida indireta da ativação neural. A RMf pode ser utilizada para verificar a variação do sinal BOLD quando ocorre uma ativação neural em um local responsável por algum processo cognitivo. Para isso, o paciente é instruído a realizar uma tarefa, que pode ser motora, de linguagem ou auditiva, entre outras. Além disso, existe a RMf no estado de repouso (Rs-fMRI), que se destaca pela ausência de tarefa, sendo utilizada para avaliar a conectividade funcional do cérebro (SMITH, 2012).

Na prática clínica, a RMf por tarefa tem sido usada como um exame realizado para mapear regiões do cérebro relacionadas a processos cognitivos simples, como os citados anteriormente. Geralmente, este mapeamento é realizado em pacientes que serão submetidos a intervenções neurocirúrgicas, de forma que as áreas sejam identificadas a fim de serem preservadas.

Atualmente há uma atenção especial voltada ao estudo da rs-fMRI justamente pelo fato dela não exigir que alguma tarefa seja desempenhada pelo paciente (FOX; GREICIUS, 2010). Na rs-fMRI, o paciente é instruído a ficar imóvel no equipamento, mantendo os olhos fixos em uma cruz e não pensar em nada em particular. Esta instrução facilita o desempenho de pacientes que tem alguma dificuldade em realizar tarefas cognitivas. No entanto, sabe-se que durante o estado de repouso, o sinal BOLD possui uma frequência de oscilação baixa (< 0,1 Hz) (LEE; SMYSER; SHIMONY, 2012). Por isso, sinais provenientes de fontes não neurais, como por exemplo o ciclo cardíaco e respiratório, o movimento do paciente, bem

como a sequência de pulso de aquisição dos dados, podem introduzir artefatos nas imagens de RMf. Esses artefatos podem inserir informações que resultem numa correlação errônea do sinal BOLD entre diferentes áreas, super ou subestimando as forças de conectividade funcional. Portanto, a análise dos dados adquiridos deve ser feita cuidadosa e criteriosamente, para que nenhum erro estatístico possa ser cometido devido ao ruído e aos artefatos eventualmente existentes (WEISSENBACHER et al., 2009).

Considerando a limitação na quantificação dos dados de Rs-fMRI, na etapa de pré-processamento dos dados são usados múltiplos filtros que minimizam a interferência de ruídos fisiológicos não neurais e os pequenos movimentos do paciente, minimizando os artefatos e permitindo identificar variações anatômicas entre os sujeitos (BIRN, 2012; WEISSENBACHER et al., 2009). No entanto, sabe-se que uma fonte de variação crítica para a comparação entre os estudos é o fato de cada um deles remover, incluir ou mudar parâmetros nos passos de pré-processamento de rs-fMRI.

Por isso, é necessário um estudo para otimização do método de processamento dos dados e das imagens, avaliando a influência de cada etapa, quando realizadas com diferentes ferramentas, acrescentando ou reduzindo etapas.

Para tanto, este trabalho utilizou um software de processamento de neuroimagens, denominado AFNI (do inglês, *Analysis of Functional NeuroImages*) (COX, 1996), que possui diversas ferramentas para auxiliar no processamento de dados de RMf, para analisar diferentes métodos de pré-processamento. Como forma de avaliação das metodologias de pré-processamento será analisada a confiabilidade do processamento de rs-fMRI por medidas de Teoria dos Grafos (TG) (RUBINOV; SPORNS, 2010). A TG vem sendo bastante explorada no campo da neuroimagem, pois permite a análise de sistemas dinâmicos complexos, traduzindo a análise das redes neurais em resultados quantificáveis.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é analisar como diferentes estratégias de pré-processamento de dados de rs-fMRI podem afetar medidas de TG.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a variância das medidas de TG entre os sujeitos para cada estratégia de pré-processamento;
- Avaliar os efeitos de diferentes níveis de limiarização da matriz de conectividade para cada estratégia de pré-processamento;
- Avaliar a variância da matriz de conectividade em cada estratégia de pré-processamento; e
- Avaliar a relação entre as medidas de TG e estimativas de ruído.

3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1 O SINAL E O CONTRASTE EM RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

3.1.1 Formação da Imagem de RM

O sinal em RM é baseado em quanto há de magnetização transversal no momento da aquisição do sinal, o que reflete diretamente as propriedades dos núcleos. O sinal é controlado pelas propriedades do tecido (densidades de prótons, tempo de relaxação T1 e tempo de relaxação T2) e por parâmetros de máquina (tempo de repetição, tempo de eco, ângulo de inclinação, etc.) (HAACKE et al., 1999).

Quando o paciente é colocado dentro do magneto, os spins dos prótons de hidrogênio, que estavam orientados randomicamente, se alinham ao campo magnético estático \mathbf{B}_0 produzido pelo magneto principal do equipamento de RM. Alguns spins se alinham paralelamente (*spin up*) e outros anti-paralelamente (*spin down*) ao campo magnético. Como existe um número maior de spins na direção paralela a \mathbf{B}_0 , é produzida uma magnetização longitudinal líquida, \mathbf{M}_z , diferente de zero. Portanto, a partir de agora, o termo spin se referirá àqueles resultantes do cancelamento mútuo entre o alinhamento paralelo e anti-paralelo e que realmente contribuem para o sinal de RM.

O momento magnético total, \mathbf{M} , é a soma vetorial de todos os momentos magnéticos nucleares, \mathbf{m} , individuais. Desse modo, pode-se separar os momentos magnéticos nucleares nas suas componentes \mathbf{m}_z e \mathbf{m}_{xy} . A componente \mathbf{m}_z corresponde ao eixo Z (eixo longitudinal) e a componente \mathbf{m}_{xy} gira no plano xy (plano transversal).

Para produzir sinal, é necessário que exista uma magnetização transversal, \mathbf{M}_{xy} , diferente de zero. Portanto, para que exista uma magnetização na direção do plano xy , um pulso de radiofrequência (RF) é emitido de forma que o vetor magnetização precessiona em torno do campo principal \mathbf{B}_1 . Esse pulso de RF deve corresponder à frequência exata de precessão dos spins, denominada frequência de Larmor. Um pulso de RF, ressonante, pode ter energia para mover o vetor magnetização para o plano transversal, reduzindo \mathbf{M}_z a zero, inverter o vetor \mathbf{M}_z , e fazer os spins precessionarem em fase.

A imagem por RM se baseia na emissão de sucessivos pulsos de RF. O intervalo entre uma emissão e outra do pulso de RF é chamado de tempo de repetição (TR). O tempo

entre a aplicação do pulso de RF e a amostragem do sinal é o tempo de eco (TE). TR e TE são os principais parâmetros para definir a ponderação em imagem de RM. As imagens de MRI podem ser ponderadas em T1, T2, e DP (densidade de prótons). Essas ponderações exploram as características de relaxação do tecido (relaxação T1 e T2). Há, ainda, a relaxação T2*, a qual será abordada com maior profundidade na subseção seguinte.

Quando o sinal é amostrado, as informações da imagem preenchem o espaço de frequência espacial, denominado espaço k. Visto como uma matriz, cujos eixos são k_x e k_y , o espaço k é o domínio no qual as informações sobre a imagem de RM são armazenadas, e está relacionado com o espaço da imagem pela transformada de Fourier, e é. A matriz é preenchida de acordo com a mudança dos gradientes de fase e de frequência, de forma que toda a informação relacionada à imagem esteja nessa matriz.

3.2 EFEITO BOLD

O modelo de detecção do sinal por efeito BOLD é um método indireto de detecção de sinapses, pois quando há atividade neural existe um aumento na quantidade de sangue rico em oxigênio. Sabendo que a hemoglobina oxigenada (diamagnética) e a hemoglobina desoxigenada (paramagnética) se comportam de modos diferentes quanto a suas características de RM, é possível – através de técnicas de processamento de imagens – detectar as regiões nas quais houve aumento de atividade neural (HUETTEL; SONG; MCCARTHY, 2004).

A característica paramagnética da hemoglobina faz com que haja perda de coerência de fase entre os spins devido à interação spin-spin e a inhomogeneidade do campo magnético local. Por isso, quanto maior a quantidade de sangue desoxigenado, menor o tempo T2, enquanto não é observado esse efeito com relação ao tempo de relaxação T1 (HUETTEL; SONG; MCCARTHY, 2004).

O tempo de resposta BOLD ao estímulo pode ser visto na Figura 1, denominada resposta hemodinâmica. Inicialmente, há um pico negativo que dura em torno de 2 segundos, seguido do pico principal de resposta BOLD que dura em torno de 5 segundos. No final da resposta, o sinal demora cerca de 1 minuto para retornar à linha de base, antecedido por um pico negativo (NORRIS, 2006).

Figura 1 – Resposta BOLD

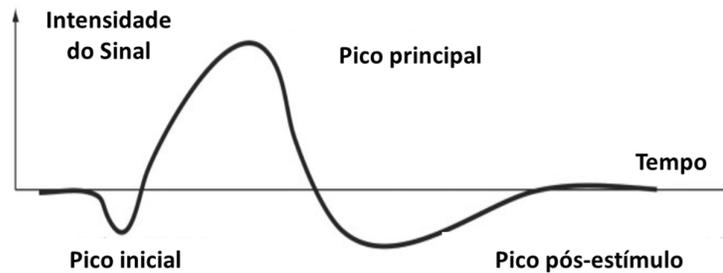


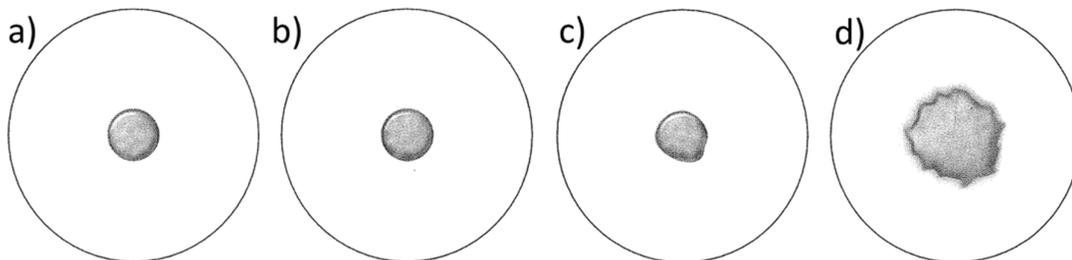
Gráfico padrão da resposta hemodinâmica quando ocorre um estímulo em alguma parte do cérebro. O pico inicial reflete o aumento da quantidade de hemoglobina desoxigenada no voxel, o pico principal dura em torno de 4 segundos. Fonte: Adaptado de NORRIS (2006).

O efeito BOLD se baseia na variação da magnitude da magnetização transversal, devido às mudanças na susceptibilidade magnética causadas pela diferença na quantidade de sangue desoxigenado quando há um aumento no fluxo sanguíneo no tecido estudado (ROSEN; BUCKNER; DALE, 1998). Ou seja, quando um objeto com alta susceptibilidade magnética é colocado em um campo magnético, ele causa uma defasagem nos spins, resultando em um decaimento mais acentuado da magnetização transversa que depende de $T2^*$ (veja subseção 3.2.1), diminuindo o sinal da RM. No entanto, como o sangue desoxigenado flui através dos capilares em direção às veias, decorrente do aumento de fluxo sanguíneo, a diferença entre o sangue oxigenado e desoxigenado diminui, aumentando o contraste BOLD (HUETTEL; SONG; MCCARTHY, 2004) (NORRIS, 2006).

3.2.1 Relaxação $T2^*$

O contraste das imagens de RMf cerebral faz uso das propriedades magnéticas das moléculas de hemoglobina (oxi ou desoxigenada), presentes nos tecidos cerebrais, as quais perturbam o campo magnético local. Essa perturbação pode ser medida levando em conta o tempo de relaxação $T2^*$ do tecido. A Figura 2 demonstra a diferença na imagem comparando o sinal do sangue oxigenado, com o do sangue desoxigenado. Percebe-se pela Figura 2d, que uma sequência de pulso (que será explicada na próxima seção) capaz de detectar o sinal $T2^*$ é sensível às inhomogeneidades do campo.

Figura 2 - Diferença na aquisição do sangue oxigenado e desoxigenado com as sequências de pulso SE e GRE.



Ogawa e colegas fizeram um experimento em que colocaram tubos de teste com sangue oxigenado (a e b) e desoxigenado (c e d) dentro de uma solução salina e observaram a diferença que ocorria no sinal entre duas aquisições de pulso: SE e GRE. Pode-se perceber que em (a) e (c), as quais foram adquiridas com SE, a diferença observada entre o sangue oxigenado e desoxigenado é mínima, quando comparada com a aquisição GRE nas figuras (b) e (d). (HUETTEL; SONG; MCCARTHY, 2004)

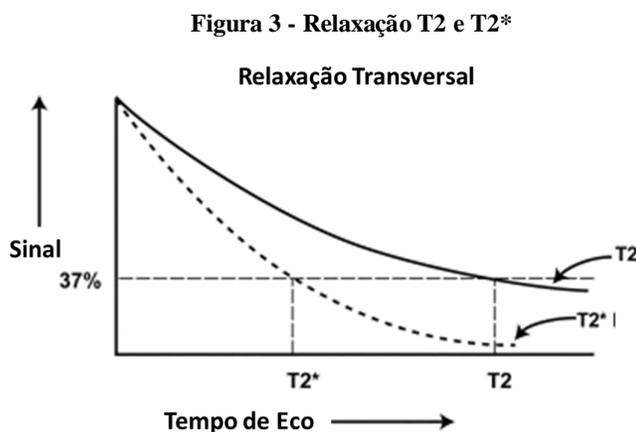
A defasagem dos momentos magnéticos no plano transversal ocorre por que spins próximos interagem uns com os outros, através do campo magnético local que eles próprios geram, fazendo com que eles percam a coerência entre eles. Por isso, a relaxação T2 também é conhecida por relaxação spin-spin (HAACKE et al., 1999).

As interações entre os spins são tão sensíveis, que qualquer inhomogeneidade no campo magnético faz com que cada spin presencie diferentes campos magnéticos, diminuindo ainda mais o tempo de relaxação transversal (

Figura 3). Dessa forma, o tempo de decaimento da magnetização transversal é reduzido a T2*, conforme equação (1):

$$\frac{1}{T2^*} = \frac{1}{T2} + \frac{1}{T2'} \quad (1)$$

onde $\frac{1}{T2'} = \gamma\Delta B$, no qual γ é a razão giromagnética do núcleo do átomo em questão (usualmente, na clínica, é o átomo de hidrogênio) e ΔB é a diferença do campo magnético local. (CHAVHAN et al., 2009).



O gráfico acima demonstra a magnetização transversal em função do tempo devido a relaxação spin-spin (T2) e spin-spin na presença de não uniformidades no campo magnético (T2*).

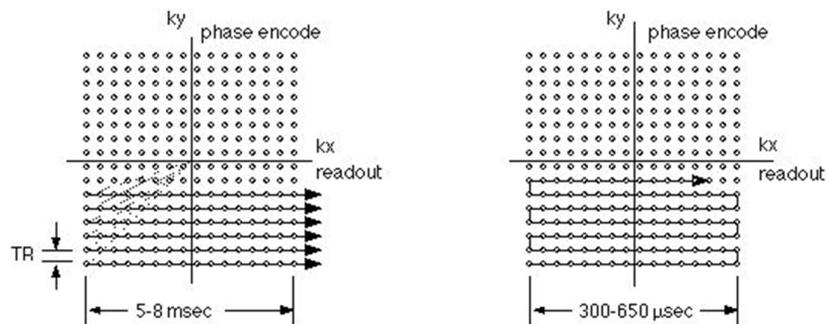
3.3 SEQUÊNCIA DE PULSO

O decaimento da magnetização transversal pela relaxação T2* é bastante rápido (HAACKER et al., 1999). Portanto, para adquirir as pequenas mudanças locais no campo magnético causadas pelo efeito BOLD foi necessário o desenvolvimento das chamadas sequências de pulso ultra-rápidas. A EPI (do inglês, *Echo Planar Imaging*), combinada com uma sequência de pulso sensível a T2* é capaz de adquirir o cérebro todo em segundos, sendo a mais utilizada em exames de RMf (ROSEN; BUCKNER; DALE, 1998) (NORRIS, 2006).

O termo EPI se refere à forma como o espaço k é preenchido. No preenchimento linha-a-linha em uma sequência convencional, cada linha do espaço k é preenchida a cada pulso de excitação (ou a cada TR). Na EPI, cada linha do espaço k é preenchida logo após a outra, resultando em um preenchimento completo do espaço k em uma única excitação por RF (COHEN, 1998).

Na Figura 4, a primeira imagem (à esquerda) representa o preenchimento do espaço k em uma aquisição convencional. A imagem à direita representa o preenchimento do espaço k em uma sequência EPI (COHEN, 1998).

Figura 4 - À direita: preenchimento do espaço k em uma sequência convencional. À esquerda: preenchimento do espaço k em um sequência EPI.



Fonte: (COHEN, 1998).

Para que a aquisição da imagem seja feita é necessário combinar uma sequência de pulso sensível às mudanças em T_2 ou T_2^* , para ser usada juntamente com a EPI.

Em um dos primeiros estudos de RMf, realizado em 1992 por Kwong e colegas, a sequência de pulso usada foi a eco de gradiente (GRE, do inglês *Gradiente Recalled Echo*) HUETTEL; SONG; MCCARTHY, 2004). No mesmo ano, Blamire e colegas investigaram mudanças no córtex visual fazendo uso da sequência de pulso eco de spin (SE, do inglês *Spin Echo*). Hoje em dia se usa a EPI/GRE.

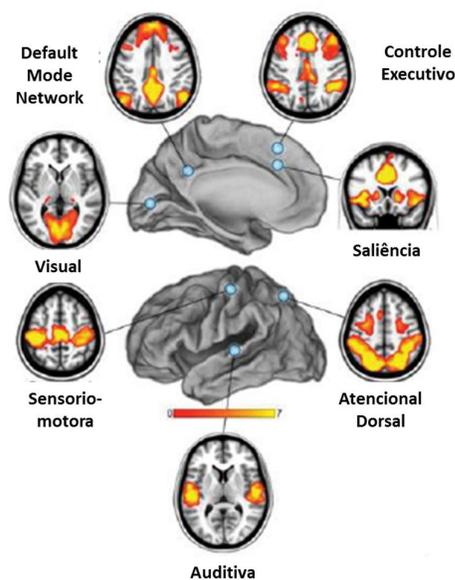
A diferença entre a sequência de pulso GRE e SE é que na GRE os próprios gradientes de campo recuperam parcialmente a fase dos spins, de modo que ainda seja possível medir o tempo T_2^* , e o ângulo de inclinação normalmente é menor do que 90° . A recuperação de fase dos spins acontece logo após a inversão da polaridade do gradiente de leitura, durante a primeira metade do tempo em que o gradiente está ligado. O eco é então amostrado. Já na sequência de pulso SE a restituição de fase acontece quando é enviado um pulso, de 180° , chamado pulso de refocalização (HUETTEL; SONG; MCCARTHY, 2004).

3.4 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA FUNCIONAL NO ESTADO DE REPOUSO E A CONECTIVIDADE FUNCIONAL CEREBRAL

A conectividade funcional é definida como “a correlação temporal entre eventos neurofisiológicos espacialmente distantes”(LEE; HARRISON; MECHELLI, 2003). Hoje sabe-se que, mesmo em repouso, áreas anatomicamente separadas demonstram uma atividade neuronal espontânea e algumas apresentam um grau de correlação entre si. Essa análise do cérebro em repouso se distingue da RMf em tarefa, pois não está baseada na comparação entre duas condições (tarefa *versus* base), mas detecta variações temporais semelhantes em regiões distintas. Assim, variações temporais similares do sinal BOLD em diferentes regiões indicam que existe uma rede neural acoplada e, portanto, são ditas como correlacionadas.

Biswal et al., (1995) foram os primeiros a identificar em exames de RMf que o córtex somatomotor primário esquerdo correlacionava-se, na ausência de qualquer atividade motora, com o sinal extraído de outras regiões corticais motoras do hemisfério direito. A frequência de oscilação do sinal BOLD medida foi menor do que 0,1 Hz. Posteriormente, outros estudos observaram outras redes que estão no cérebro, como a rede visual (LOWE; MOCK; SORENSON, 1998), a rede auditiva (CORDES et al., 2001), a *default mode network* (FOX et al., 2005) e muitas outras redes do estado de repouso (RER) (DAMOISEAUX et al., 2006). A Figura 5 mostra sete redes encontradas no estado de repouso por RAICHLE (2011).

Figura 5 - Sete redes obtidas no estado de repouso.



FONTE: (RAICHLE, 2011)

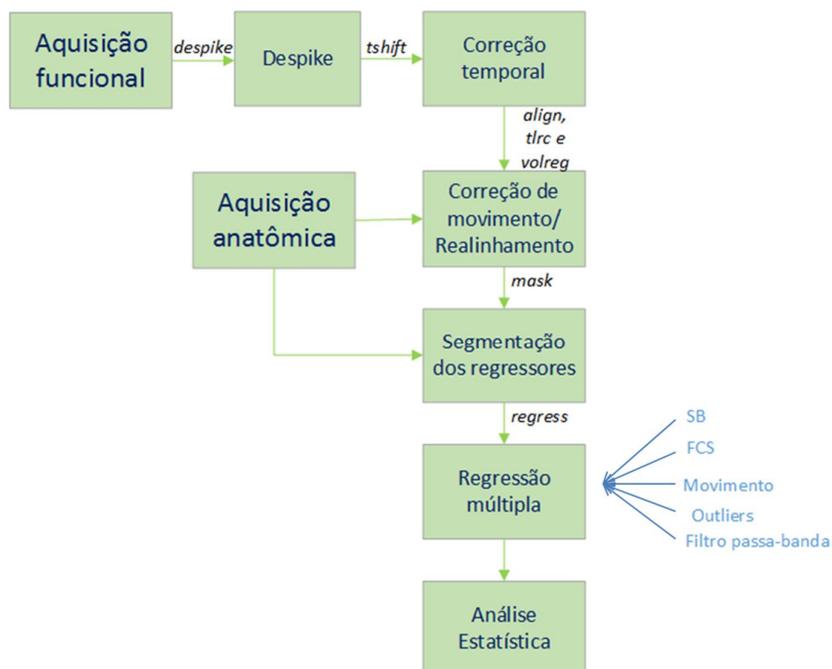
Estudos das RER por RMf mostrando que é possível fazer mapas da conectividade cerebral identificando padrões neurais e como as redes cerebrais estão organizadas (FOX; RAICHLE, 2007). Há diversos métodos de análise da atividade cerebral espontânea. As mais comuns são: Conectividade Funcional baseada em regiões de interesse (sementes), Análise por Componentes Independentes (ICA, do inglês *Independent Component Analysis*), Amplitude das Flutuações de Baixa Frequência (ALFF, do inglês *Amplitude of Low Frequency Fluctuations*), Homogeneidade Regional (ReHo, do inglês *Regional Homogeneity*) e TG (MARGULIES et al., 2010).

Usando TG, a complexidade das redes cerebrais pode ser resumida em nodos e arestas, permitindo obter informações quantitativas sobre a organização cerebral. A TG será abordada com maiores detalhes na subseção 3.6.

3.5 ANÁLISE DE DADOS DE rs-fMRI

Sabe-se que os dados de RMf são muito sensíveis a qualquer variável que interfira na aquisição das imagens, como artefatos provenientes de fontes de ruído (HUETTEL; SONG; MCCARTHY, 2009). Além disso, quando se realizam análises estatísticas de grupo, há variabilidade entre os sujeitos e a quantidade de dados é muito grande, o que leva a um grande número de variáveis a serem consideradas. Portanto, a análise de dados em rs-fMRI envolve diversos fatores: correção de movimento e temporal; normalização espacial; filtragem temporal; análises estatísticas e, finalmente, visualização dos resultados. O objetivo do pré-processamento dos dados é remover, ao máximo, qualquer interferência que possa prejudicar a análise dos dados. A Figura 6, demonstra um fluxograma das etapas de pré-processamento de dados de rs-fMRI.

Figura 6 - Fluxograma das etapas de pré-processamento.



Cada um dos blocos representa uma etapa do pré-processamento. *Despike*, *tshift*, *align*, *t1rc*, *volreg*, *mask*, e *regress* são os blocos que podem ser usado no programa *afni_proc.py* para realizar as etapas de pré-processamento. SB (substância branca), FCS (fluido cefalorraquidiano), movimento, outliers e filtro passa-banda são os regressores que podem ser escolhidos para a na regressão múltipla. Fonte: A autora.

De forma a detalhar as etapas de processamento de dados, na subseção 3.5.1 as correções de movimento, correção temporal, normalização espacial e filtragem temporal serão tratadas como parte do pré-processamento de rs-fMRI. Na subseção 3.6, por sua vez, será abordada a Teoria dos Grafos aplicada em rs-fMRI, como parte da análise de dados.

3.5.1 Pré-processamento de dados de rs-fMRI

Antes das análises estatísticas para identificar os padrões de ativação ou conectividade funcional em exames de RMf, é necessário fazer o pré-processamento dos dados e das imagens. Existem muitas estratégias de pré-processamento e a escolha da técnica pode influenciar no resultado final. Isso é particularmente importante em dados de rs-fMRI, nos quais o ruído proveniente de oscilações fisiológicas (respiração e batimento cardíaco) e o ruído resultante da cabeça podem se sobrepor ao sinal real da conectividade funcional. (LOHMANN et al., 2013)

No pré-processamento de dados de rs-fMRI, as etapas usuais incluem filtros espaciais, correção de movimento, correção temporal dos cortes normalização espacial, *despiking* e regressão com parâmetros de movimento (Figura 6) (JO et al., 2010) (FOX et al., 2005) (VAN DIJK et al., 2010). Algumas correções podem ser adicionadas, como filtro temporal, regressão da substância branca (SB) e fluido cerebrospinal (FCS), *scrubbing* e sinal global (SG).

Existem diversos softwares que podem ser usados para fazer o processamento de imagens de rs-fMRI: SPM (do inglês, *Statistical Parametric Mapping*) (FRISTON et al., 1991), FSL (do inglês, *FMRIB's Software Library*) (SMITH et al., 2004) e AFNI (COX, 1996). No AFNI, o comando *afni_proc.py* (REYNOLDS, 2006) é usado para fazer o pré-processamento dos dados de RMf. Especificamente, essa linha de comando, junto com as informações requeridas pelo programa, é capaz de gerar um *script* (código shell) para pré-processar os dados de RMf. Isso facilita a troca das ferramentas de pré-processamento intermediárias pelo usuário. As ferramentas são organizadas em blocos e o *script* gerado pode ser facilmente lido e modificado, caso necessário.

O primeiro bloco do *afni_proc.py* é o *tcat*. Como as imagens de RMf são adquiridas a partir do efeito T2*, na etapa de pré-processamento as três primeiras imagens que possuem efeito T1 são descartadas (VAN DIJK et al., 2010). Para isso, o bloco *tcat* usa a ferramenta *3dTcat* (http://afni.nimh.nih.gov/pub/dist/doc/program_help/3dTcat.html). Nesse *script*, essa ferramenta é usada para copiar os dados da aquisição funcional para outro diretório excluindo os 3 primeiros TRs.

Antes de começar as etapas de redução de ruído, o bloco *outcount* é automático no *afni_proc.py*, através da ferramenta *3dToutcount*. Ele faz a contagem da fração do número de *outliers* por TR da aquisição funcional. *Outliers* (COX, 2002) são aqueles voxels que estão fora dos valores “usuais” para uma dada linha de tempo. O cálculo de *outliers* é feito em cada voxel. Primeiramente, é calculado o desvio absoluto mediano (MAD, do inglês *Median Absolute Deviation*), conforme a equação (2):

$$MAD(x) = \text{mediana}_t\{|v(x,t) - m(x)|\} \quad (2)$$

onde $v(x,t)$ é um dado valor na linha de tempo de um voxel v e $m(x)$ é a mediana do voxel.

Valores $v(x,t)$ são considerados discrepantes quando estão fora do intervalo considerado na equação (3).

$$[m(x) - a * MAD(x), m(x) + a * MAD(x)] \quad (3)$$

onde

$$a = Q^{-1}\left(\frac{0.01}{N}\right) * \left(\frac{\pi}{N}\right)^{1/2} \quad (4)$$

onde N é o comprimento da série de tempo e $Q()$ é a inversa da Distribuição Acumulada (FDA) da Função Gaussiana.

A informação da contagem de *outliers* pode auxiliar como um controle de qualidade dos dados. Dados com uma fração grande de *outliers* pode indicar muito ruído. Esse ruído pode ter várias fontes: ruído térmico intrínseco ao paciente ou do equipamento eletrônico; ruído relacionado às imperfeições de hardware; ruído de fontes fisiológicas não-neurais, como o ruído proveniente do ciclo cardíaco e respiratório. Por isso, a informação da contagem de *outliers* pode ser importante a fim de investigar qualquer problema que possa interferir na análise dos dados.

O seguinte bloco, *despike*, usando a ferramenta *3dDespike* (http://afni.nimh.nih.gov/pub/dist/doc/program_help/3dDespike.html), analisa os picos da linha de tempo em cada voxel. Os grandes picos são comprimidos, mantendo a tendência da série de tempo. A ferramenta calcula o “*spikeness*”, s , de cada voxel conforme equação (5).

$$s = \frac{(\text{valor do voxel} - \text{curva de tendência})}{\text{sigma}} \quad (5)$$

onde sigma é o desvio padrão definido pela equação (6).

$$\text{sigma} = \sqrt{(\pi/2) * MAD} \quad (6)$$

A *curva de tendência* é definida pelo ajuste de uma curva em cada linha de tempo, em cada voxel; MAD é o desvio absoluto da mediana, que é a mediana da diferença absoluta entre a mediana dos dados e um determinado ponto.

Os valores de *spikeness*, s , maiores que o limiar $c1$ (padrão 2.5) são modificados de acordo com a equação (7).

$$s' = c1 + (c2 - c1) * \tanh\left(\frac{s - c1}{c2 - c1}\right) \quad (7)$$

onde $c2$ é o limite superior permitido a partir da curva (o programa tem como padrão 4).

O próximo bloco a ser executado é o bloco de correção temporal: *tshift*. Durante a aquisição da sequência de pulso EPI, os cortes podem ser adquiridos um após o outro: corte 1, corte 2, corte 3, corte 4 e assim por diante, a de forma sequencial. Ou a aquisição é feita de modo intercalado, na qual a informação de um corte é coletada, pula um corte e coleta outro da seguinte maneira: corte 1, corte 3, corte 5, corte 2, corte 4, etc. Independente da maneira como foram adquiridos os cortes, eles foram adquiridos em tempos diferentes. A ferramenta *3dTshift* é usada para correção temporal dos cortes. Assim, cada corte é realinhado separadamente à mesma origem temporal.

O corte que vai ser tomado como referência é definido pelo usuário e as informações sobre o TR e parâmetros da aquisição são retirados do cabeçalho da imagem. O usuário pode informar como os cortes foram adquiridos (forma sequencial ou intercalada) e o método de interpolação que se deseja usar, ou deixar que o programa use o próprio padrão (interpolação Fourier). Os dados são então deslocados no tempo e o ponto no tempo que não foi medido é estimado a partir dos valores de seus vizinhos. Isso é feito por interpolação temporal, sendo que o padrão é primeiramente remover a tendência linear, depois fazer a interpolação e, por fim, adicionar novamente a tendência. A tendência descreve o comportamento do sinal durante o tempo. Tipicamente em RMf, há uma tendência linear no sinal, porém não se sabe ainda a origem deste fenômeno. Ela é removida para que a visualização de outras variáveis se torne mais fácil e, após, é recolocada para o sinal retornar a sua condição inicial.

O próximo passo usa três blocos em conjunto: *volreg*, *align*, e *tlrc*. Agora os dados anatômicos e funcionais são registrados com o espaço padrão, que é um volume de imagens do cérebro usado para normalizar as imagens do conjunto de dados de um estudo. Assim, o cérebro do indivíduo segue um padrão, independentemente de seu tamanho ou dimensão. Isso permite que sejam feitas análises estatísticas mais confiáveis e que o resultado final da ativação ou da conectividade possa ser melhor localizado espacialmente.

O primeiro passo para o alinhamento da aquisição funcional com a anatômica, é realinhar a aquisição anatômica a uma imagem base do mesmo conjunto de dados, pelo comando *3dvolreg*. O resultado da movimentação do paciente nas direções de translação (x , y

e z) e na de rotação (*raw*, *pitch* e *roll*) são armazenados, para serem usados na etapa de regressão múltipla. Da mesma forma, os valores do movimento do paciente são armazenados para fazer o cálculo da estimativa de movimento. A estimativa de movimento é realizada calculando-se a raiz quadrada da soma dos quadrados em cada uma das direções, segundo a equação (8).

$$\begin{aligned} Mot(i)_s &= \\ &= ((x_i - x_{i-1})^2 + (y_i - y_{i-1})^2 + (z_i - z_{i-1})^2 \\ &\quad + (r_i - r_{i-1})^2 + (p_i - p_{i-1})^2 + (yaw_i - yaw_{i-1})^2)^{1/2} \end{aligned} \quad (8)$$

onde x , y e z são as estimativas de movimento de translação e r , p e yaw são as estimativas de movimento de rotação nas direções *raw*, *pitch* e *yaw*, respectivamente.

Após o movimento ser corrigido nas imagens funcionais, a aquisição funcional é alinhada com a aquisição anatômica pelo programa *align_epi_anat.py*, o qual usa a ferramenta *3dAllineate*. A ferramenta *3dAllineate* usa a função de custo de Correlação de Pearson Local (SAAD et al., 2009).

Em seguida, a aquisição anatômica é alinhada com o *template* (*MNI152*) do espaço padrão, escolhido pelo usuário via *@auto_tlrc*. Por fim, as matrizes de alinhamento são concatenadas de forma que o resultado seja o alinhamento das duas aquisições no espaço padrão.

A próxima etapa (bloco *mask*) consiste na criação de máscaras para segmentação dos sinais que serão usados como regressores: SB e FCS. Esta etapa é realizada na imagem anatômica, e a ferramenta usada para isso é o *3dSeg*.

Antes da regressão múltipla é feito o escalonamento pelo bloco *scale*. O objetivo do escalonamento é para fazer com que o sinal BOLD dos dados esteja na mesma escala. Isso possibilita a comparação entre aquisições e entre voxels individuais. No AFNI o padrão é escalonar a linha de tempo entre 0 e 200, com uma média de 100.

O último bloco, *regress*, é o de regressão múltipla. Essa etapa consiste em eliminar da série de tempo o máximo do sinal que não corresponde ao sinal BOLD. Durante o pré-processamento alguns dos dados que serão usados como regressores já foram preparados: as medidas de movimento da cabeça do paciente, o número de *outliers*, o sinal de tempo da SB e do FCS. Nesse bloco também existe a opção do filtro passa-banda, já que a frequência de oscilação espontânea do sinal BOLD é abaixo de 0,1 Hz.

As medidas de movimento da cabeça do paciente são resumidas em valores. Os valores *demean* (que será usada como regressor) e a derivada das medidas de movimento da cabeça são calculadas via *1d_tool.py* (http://afni.nimh.nih.gov/pub/dist/doc/program_help/1d_tool.py.html).

O sinal da SB contém informações que são independentes das mudanças no sinal BOLD e, além disso, exibe flutuações devido a instabilidade do equipamento, respiração e movimento do paciente. O sinal do FCS também possui informações sobre possíveis artefatos fisiológicos causados pelos movimentos cardíaco e respiratório (WEISSENBACHER et al., 2009; GAVRILESCU et al., 2008; VAN DIJK et al., 2010). As regiões de interesse com as linhas de tempo médio das máscaras de SB e FCS são obtidas através da ferramenta *3dmaskave* (http://afni.nimh.nih.gov/pub/dist/doc/program_help/3dmaskave.html).

Há, ainda, a opção de usar uma ferramenta para censurar os TR com *outliers* e/ou com muito movimento, na qual existem limites que são selecionados pelo usuário. O limite se baseia na média de *outliers* por TR e/ou a norma Euclidiana dos parâmetros de movimento.

A escolha do modelo ideal de regressão para redução de ruído é fundamental para otimização da metodologia de pré-processamento de rs-fMRI. Escolhas de diferentes metodologias, como a decisão do uso ou não do Sinal Global, podem explicar o motivo pelo qual ocorrem correlações negativas nas imagens de rs-fMRI (WEISSENBACHER et al., 2009) (MURPHY et al., 2009).

3.6 TEORIA DOS GRAFOS APLICADA EM IMAGENS DE RS-fMRI

A TG é um ramo da matemática que estuda a relação entre elementos que fazem parte de um conjunto. Um grafo G pode ser representado por $G(N,L)$, onde N é o conjunto de nodos e L é o conjunto de arestas. Em se tratando de redes cerebrais, os elementos (nodos, $n \in N$) seriam as regiões cerebrais e a relação entre essas regiões cerebrais seriam as arestas, $l \in L$. Dois nodos são conectados por uma aresta se o seu sinal BOLD varia no tempo com alguma similaridade.

Os grafos podem ser binários ou ponderados. Grafos binários indicam a presença ou não de conexão, enquanto grafos ponderados informam a força da conexão entre os nodos. Se a_{ij} é o estado da conexão, $a_{ij} = 1$ se tem conexão, caso contrário $a_{ij} = 0$ (RUBINOV; SPORNS, 2010). A partir dos nodos e arestas são construídas as matrizes de adjacência, na qual as

linhas e colunas são os nodos e a matriz demonstra a existência ou não de arestas entre eles. No caso de redes neurais cerebrais, as matrizes de adjacência também são chamadas matrizes de conectividade, justamente por demonstrar a correlação do sinal BOLD das diferentes áreas cerebrais.

A aplicação da TG em dados de RMf permite obter informações valiosas e que não são obtidas através das técnicas usuais de avaliação da conectividade cerebral (Cao et al., 2013). A TG está sendo cada vez mais aplicada em dados de neuroimagem, e as medidas vem sendo criadas e testadas quanto ao seu potencial de aplicabilidade para se estudar o conectoma do cérebro a nível estrutural e funcional (RUBINOV; SPORNS, 2010) (BULLMORE; SPORNS, 2009).

Estudos de neuroimagem demonstram que o cérebro possui uma topologia que varia conforme o estado mental, distúrbios neuropsicológicos (LIU et al., 2008), (SANZ-ARIGITA et al., 2010)(BASSETT et al., 2008)(RUBINOV et al., 2009)(BRIER et al., 2014), sexo (TIAN et al., 2011) e idade (ACHARD; BULLMORE, 2007) (MICHELOYANNIS et al., 2009)(WANG et al., 2010). Portanto, pode-se dizer que a TG é capaz de revelar a “identidade neural” do indivíduo. Caracterizando certos estados mentais, se torna possível o acompanhamento da evolução de certas doenças quando o paciente é submetido a algum tratamento, por exemplo.

A característica de plasticidade ou de mudança topológica faz com que qualquer fator possa interferir nos dados e influenciar as medidas de TG. Por exemplo, sabe-se que o movimento da cabeça altera as correlações em exames de RMf no estado de repouso, mesmo após a etapa de correção de movimento (Power, Barnes, Snyder, Schlaggar, & Petersen, 2012). Power et al., (2014) verificaram que o movimento causa uma mudança de sinal, frequentemente encontrada em todos os voxels do cérebro, que pode durar até 10s depois de acabar o movimento. Assim sendo, o movimento da cabeça pode ser responsável por criar correlações (falsos-positivos) ou esconder correlações (falsos-negativos). Por isso que, se tratando de medidas de TG dos grafos é importante saber qual o método de manipulação dos dados durante o pré-processamento é o mais fidedigno possível de modo a permitir a comparação dos resultados entre sujeitos.

Em TG, a escolha dos nodos deve ser cuidadosa, assim como os parâmetros de construção da rede, pois isso influencia diretamente a interpretação neurobiológica da topologia da rede (RUBINOV; SPORNS, 2010)(LIANG et al., 2012).

3.7 CONFIABILIDADE DE MEDIDAS DE CONECTIVIDADE FUNCIONAL

Em um uma recente revisão, (BENNETT; MILLER, 2010) destacaram a importância de se medir a confiabilidade em estudos com RMf. Eles perceberam que a confiabilidade dos dados de RMf não é alta quando comparada com outros métodos científicos. Há diversos métodos para avaliar a confiabilidade (ICC – do inglês, *Intraclass Correlation Coefficient* -, correlação de Pearson, coeficiente de variação, contagem de voxels, etc.), e a decisão de escolha sobre a análise estatística da confiabilidade depende do método que está sendo avaliado. Na RMf de tarefa, a confiabilidade do nível de ativação, tamanho e localização do cluster baseado na tarefa é de grande relevância (RAEMAEKERS et al., 2012).

Entretanto, em rs-fMRI, há muitos métodos para avaliar a conectividade funcional cerebral: Análise de Componentes Independentes (ICA, do inglês *Independent Component Analysis*), conectividade funcional baseada em regiões de interesse, Análise das Flutuações de Baixa Frequência (ALFF, do inglês *Analysis of Low Frequency Fluctuations*), Teoria dos Grafos, etc. (MARGULIES et al., 2010)(RUBINOV; SPORNS, 2010). Portanto, a confiabilidade pode ser acessada por diferentes análises.

FRANCO et al., (2013) analisou a confiabilidade e a reprodutibilidade de RER, por ICC, em dois métodos de pós-processamento (ICA e conectividade funcional baseada em *seeds*). MEINDL et al., (2010) realizaram um estudo para avaliar a confiabilidade da DMN por ICA, no qual os pacientes foram escaneados em três diferentes sessões, com duas aquisições rs-fMRI em cada sessão, para que fosse avaliada a confiabilidade entre e intra-sessão. A confiabilidade foi medida por número absoluto de voxels no volume de interesse (VOI, do inglês *Volume of Interest*), deslocamento do centro de gravidade dos VOIs e voxels que se sobrepõem aos VOIs. THOMASON et al., (2011) avaliou a confiabilidade do mapa de conectividade através de um estudo longitudinal com rs-fMRI em crianças. Usando a correlação de Pearson, eles avaliaram a confiabilidade intra e entre sessão de seis RER. TURNER et al., (2012) avaliaram a confiabilidade de ALFF em pacientes com esquizofrenia, por test-retest ICC, no qual os resultados indicaram uma confiabilidade moderada. Recentemente SKIDMORE et al., (2013) usaram o método de *cross-validation* para avaliar a

confiabilidade por ALFF em pacientes com doença de Parkinson. Recentemente, LIANG et al., (2012) e BRAUN et al., (2011) avaliaram a confiabilidade de fatores que podem influenciar as medidas de TG.

LIANG et al., (2012) avaliaram a escolha do método de formação da matriz de conectividade (correlação parcial e correlação de Pearson), o uso ou não da regressão do sinal global e a escolha da banda de frequência. Eles encontraram que as escolhas do método de formação da matriz de conectividade e das etapas de pré-processamento podem influenciar em medidas topológicas globais e locais. A correlação de Pearson quando realizada em dados que não utilizaram a regressão do sinal global foi o método que se mostrou mais confiável.

BRAUN et al., (2011) avaliaram a confiabilidade test-retest – por Coeficiente de Correlação Intraclasse (ICC, do inglês *Intraclass Correlation Coefficient*) – e ANOVA por medidas repetidas, das medidas de TG entre diferentes estratégias de pré-processamento e do nível de limiarização. Eles encontraram que as medidas de TG são dependentes do método de pré-processamento e do nível de limiarização.

Assim como os parâmetros de construção da rede podem afetar as medidas de TG, YAN et al., (2013) avaliaram a relação das medidas de TG com o movimento da cabeça. Com o objetivo de reduzir a dependência das medidas de TG, eles aplicaram diferentes métodos de pré-processamento, incluindo o *scrubbing* baseado no movimento da cabeça. Eles encontraram que as estratégias de pré-processamento testadas não foram suficientes para reduzir a dependência das medidas de TG com o movimento, a nível do sujeito, enquanto que nas análises a nível de grupo, elas podem oferecer vantagens.

A Tabela 1, na próxima página, apresenta diferentes estudos que usaram medidas de TG para analisar a conectividade funcional em indivíduos controle e também em indivíduos com doenças psicológicas/neurológicas. Pode-se perceber que as estratégias de pré-processamento não são as mesmas entre os diferentes trabalhos. Baseado nisso e sabendo que o pré-processamento influencia nas medidas de TG é necessário aprofundar no estudo da confiabilidade das medidas de TG usando diferentes estratégias de pré-processamento.

Tabela 1 - Lista das estratégias de pré-processamento em diferentes artigos que realizaram medidas de teoria dos grafos em dados de rs-fMRI.

Artigo	D	F PB	F PA	B	R por M	R por SB e FCS	S por M	R Pol	R por SG	RETRO
ANDERSON et al. (2011)	x	x			x	x				x
CAO et al. (2013)		x		x	x	x				
BRAUN et al. (2011)		x*		x	x	x			x	
LIU et al. (2008)		x								
LIANG et al. (2012)		x**							x** *	
SANZ-ARIGITA et al., (2010)			x							
ACHARD et al. (2006)					x					
ACHARD and Bullmore (2007)					x					
SALVADOR et al. (2005)					x					
VAN DEN HEUVEL et al. (2008)		x								
VAN DEN HEUVEL et al. (2009)		x								
YAN et al. (2013)		x			x** **	x	x	x	x	

D = Despiking; F = filtro; PB = passa-banda; PA = passa-alta; B = borramento; R = regressão; M = movimento; SB = substância branca; FCS = fluido cerebrospinal; SG = sinal global; Pol = polinomial; RETRO = retroicor.

* usando duas bandas de frequência (0.04 - 0.08 Hz), (0.0083 - 0.15 Hz)

** passa-banda em três bandas de frequências: 0.01–0.1 Hz; 0.01–0.027 Hz; and 0.027–0.073 Hz

***testado com e sem regressão por sinal global

**** realizado com três diferentes estratégias de regressão por movimento: regressão por realinhamento de corpo-rígido com 6 parâmetros, regressão por Friston 24 e regressão por Friston 24 acrescido do *scrubbing* baseado no movimento.

4 METODOLOGIA

4.1 AMOSTRA

A amostra utilizada nesse trabalho é composta por imagens de indivíduos que foram adquiridas para uma competição denominada ADHD 200 Competition (http://fcon_1000.projects.nitrc.org/indi/adhd200/). Essas imagens foram coletadas da base de dados do projeto *1000 Functional Connectomes Project* que faz parte da *International Neuroimaging Data-sharing Initiative* (INDI) (BISWAL et al., 2010) e está disponível publicamente no NITRC (*Neuroimaging Informatics Tools and Resources Clearinghouse*), disponível em: <http://www.nitrc.org/>.

As imagens foram coletados pelo grupo pertencente à Universidade de Pequim, China. Como a competição tinha o objetivo de compreender a base neural de indivíduos com TDAH (Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade), o critério de inclusão dos sujeitos, na amostra deste trabalho foram aqueles não diagnosticados com TDAH, ou seja, somente os indivíduos denominados controle.

O critério de exclusão da amostra foram aqueles sujeitos diagnosticados com qualquer tipo de doença neuro/psicopatológica e os canhotos. O tamanho da amostra deste trabalho, que obedece aos critérios acima, é de 109 sujeitos (média de idade = 11.62 ± 1.76 ; 43 mulheres). Todos os dados foram coletados em um equipamento de Ressonância Magnética da marca Siemens de 3T, com os seguintes parâmetros de aquisição: TR = 2000 ms, TE = 30 ms e tempo de aquisição de 8 min.

Para a análise deste trabalho os 109 indivíduos foram pré-processados com 7 diferentes estratégias de pré-processamento. No entanto, após o pré-processamento com a estratégia E, 7 indivíduos foram descartados devido à não finalização do pré-processamento. Portanto, a amostra final deste trabalho foi de 102 indivíduos.

4.2 PRÉ-PROCESSAMENTO DOS DADOS

As metodologias estão descritas abaixo e também na Tabela 3 de A até G, com seus respectivos nomes e o detalhamento das etapas de pré-processamento utilizadas.

Estratégia A (*min*) – Correção temporal, correção de movimento, escalonamento, normalização espacial, regressão dos parâmetros de movimento e *despiking*.

Estratégia B (*bp*) – Estratégia A e filtro passa-banda (0.01 a 0.1 Hz).

Estratégia C (*wm_csf*) – Estratégia A e regressão dos sinais da SB e FCS.

Estratégia D (*bp_wm_csf*) – Estratégia A, filtro passa-banda (0.01 a 0.1 Hz) e regressão dos sinais da SB e FCS.

Estratégia E (*scrubmot_bp_wm_csf*) – Estratégia D e *scrubbing* com os parâmetros de movimento.

Estratégia F (*scrubout_bp_wm_csf*) – Estratégia D e *scrubbing* com os *outliers*.

Estratégia G (*scrubmot_bp_brain_wm_csf*) – Estratégia F e regressão com o SG.

Tabela 2 – Estratégias de pré-processamento.

Estratégia de pré-processamento	Filtro passa-banda	Regressores SB e FCS	<i>Scrubbing</i> por movimento	<i>Scrubbing</i> por <i>outliers</i>	Regressão com Sinal Global
A					
B	x				
C		x			
D	x	x			
E	x	x	x		
F	x	x		x	
G	x	x	x		x

Descrição das diferentes estratégias de pré-processamento realizadas neste trabalho, com base em revisão de literatura prévia (tabela 1).

4.3 REGIÕES DE INTERESSE (NODOS)

Para determinar as medidas de teoria dos grafos foi aplicado um método de parcelamento que divide o cérebro em 190 regiões de interesse (Figura 7) (ROI, do inglês

Regions of Interest) (CRADDOCK et al., 2012). Para cada sujeito, a média da série de tempo de cada ROI foi calculada e usada para realizar as medidas de teoria dos grafos.

Figura 7 - Máscara CC200.

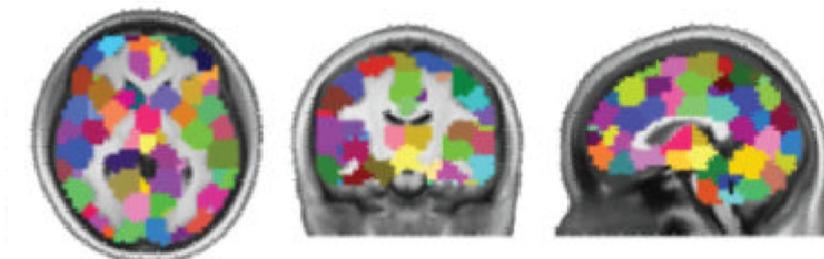
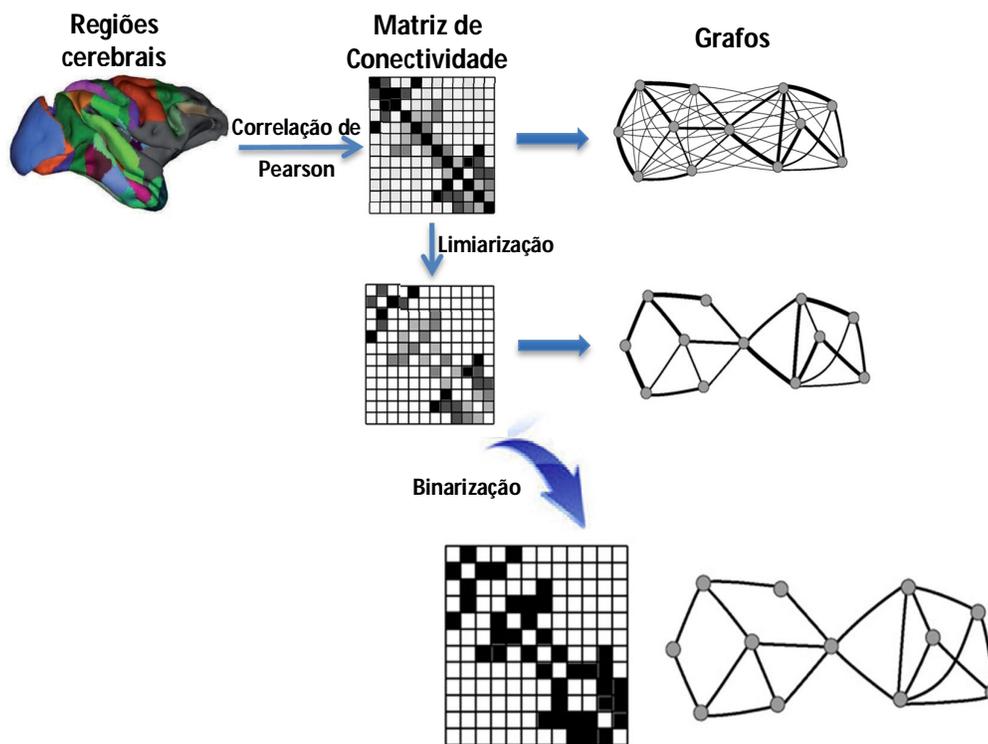


Figura representativa da segregação gerada pela máscara CC200, nos planos axial, coronal e sagital. Fonte: Adaptado de (CRADDOCK et al., 2012).

4.4 MEDIDAS DE TEORIA DOS GRAFOS

A matriz de conectividade (MC) foi estimada por correlação de Pearson nas 190 regiões entre si. Antes de calcular as medidas de TG foram aplicados diferentes níveis (0,2; 0,3; 0,4 e 0,5) de limiarização na MC. A Figura 8 demonstra como a MC é construída. Após passar os dados por uma máscara que subdivide o cérebro em diversas regiões, os sinais BOLD dessas regiões são correlacionados entre si, por correlação de Pearson. A MC é composta por linhas e colunas que representam os nodos, e a matriz toda representa as arestas. A partir disso, a MC é limiarizada e, no nosso caso, binarizada.

Figura 8 - Construção da Matriz de Conectividade (MC).



A MC é composta por linhas e colunas que representam os nodos, e a matriz toda representa as arestas. FONTE: Adaptado de (RUBINOV; SPORNS, 2010) (BULLMORE; SPORNS, 2009).

Para fazer as medidas de TG foi usado um software livre, BCT (do inglês, *Brain Connectivity Toolbox*) (RUBINOV; SPORNS, 2010). O comprimento do caminho característico (CCC), a eficiência global (E_{glob}), o coeficiente de agrupamento médio (CA) e a eficiência local média (E_{loc}) foram calculadas para cada sujeito, em cada uma das estratégias de pré-processamento e em cada nível de limiarização. A Tabela 3 define matematicamente as medidas de TG utilizadas neste trabalho.

Tabela 3 - Descrição matemática das medidas de Teoria dos Grafos, usadas neste trabalho.

Medida	Definição de grafos binários e não-direcionados
Conceitos básicos e notações	<p>N é o conjunto de todos os nodos da rede</p> <p>n o número dos nodos</p> <p>L o conjunto de todas as arestas da rede</p> <p>l o número das arestas</p> <p>(i,j) é a aresta entre os nodos i e j, $(i,j \in N)$.</p> <p>a_{ij} é o estado da conexão entre i e j: $a_{ij} = 1$ quando existe uma ligação (i,j); $a_{ij} = 0$ em outros casos.</p>
Grau: número de arestas conectadas ao nodo	$k_i = \sum_{j \in N} a_{ij}$
Caminho de menor comprimento	$d_{ij} = \sum_{a_{uv} \in g_{i \leftrightarrow j}} a_{ij},$ <p>onde $g_{i \leftrightarrow j}$ é o menor caminho (geodésico) entre i e j.</p>
Número de triângulos	<p>Número de triângulos em torno de um nodo i,</p> $t_i = \frac{1}{2} \sum_{j,h \in N} a_{ij} a_{ih} a_{jh}$
Eficiência Global	$E_{glob} = \frac{1}{n} \sum_{i \in N} E_{glob_i} = \frac{1}{n} \sum_{i \in N} \frac{\sum_{j \in N, j \neq i} d_{ij}^{-1}}{n-1},$ <p>onde E_{glob_i} é a eficiência do nodo i.</p>
Comprimento do Caminho Característico	$CCC = \frac{1}{n} \sum_{i \in N} CCC_i = \frac{1}{n} \sum_{i \in N} \frac{\sum_{j \in N, j \neq i} d_{ij}}{n-1},$ <p>onde CCC_i é a distância média entre o nodo i e todos os outros.</p>
Coefficiente de Agrupamento	$CA = \frac{1}{n} \sum_{i \in N} CA_i = \frac{1}{n} \sum_{i \in N} \frac{2t_i}{k_i(k_i-1)},$ <p>onde k_i é o grau do nodo ($k_i = \sum_{j \in N} a_{ij}$), CA_i é o coeficiente de agrupamento do nodo i ($CA_i = 0$ para $k_i < 2$).</p>

Eficiência Local

$$E_{loc} = \frac{1}{n} \sum_{i \in N} E_{loc,i} = \frac{1}{n} \sum_{i \in N} \frac{\sum_{j,h \in N, j \neq i} a_{ij} a_{ih} [d_{jh}(N_i)]^{-1}}{k_i(k_i-1)},$$

onde $E_{loc,i}$ é a eficiência local do nodo i , e $d_{jh}(N_i)$ é o comprimento do menor caminho entre j e h , que contém somente os vizinhos de i .

Fonte: Adaptado de RUBINOV & SPORNS (2010).

O coeficiente de agrupamento, CA_i , de uma aresta v_i com grau k_i (número de arestas conectadas ao nodo) é definido como a razão do número de arestas a_k existentes entre os vizinhos de v_i e o número máximo de arestas possíveis entre estes vizinhos.

A eficiência da rede está relacionada com a capacidade da rede em transmitir a informação (MARGULIES et al., 2010). A eficiência local do nodo, $E_{loc,i}$, se refere a transmissão da informação em cada nodo. Alta eficiência local em um nodo significa que ele está em um grupo de nodos altamente conectado, enquanto baixa eficiência local significa que seus nodos vizinhos estão fracamente conectados (POWER et al., 2011).

A eficiência local, assim como o coeficiente de agrupamento, são medidas de segregação funcional. Ou seja, são medidas que quantificam grupos interconectados que são especializados em realizar determinados processos neurais (RUBINOV; SPORNS, 2010), enquanto eficiência global e comprimento do caminho característico são medidas de integração funcional, que é a capacidade que áreas especializadas, separadas no cérebro, tem de se comunicar.

A média do comprimento do caminho mais curto entre todos os pares de nodos da rede é determinado pelo comprimento do caminho característico, CCC , enquanto a eficiência global, E_{glob} , é o inverso da média do comprimento do caminho mais curto.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Primeiramente, foi calculada a média e a variância de cada uma das medidas de TG, em cada nível de limiarização e em cada estratégia de pré-processamento.

Em seguida, foram feitas três análises estatísticas distintas para avaliar a confiabilidade das diferentes estratégias de pré-processamento e também avaliar a relação com a estimativa de movimento. As análises foram divididas em teste 1, teste 2 e teste 3.

4.5.1 Teste 1 – Confiabilidade entre diferentes estratégias

A confiabilidade entre diferentes estratégias foi calculada por repetidas medidas de Análise de Variância (ANOVA, do inglês *Analysis of variance*) simples por medidas repetidas.

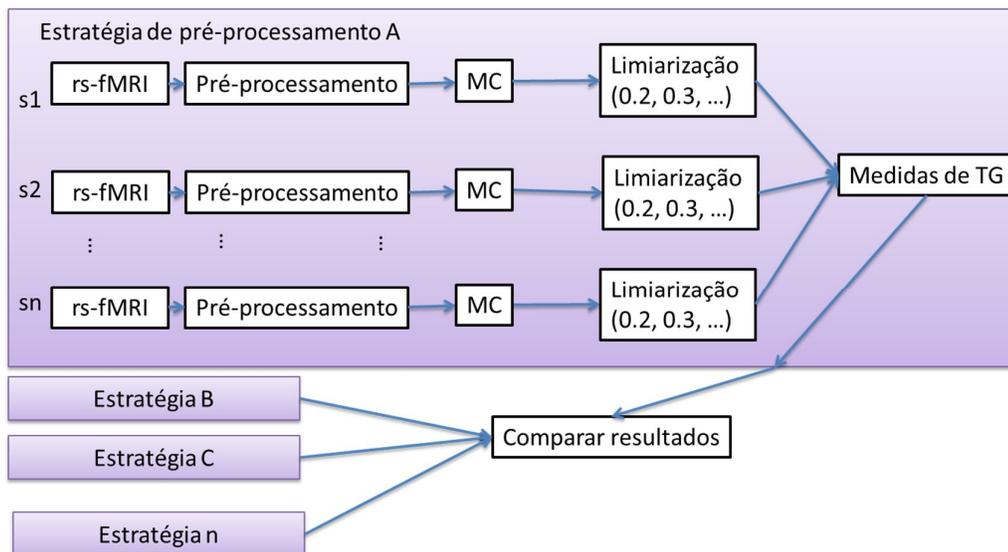
ANOVA é um teste usado para comparar diferentes condições, ou tratamentos, a que um experimento que se deseja avaliar foi submetido, permitindo avaliar a variabilidade da amostra em diferentes condições. No caso deste trabalho, as diferentes condições são as diferentes estratégias de pré-processamento. As estratégias de pré-processamento são ditas variáveis independentes e correspondem a um fator. As diferentes estratégias são os diferentes níveis do fator e a variável dependente (resposta) é cada uma das medidas de TG.

Usamos a ANOVA simples por medidas repetidas, pois os 102 indivíduos foram avaliados da mesma maneira em sete condições diferentes. O que se quer saber nesse caso é se as estratégias possuem a mesma variação ou não.

Na ANOVA é testado se todas as médias são iguais, o que constitui a hipótese nula, H_0 . A hipótese alternativa, H_1 , seria de que pelo menos uma das médias é diferente. No entanto, dada a rejeição de H_0 , não se tem como saber, a partir da ANOVA, qual ou quais as médias que são diferentes. Portanto, se faz necessário outro teste, chamado *post-hoc* que identifica quais os pares de grupos que diferem. No presente trabalho foi usado o teste t com correção de Bonferroni.

A análise estatística foi feita em cada medida de TG e em cada nível de limiarização (0,2; 0,3; 0,4 e 0,5), resultando em 16 ANOVAS simples. A Figura 9 apresenta um esquema de como foi feita a ANOVA por medidas repetidas.

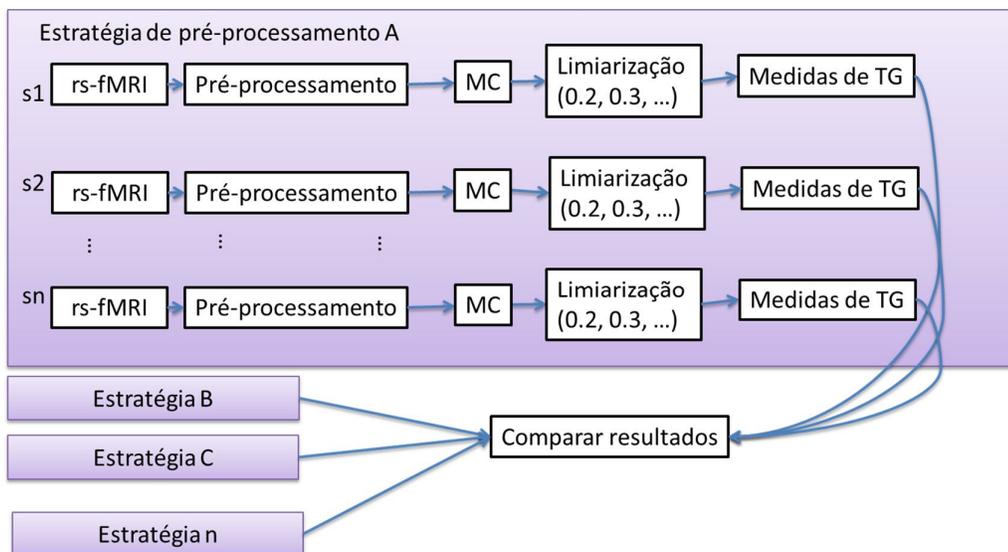
Figura 9 – Esquema do teste 1 - ANOVA.



Cada uma das medidas de TG em cada nível de limiarização foi comparada entre as diferentes estratégias de pré-processamento por ANOVA de medidas repetidas. MC é matriz de conectividade e TG é teoria dos grafos.

Fonte: a autora.

Em seguida foram feitos testes t pareados, a fim de calcular diretamente as diferenças entre as estratégias. A Figura 10 mostra um esquema sobre esse teste.

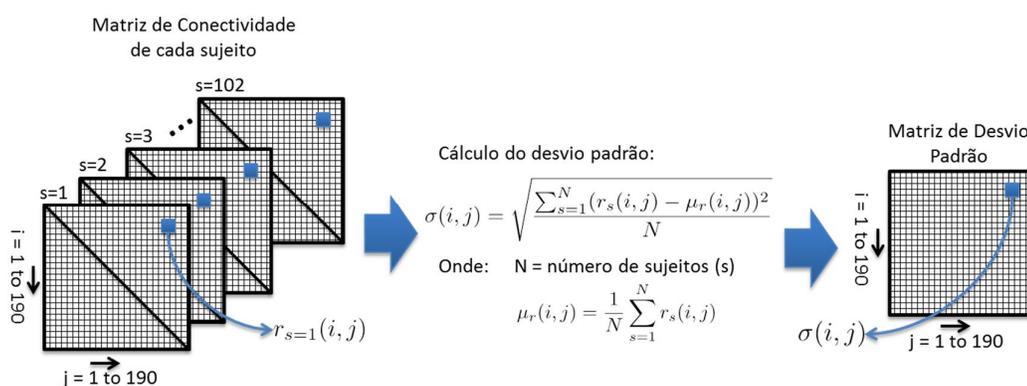
Figura 10 - Esquema do teste post-hoc - teste t pareado.

Foi realizado o teste t pareado comparando cada uma das medidas de TG (teoria dos grafos), em cada nível de limiarização, entre cada um dos sujeitos aos pares de diferentes estratégias. Fonte: a autora.

4.5.2 Teste 2 – Confiabilidade da matriz de conectividade

Com a finalidade de avaliar como as estratégias de pré-processamento afetam os dados funcionais, foi testada a confiabilidade da MC, sem o cálculo das medidas de TG. Para cada par de nodos o desvio padrão da correlação de Pearson foi calculado entre os 102 pacientes. Assim, para cada estratégia de pré-processamento (A,B,C...G) há uma matriz de desvio padrão da MC, que estima quanto há de variância entre os sujeitos em cada par de nodos. A Figura 11 representa o cálculo da matriz de desvio padrão. Adicionalmente, a correlação média foi calculada para cada estratégia de pré-processamento.

Figura 11 – Teste 2 – cálculo da matriz de desvio padrão da matriz de conectividade entre os 102 sujeitos.

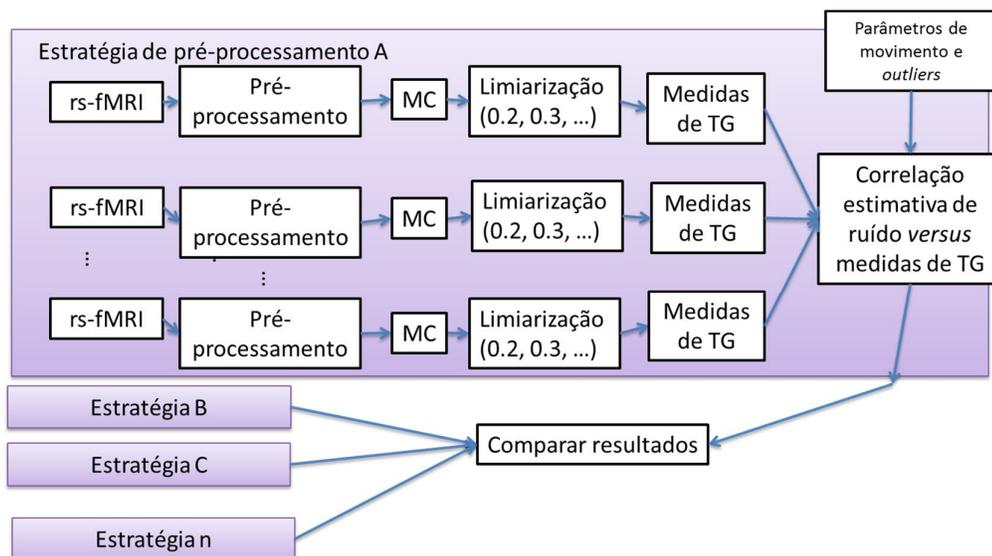


Fonte: A autora

4.5.3 Teste 3 – Correlação de estimativas de ruído *versus* medidas de TG

Foi avaliada a relação do movimento da cabeça do paciente e o número de *outliers* com as medidas de teoria dos grafos por correlação de Pearson. O coeficiente de correlação, r , foi calculado para cada paciente, em cada medida de TG, em cada nível de limiarização, conforme Figura 12.

Figura 12 - Esquema do teste 3 - correlação das estimativas de ruído *versus* medidas de TG.



Foi feita a correlação das medidas de teoria dos grafos (TG) com as estimativas de ruído, para cada um dos pacientes em cada uma das estratégias, em cada nível de limiarização. MC é matriz de conectividade. Fonte: a autora.

5 RESULTADOS

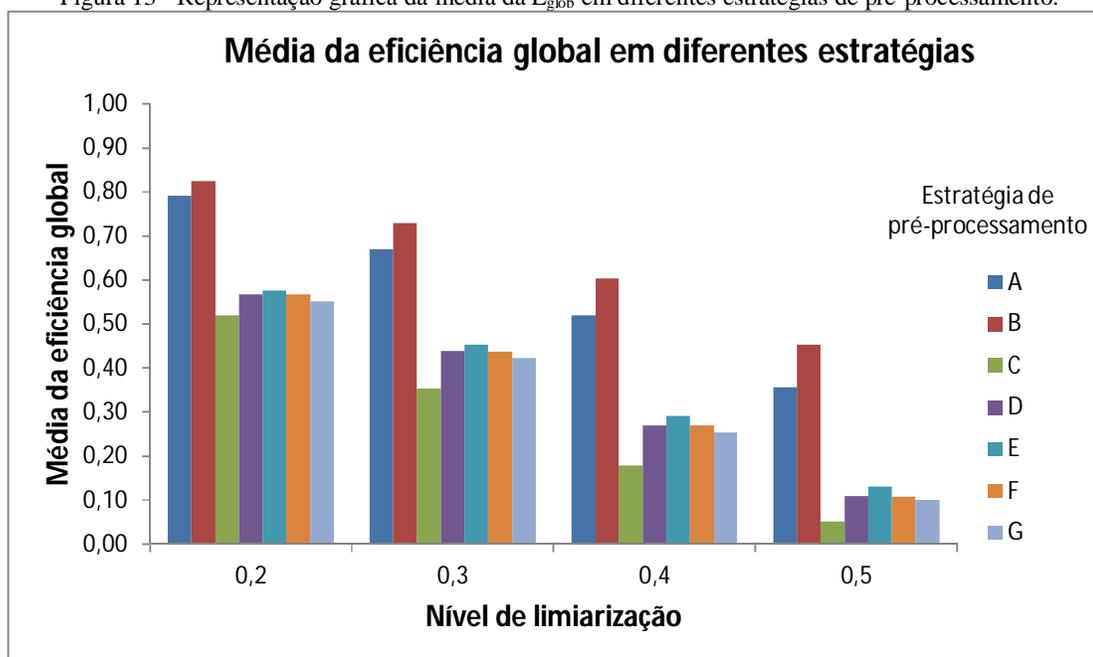
A média e a variância das medidas de TG, em cada nível de limiarização e em cada estratégia de pré-processamento, podem ser visualizadas nas tabelas Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6 e Tabela 7.

Tabela 4 - Média e variância das medidas de E_{glob} , nos diferentes níveis de limiarização e nas diferentes estratégias de pré-processamento.

Estratégia de pré-processamento	Nível de limiarização							
	0,2		0,3		0,4		0,5	
	média	variância	média	variância	média	variância	média	variância
A	0,791	0,006	0,670	0,011	0,520	0,017	0,355	0,020
B	0,824	0,005	0,729	0,008	0,603	0,014	0,454	0,019
C	0,521	0,001	0,353	0,004	0,178	0,004	0,051	0,002
D	0,568	0,000	0,439	0,001	0,270	0,003	0,109	0,002
E	0,576	0,001	0,453	0,002	0,291	0,005	0,131	0,007
F	0,568	0,000	0,438	0,001	0,269	0,002	0,107	0,002
G	0,551	0,001	0,422	0,003	0,254	0,007	0,101	0,008

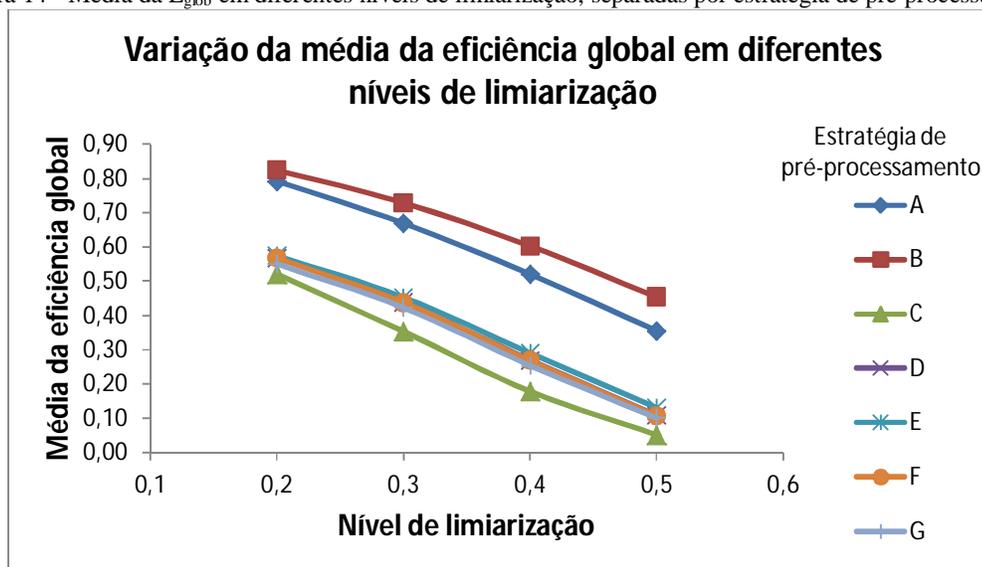
A Figura 13 apresenta o gráfico que permite comparar a média da E_{glob} encontrada em cada estratégia de pré-processamento, separada por nível de limiarização.

Figura 13 - Representação gráfica da média da E_{glob} em diferentes estratégias de pré-processamento.



O gráfico da Figura 14 permite observar a variação da média de E_{glob} em diferentes níveis de limiarização, em cada estratégia de pré-processamento.

Figura 14 - Média da E_{glob} em diferentes níveis de limiarização, separadas por estratégia de pré-processamento.



A Tabela 5 mostra a média e a variância das medidas de CCC em diferentes níveis de limiarização e estratégias de pré-processamento. Logo abaixo, as Figuras Figura 15 e Figura 16 mostram gráficos que representam as diferentes médias do CCC encontradas em cada estratégia de pré-processamento, separadas por nível de limiarização, e a variação da média de eficiência global em diferentes níveis de limiarização, em cada estratégia de pré-processamento.

Tabela 5 - Média e variância das medidas de CCC, nos diferentes níveis de limiarização e nas diferentes estratégias de pré-processamento.

Estratégia de pré-processamento	Nível de limiarização							
	0,2		0,3		0,4		0,5	
	média	variância	média	variância	média	variância	média	variância
A	1,351	0,020	1,552	0,040	1,805	0,079	2,118	0,175
B	1,959	0,004	2,556	0,024	3,580	0,135	5,136	0,792
C	1,416	0,024	1,667	0,049	1,972	0,094	2,349	0,201
D	2,015	0,009	2,669	0,068	3,817	0,305	5,292	1,616
E	1,933	0,007	2,486	0,043	3,449	0,210	4,956	1,078
F	1,960	0,004	2,561	0,022	3,586	0,121	5,123	0,701
G	2,149	0,016	2,968	0,088	4,484	0,542	4,559	2,383

Figura 15 - Representação gráfica da média do CCC em diferentes estratégias de pré-processamento.

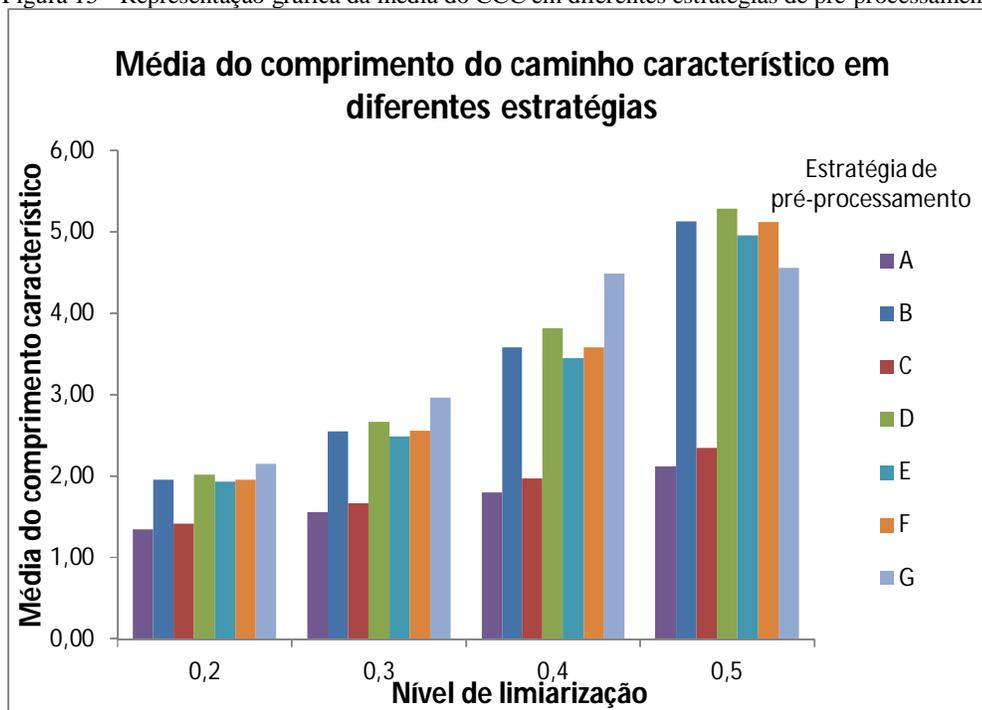
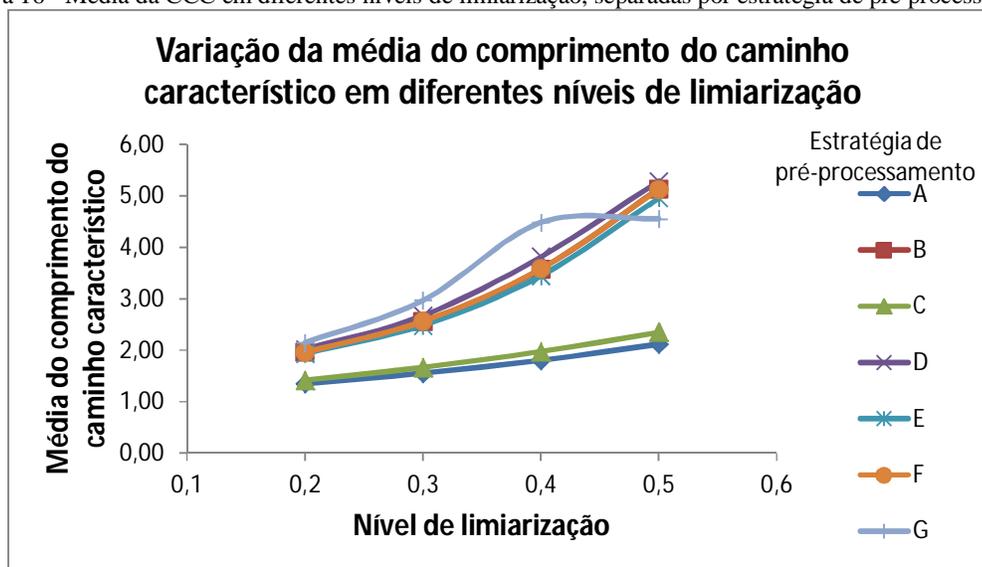


Figura 16 - Média da CCC em diferentes níveis de limiarização, separadas por estratégia de pré-processamento.



A Tabela 6 mostra a média e a variância das medidas de CA em diferentes níveis de limiarização e estratégias de pré-processamento. Logo abaixo, as Figuras Figura 17 e Figura 18 mostram as diferentes médias do CA encontradas em cada estratégia de pré-processamento, separadas por nível de limiarização, e a variação da média de eficiência global em diferentes níveis de limiarização, em cada estratégia de pré-processamento.

Tabela 6 - Média e variância das medidas de CA, nos diferentes níveis de limiarização e nas diferentes estratégias de pré-processamento.

Estratégia de pré-processamento	Nível de limiarização							
	0,2		0,3		0,4		0,5	
	média	variância	média	variância	média	variância	média	variância
A	0,789	0,007	0,709	0,010	0,605	0,014	0,355	0,020
B	0,810	0,007	0,741	0,010	0,656	0,012	0,454	0,019
C	0,457	0,002	0,421	0,003	0,331	0,005	0,051	0,002
D	0,463	0,002	0,430	0,003	0,374	0,003	0,109	0,002
E	0,465	0,002	0,431	0,003	0,377	0,004	0,131	0,007
F	0,461	0,002	0,427	0,002	0,373	0,003	0,107	0,002
G	0,430	0,003	0,405	0,003	0,346	0,005	0,101	0,008

Figura 17 - Representação gráfica da média do CA em diferentes estratégias de pré-processamento.

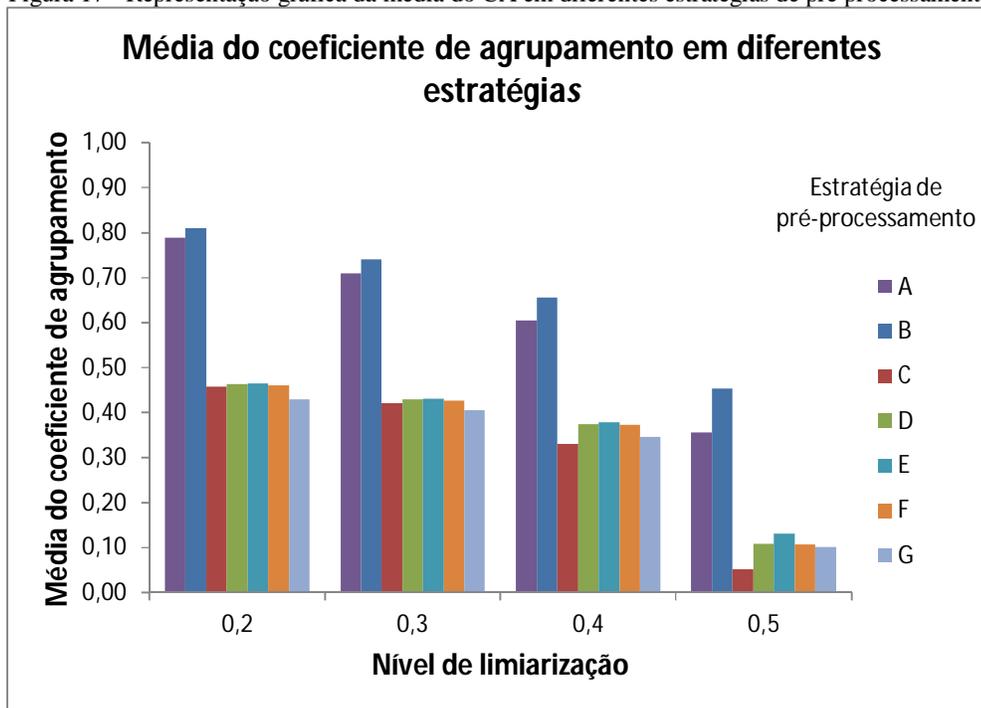
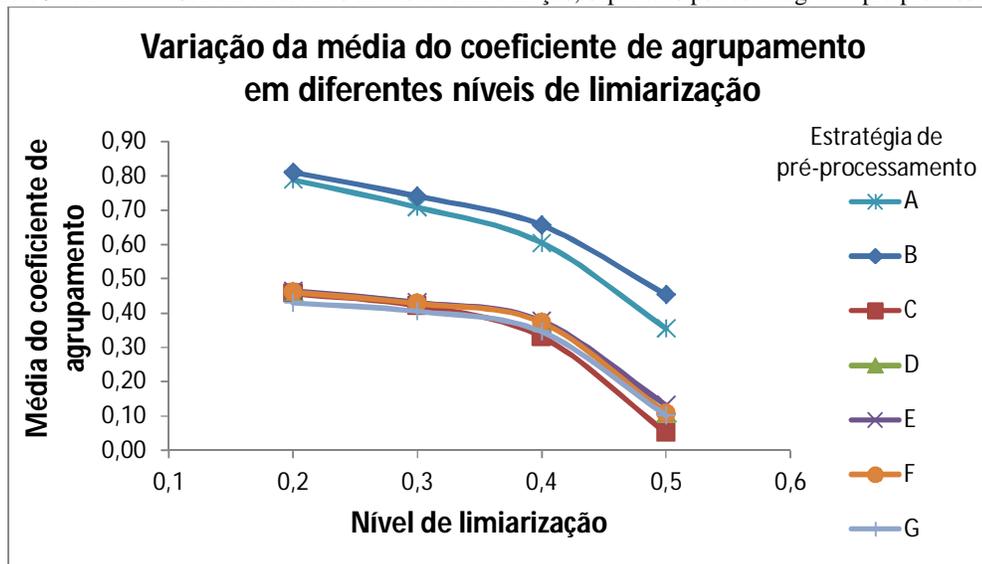


Figura 18 - Média da CA em diferentes níveis de limiarização, separadas por estratégia de pré-processamento.



A Tabela 7 mostra a média e a variância das medidas de E_{loc} em diferentes níveis de limiarização e estratégias de pré-processamento. Logo abaixo, as Figura 19 e Figura 20 mostram gráficos que representam as diferentes médias do E_{loc} encontradas em cada estratégia de pré-processamento, separadas por nível de limiarização, e a variação da média de eficiência global em diferentes níveis de limiarização, em cada estratégia de pré-processamento.

Tabela 7 - Média e variância das medidas de E_{loc} , nos diferentes níveis de limiarização e nas diferentes estratégias de pré-processamento.

Estratégia de pré-processamento	Nível de limiarização							
	0,2		0,3		0,4		0,5	
	média	variância	média	variância	média	variância	média	variância
A	0,890	0,002	0,829	0,004	0,731	0,010	0,596	0,016
B	0,902	0,002	0,856	0,003	0,784	0,007	0,680	0,012
C	0,693	0,002	0,577	0,005	0,408	0,009	0,229	0,008
D	0,714	0,001	0,626	0,003	0,486	0,006	0,316	0,007
E	0,717	0,001	0,634	0,003	0,500	0,007	0,334	0,012
F	0,713	0,001	0,624	0,003	0,485	0,005	0,312	0,007
G	0,692	0,001	0,596	0,005	0,452	0,010	0,290	0,014

Figura 19 - Representação gráfica da média do E_{loc} em diferentes estratégias de pré-processamento.

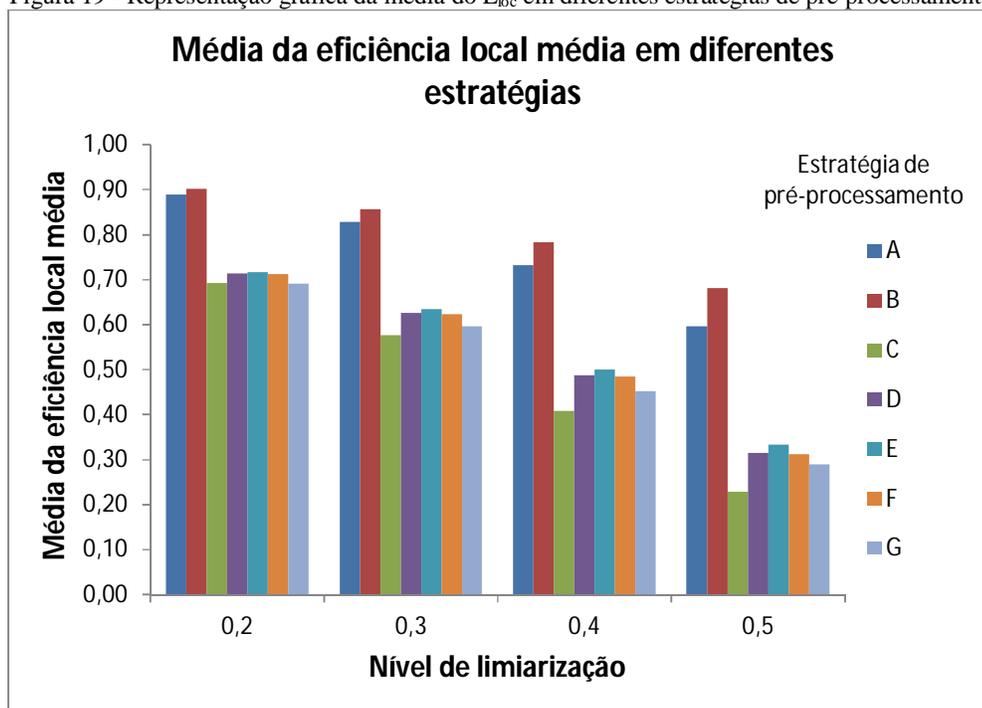
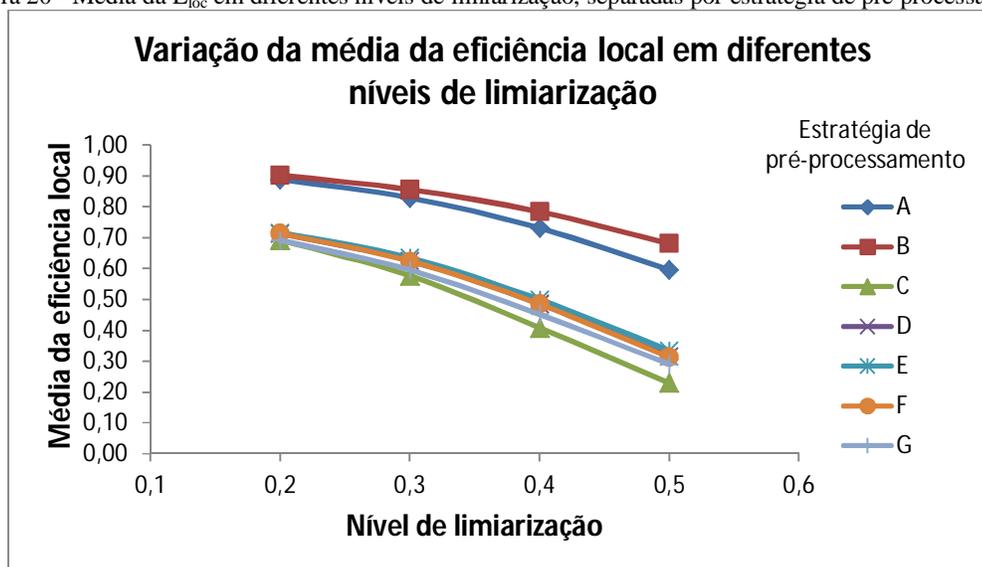


Figura 20 - Média da E_{loc} em diferentes níveis de limiarização, separadas por estratégia de pré-processamento.



5.1 TESTE 1 – CONFIABILIDADE ENTRE DIFERENTES ESTRATÉGIAS

A ANOVA por medidas repetidas com a correção por Greenhouse-Geisser demonstrou que o valor médio de todas as medidas de TG difere significativamente ($p < 0,001$) entre as diferentes estratégias de pré-processamento, para cada nível de limiarização. O Greenhouse-Geisser aplica um fator de correção para ajustar os graus de liberdade para que a condição de esfericidade (que se refere à igualdade da variância das diferenças entre os grupos) não seja violada. Assim, a probabilidade de ocorrer um erro do Tipo I (rejeitar H_0 quando ela é verdadeira) é menor.

A partir disso, foram feitos 336 testes t pareados *post-hoc* (usando correção de Bonferroni)(21 pares de estratégias de pré-processamento, 4 níveis de limiarização e 4 métodos de pré-processamento). Um resumo destes resultados pode ser visto na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados do teste 1.

Estratégia de pré-processamento	Medida de TG	Estratégia de pré-processamento			
		D	E	F	G
C	E_{glob}				
	CCC		1		
	CA	1	1	1	3
	E_{loc}				2
D	E_{glob}	-		4	2
	CCC	-	1	4	1
	CA	-	4	4	1
	E_{loc}	-	3	4	2
E	E_{glob}	-	-	1	1
	CCC	-	-	1	
	CA	-	-	4	
	E_{loc}	-	-	4	
F	E_{glob}	-	-	-	2
	CCC	-	-	-	1
	CA	-	-	-	1
	E_{loc}	-	-	-	1

Os números indicam a quantidade de testes t pareados *post-hoc* (um para cada nível de limiarização) que não mostraram diferenças estatísticas entre as estratégias de pré-processamento ($p > 0,05$). As estratégias de pré-processamento (A, B,C...G) estão descritas na Tabela 2.

A maioria dos testes t pareados demonstraram diferença estatística ($p < 0,05$) entre as estratégias de pré-processamento. A Tabela 8 mostra somente os testes nos quais a hipótese nula não foi rejeitada ($p > 0,05$), o que afirma que não há diferença significativa entre as

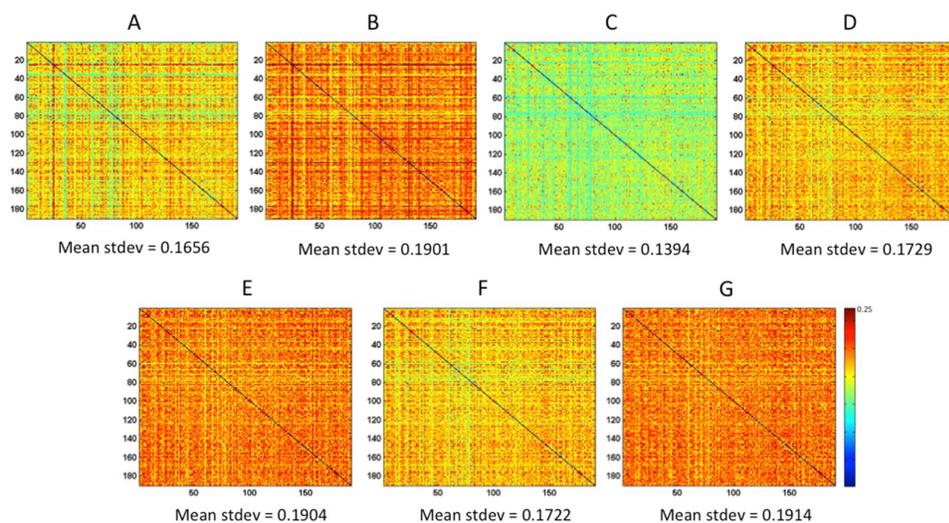
médias das estratégias de pré-processamento em um nível de limiarização ou em uma determinada medida de TG.

As estratégias de pré-processamento “A” e “B” diferem estatisticamente de todos os outros métodos de pré-processamento, por isso elas não aparecem na Tabela 8. Os números indicam a quantidade de testes t que não foram rejeitados para um dado par de estratégias de pré-processamento e medida de TG num determinado nível de limiarização. Por exemplo, comparando as estratégias de pré-processamento “C” e “G” para a média do coeficiente de agrupamento, há uma diferença estatisticamente significativa apenas para o nível de limiarização de 0,5 e não há diferença significativa para os níveis de limiarização de 0,2, 0,3 e 0,4. Por isso aparece o número “3” na célula. O resultado completo do teste t pode ser visto no apêndice APÊNDICE C – Resultado completo do teste t pareado.

5.2 TESTE 2 – CONFIABILIDADE DA MATRIZ DE CONECTIVIDADE

A Figura 21 mostra a matriz do desvio padrão entre os sujeitos, para cada estratégia de pré-processamento, bem como seu valor médio. Adicionalmente, o valor da correlação média encontrado para cada estratégia de pré-processamento é A = 0,2640, B = 0,2967, C = 0,0291, D = 0,0251, E = 0,0225, F = 0,0238 e G = 0,0009.

Figura 21 - Desvio padrão da matriz de conectividade.



Foi calculado o desvio padrão da matriz de conectividade (MC) entre os sujeitos, para cada estratégia de pré-processamento. *Mean stdev* é a média do desvio padrão para cada matriz.

5.3 TESTE 3 – CORRELAÇÃO DE ESTIMATIVAS DE RUÍDO *VERSUS* MEDIDAS DE TG

Dois parâmetros de ruído, a estimativa de movimento e a fração de *outliers* por TR, foram usados para correlacionar com as medidas de TG. A correlação de Pearson comparando a média do movimento por TR para cada sujeito com as medidas de TG, em cada nível de limiarização, pode ser vista na Tabela 9.

Tabela 9 - Valores de correlação da média do movimento da cabeça do paciente com as medidas de TG.

Medida de TG	Nível de limiarização	A	B	C	D	E	F	G
E_{glob}	0,2	0,435	0,426	0,378	0,293	0,658	0,210	0,757
	<i>p-value</i>	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,034	0,000
	0,3	0,446	0,423	0,384	0,313	0,701	0,253	0,720
	<i>p-value</i>	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,010	0,000
	0,4	0,454	0,417	0,382	0,314	0,694	0,257	0,704
	<i>p-value</i>	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,009	0,000
	Média	0,449	0,424	0,370	0,297	0,682	0,227	0,717
CCC	0,2	-0,427	-0,423	-0,378	-0,282	-0,667	-0,230	-0,762
	<i>p-value</i>	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,020	0,000
	0,3	-0,411	-0,418	-0,305	-0,240	-0,664	-0,194	-0,695
	<i>p-value</i>	0,000	0,000	0,002	0,015	0,000	0,051	0,000
	0,4	-0,388	-0,397	-0,133	-0,156	-0,589	-0,114	-0,629
	<i>p-value</i>	0,000	0,000	0,182	0,119	0,000	0,255	0,000
	Média	-0,383	-0,396	-0,146	-0,145	-0,540	-0,105	-0,522
CA	0,2	0,409	0,434	0,358	0,293	0,485	0,210	0,530
	<i>p-value</i>	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,034	0,000
	0,3	0,423	0,448	0,339	0,286	0,391	0,182	0,405
	<i>p-value</i>	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,068	0,000
	0,4	0,441	0,444	0,359	0,340	0,475	0,267	0,492
	<i>p-value</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007	0,000
	Média	0,433	0,442	0,353	0,301	0,467	0,217	0,499
E_{loc}	0,2	0,409	0,434	0,358	0,293	0,485	0,210	0,530
	<i>p-value</i>	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,034	0,000
	0,3	0,436	0,442	0,361	0,290	0,531	0,228	0,517
	<i>p-value</i>	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,021	0,000
	0,4	0,443	0,419	0,366	0,319	0,579	0,256	0,583
<i>p-value</i>	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,009	0,000	

	0,5	0,453	0,422	0,369	0,286	0,580	0,196	0,608
	<i>p-value</i>	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,048	0,000
	Média	0,435	0,429	0,364	0,297	0,544	0,222	0,560

A Tabela 10 mostra a correlação de Pearson da fração de *outliers* por TR *versus* as medidas de TG.

Tabela 10 - Valores de correlação da fração de *outliers* por TR com as medidas de TG.

Medida de TG	Nível de limiarização	A	B	C	D	E	F	G
E_{glob}	0,2	0,186	0,134	0,365	0,476	0,412	0,271	0,479
	<i>p-value</i>	0,061	0,180	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000
	0,3	0,219	0,155	0,384	0,475	0,444	0,325	0,461
	<i>p-value</i>	0,027	0,119	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000
	0,4	0,242	0,171	0,481	0,483	0,449	0,355	0,451
	<i>p-value</i>	0,014	0,086	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	0,5	0,280	0,203	0,619	0,511	0,469	0,302	0,473
	<i>p-value</i>	0,004	0,041	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000
	Média	0,232	0,166	0,462	0,486	0,444	0,313	0,466
CCC	0,2	-0,188	-0,140	-0,353	-0,435	-0,430	-0,330	-0,502
	<i>p-value</i>	0,059	0,160	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000
	0,3	-0,198	-0,135	-0,353	-0,426	-0,443	-0,340	-0,456
	<i>p-value</i>	0,046	0,177	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	0,4	-0,179	-0,120	-0,304	-0,347	-0,413	-0,236	-0,428
	<i>p-value</i>	0,072	0,229	0,002	0,000	0,000	0,017	0,000
	0,5	-0,115	-0,061	0,054	-0,151	-0,309	-0,052	-0,249
	<i>p-value</i>	0,249	0,542	0,588	0,130	0,002	0,606	0,012
	Média	-0,170	-0,114	-0,201	-0,308	-0,388	-0,209	-0,378
CA	0,2	0,183	0,151	0,323	0,375	0,256	0,124	0,278
	<i>p-value</i>	0,066	0,131	0,001	0,000	0,009	0,215	0,005
	0,3	0,194	0,158	0,357	0,333	0,150	0,031	0,168
	<i>p-value</i>	0,051	0,113	0,000	0,001	0,132	0,755	0,092
	0,4	0,215	0,175	0,428	0,346	0,198	0,116	0,240
	<i>p-value</i>	0,030	0,079	0,000	0,000	0,046	0,247	0,015
	0,5	0,271	0,210	0,488	0,347	0,285	0,125	0,318
	<i>p-value</i>	0,006	0,034	0,000	0,000	0,004	0,212	0,001
	Média	0,216	0,173	0,399	0,351	0,222	0,099	0,251
E_{loc}	0,2	0,183	0,151	0,323	0,375	0,256	0,124	0,278
	<i>p-value</i>	0,066	0,131	0,001	0,000	0,009	0,215	0,005
	0,3	0,218	0,179	0,383	0,365	0,291	0,189	0,289
	<i>p-value</i>	0,028	0,071	0,000	0,000	0,003	0,057	0,003
	0,4	0,246	0,204	0,487	0,400	0,366	0,204	0,371
	<i>p-value</i>	0,013	0,039	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000
	0,5	0,310	0,246	0,531	0,397	0,400	0,128	0,425
	<i>p-value</i>	0,002	0,013	0,000	0,000	0,000	0,200	0,000
	Média	0,239	0,195	0,431	0,384	0,329	0,161	0,341

6 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a confiabilidade das medidas de TG entre diferentes estratégias de pré-processamento e também testar a confiabilidade da própria estratégia. Para que a rs-fMRI seja viável na clínica, deve-se avaliar a confiabilidade e a reprodutibilidade a nível do sujeito (BENNETT; MILLER, 2010). Há muitas fontes que podem influenciar e interferir nos dados de RMf, sendo que uma das fontes de variação é a escolha das etapas de pré-processamento dos dados. Não há uma concordância sobre qual a melhor estratégia a ser aplicada nos dados funcionais. A partir disso, foram escolhidas algumas etapas que são usadas na maioria dos estudos (Tabela 3, subseção 3.6) de RMf com teoria dos grafos.

Optou-se, ainda, por acrescentar um novo método, disponível no software AFNI, chamado *scrubbing*. O *scrubbing* já foi feito por (YAN et al., 2013), mas somente por movimento. Sabendo que há, também, o método de *scrubbing* por *outliers*, decidiu-se testar qual a influência deste método de correção no pré-processamento de dados de RMf.

Com um grande grupo homogêneo de indivíduos foi avaliado se as sete diferentes estratégias podem afetar significativamente as medidas de TG. Para isso, foram feitos diversos testes e análises: análise da média e da variância das medidas de TG, confiabilidade por ANOVA, desvio padrão da MC e correlação de estimativas de ruído com as medidas de TG.

Pode-se perceber pela Figura 13 que a média da eficiência global nas estratégias A e B foi alta em todos os níveis de limiarização, enquanto as estratégias “D”, “E” e “F” se mantiveram muito próximas umas das outras. Isso pode ser explicado pois essas estratégias possuem etapas muito parecidas, o que difere entre elas é que as estratégias “E” e “F” possuem, além das etapas da estratégia “D”, métodos de correção *scrubbing* por movimento e *outlier*, respectivamente. Como pode-se observar pela Tabela 4, a estratégia “F” possui a mesma média, ou está muito próxima, da estratégia “D” em todos os níveis de limiarização. Isso pode ser explicado devido à correção por retirada dos TRs com uma fração alta de outliers ser tão pequena que não interferiu na medida de TG.

O gráfico da Figura 14 permite observar que conforme o nível de limiarização vai ficando mais alta, as médias das medidas de TG vão diminuindo, seguindo um mesmo padrão em todas as estratégias de pré-processamento. A eficiência global da rede está ligada com a capacidade que a rede tem de transmitir informação a nível global, e é uma medida que indica a capacidade de áreas especializadas se comunicarem.

A Tabela 5 e o gráfico da Figura 15 permitem observar que a média do CCC variou bastante entre as estratégias de pré-processamento. Nesse caso, as estratégias “E” e “F” apresentaram médias muito parecidas nos níveis de limiarização 0,2, 0,3 e 0,4. No nível de limiarização 0,5 as diferenças das médias se inverteram, pois a estratégia “G” apresentou uma redução brusca na média do CCC. Esse comportamento pode ser observado também no gráfico da Figura 16, no qual a linha da estratégia “G” tem um comportamento diferente das demais quando o nível de limiarização é 0,5. Esse resultado é diferente do encontrado por (Braun et al., 2011). Porém, cabe ressaltar que o método de parcelamento usado neste trabalho foi diferente do usado por Braun et al. (2011). O CCC é a média do comprimento do caminho mais curto entre todos os pares de nodos da rede e é o inverso da eficiência global, o que pode ser observado pelos gráficos das Figura 14 e Figura 16.

A Tabela 6 e o gráfico da Figura 17 demonstram que as duas primeiras estratégias de pré-processamento apresentam média e variância do CA muito superiores às outras estratégias. Assim como as estratégias “C”, “D” e “F” apresentam médias e variâncias muito parecidas nos níveis de limiarização 0,2, 0,3 e 0,4. No nível de limiarização 0,5 a estratégia “C” apresenta uma queda brusca e a variância aumenta. Comportamento similar pode ser observado na Figura 18. O CA é uma medida de segregação funcional, e indica a capacidade que a rede tem de formar grupos interconectados que possuem funções especializadas.

Com relação às medidas de eficiência local, na Tabela 7, pode-se observar que a variância se mostrou baixa em todas as estratégias, nos níveis de limiarização 0,2, 0,3 e 0,4. No nível de limiarização 0,5 a variância é maior, assim como a diferença das medidas de eficiência local entre as estratégias aumenta (Figura 19). Pela Figura 20, se observa que um limiar mais alto na matriz de conectividade reduz a eficiência local para todas as estratégias.

Analisando os resultados pela Tabela 8, verifica-se que o resultado final pode ser significativamente alterado simplesmente incluindo ou removendo uma etapa do pré-processamento. Principalmente as estratégias “A” e “B” apresentaram diferenças

significativas quando comparadas com todas as outras estratégias. As etapas de pré-processamento utilizadas em ambas são as consideradas mínimas necessárias, a diferença está que na estratégia “B” foi utilizado o filtro passa-banda. Podemos observar que as outras estratégias não possuem diferenças significativas entre si. As estratégias “D” e “F” não apresentam diferenças significativas em todos os níveis de limiarização, enquanto “D” e “E” apresentam diferença somente em alguns níveis, assim como “D” e “G”.

Cabe ressaltar que a diferença entre as estratégias “D”, “E” e “F” está somente no método de *scrubbing* e são as tradicionalmente usadas na maioria dos estudos com RMf (Tabela 3), com exceção do *scrubbing* por *outlier*. É importante notar que, embora as estratégias “D” e “G” sejam muito similares e apresentem poucas diferenças significativas nas médias das medidas de TG, observando a média da correlação da matriz de conectividade, verifica-se que as correlações médias delas são diferentes (0,0251 e 0,0009, respectivamente). A correlação média da “G” é próxima de zero, o que pode indicar um número maior de correlações negativas que a estratégia “D”. A estratégia “G” faz uso do sinal global, e WEISSENBACHER et al., (2009) já haviam discutido sobre ser um método responsável por aumentar o número de falsas correlações negativas.

É interessante comparar o teste *t* juntamente com o cálculo da média do desvio padrão da MC. Embora sejam medidas diferentes, eles se complementam. Os métodos “D” e “F” apresentaram, no geral, média das medidas de TG quase idênticas (Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6 e Tabela 7). Esse resultado, a partir da Figura 21, se confirma quando verificamos que a média da correlação e do desvio padrão da MC de ambas as estratégias são similares (média: 0,0251 e 0,0238, respectivamente; desvio padrão: 0,1729 e 0,1722, respectivamente). Isso ocorre por que o *scrubbing* por *outlier* da estratégia “F” modificou muito pouco os dados, gerando uma pequena alteração, a qual se demonstrou benéfica no sentido de diminuir a variabilidade na matriz de conectividade.

As Figura 14, Figura 16, Figura 18 e Figura 20 mostram a média das medidas de TG para as diferentes estratégias de pré-processamento e níveis de limiarização. É evidente que as estratégias “A” e “B” diferem da maioria dos outros métodos. Estas duas abordagens são as que utilizam menos etapas de eliminação do ruído. Adicionalmente, as médias dos valores de correlação na MC são maiores para os métodos “A” e “B” ($r = 0,2640$ e $r = 0,2967$, respectivamente). Como pode ser visto na Tabela 3, os primeiros estudos com TG aplicaram estratégias similares de pré-processamento. Em geral, as abordagens “D” até “G” não diferem

muito entre si e são tipicamente utilizadas nos estudos mais recentes. Provavelmente, sem o número adequado de correções para eliminação do ruído, as forças de correlação do sinal BOLD são superestimadas.

Ainda com relação à variação da MC, podemos comparar as duas estratégias que utilizaram *scrubbing*: “E” (média: 0,0225 e média do desvio padrão: 0,1904) e “F” (média: 0,0238 e média do desvio padrão: 0,1722). Pode-se observar que a abordagem que utilizou o *scrubbing* por movimento é a que apresentou um maior desvio padrão médio do que a abordagem que utilizou o *scrubbing* por *outlier* (0,1904 e 0,1722, respectivamente), indicando que a estratégia “F” é capaz de fornecer uma matriz de conectividade mais homogênea. Ainda pode-se mencionar o fato de que, quando a estratégia “E” estava sendo processada, 7 pacientes não foram finalizados pelo programa. Isso ocorreu devido ao número de TRs descartados por excesso de movimento ser muito alto e o próprio software não finaliza o pré-processamento. Por isso a amostra foi reduzida para 102 pacientes.

No último teste, de correlação, as medidas de eficiência global se mostraram de fraca a fortemente correlacionadas positivamente com o movimento (Tabela 9). As estratégias “D” e “F” foram as que se mostraram mais fracamente correlacionadas em todos os níveis de limiarização, apresentando média de 0,297 e 0,227, respectivamente. A estratégia “G” se mostrou mais fortemente correlacionada com o movimento (média: 0,717). O comprimento do caminho característico demonstrou praticamente o mesmo comportamento. O que mudou é que a estratégia “C” também se mostrou fracamente correlacionada negativamente com o movimento, com uma média (-0,146) muito similar à estratégia “D” (média: -0,145). Com relação ao coeficiente de agrupamento novamente a estratégia “F” (média: 0,217) demonstrou a menor correlação, enquanto a estratégia “G” (média: 0,499) demonstrou a maior correlação, no entanto, bem próxima das restantes. A correlação da eficiência local com o movimento demonstrou uma correlação positiva fraca com as estratégias “D” e “F” (médias 0,222 e 0,297, respectivamente) e forte com as estratégias “E” e “G” (médias: 0,544 e 0,560, respectivamente).

De acordo com a Tabela 10, a eficiência global demonstrou estar fracamente correlacionada com os *outliers* nas estratégias “A” e “B” (médias: 0,232 e 0,166, respectivamente), enquanto está moderadamente correlacionada com a estratégia “F” (0,313) e fortemente correlacionada com as estratégias “C” (média: 0,462), “D” (média: 0,486), “E”

(média: 0,444) e “G” (0,466). Na medida de comprimento do caminho característico o comportamento se mostrou parecido, com as menores correlações negativas nas estratégias “A” (-0,170) e “B” (-0,114). Porém, a maior correlação do CCC com os *outliers* se observa para a estratégia “E”. Com o coeficiente de agrupamento, a média da correlação dos *outliers* com a medida de TG foi observada na estratégia “F” (média: 0,099), enquanto a maior foi na estratégia “C” (0,399). Com relação à eficiência local, o comportamento foi similar. A menor correlação encontrada foi da estratégia “F” (média: 0,161).

Em geral, observa-se que a correlação com as medidas de TG e os parâmetros de estimativa de ruído se encontraram menos correlacionados com a estratégia “F”. Em alguns momentos as duas primeiras estratégias demonstraram menos correlação e sempre se mantiveram com uma correlação de fraca a moderada, tanto quando correlacionadas entre as medidas de TG e os *outliers* quando com o movimento. A correlação do movimento com as medidas de TG demonstrou que as estratégias “E” e “G” apresentaram uma forte correlação. Essas estratégias utilizaram o *scrubbing* por movimento como uma das etapas de pré-processamento, ou seja, talvez ele não seja tão eficiente em remover a dependência das medidas de TG com o movimento da cabeça do paciente. Resultados similares foram encontrados por YAN et al., (2013). Quando eles usaram *scrubbing* por movimento e sinal global juntos, a relação entre as medidas e TG e o movimento da cabeça aumentava quando comparado com somente o uso do sinal global. Neste trabalho não foi feita uma estratégia somente com o uso do sinal global, por isso a última comparação não pode ser feita com o trabalho de Yan e colaboradores (2013).

LIANG et al., (2012) investigaram a confiabilidade das medidas de TG em dados de Rs-fMRI e concluíram que o uso do sinal global produz resultados menos confiáveis do que quando não é realizado o pré-processamento com essa etapa. Observando a média da MC da estratégia “G” verifica-se que é perto de zero, o que indica que o número de correlações positivas e negativas é próximo. Isso concorda com o estudo feito por (BRAUN et al., 2011), no qual eles avaliaram a confiabilidade de MC e encontraram que o número de correlações negativas varia entre as diferentes estratégias, ressaltando que, com o uso da regressão por sinal global aproximadamente metade das correlações são negativas.

A estratégia “D”, que somente não utiliza o *scrubbing* por movimento, quando comparada com a estratégias “E” se mostrou menos dependente do movimento da cabeça do paciente. Os resultados de correlação da estratégia “D” com a “F” são muito parecidos, sendo

que a estratégia “F” demonstra diminuir ainda mais a dependência do movimento da cabeça com as medidas de TG.

Com relação aos *outliers*, eles mostraram, em geral, que influenciam menos do que o movimento da cabeça nas medidas de TG. Como já comentado, as duas primeiras estratégias demonstraram menos influência nas medidas de TG quando correlacionadas com *outliers*. No entanto, já foi demonstrado que essas estratégias superestimam as forças de conectividade, na MC. Entre as outras quatro estratégias, a que menos demonstrou que pode contribuir com a dependência das medidas de TG com os *outliers* é a estratégia “F”. Todas as outras demonstraram resultados similares de correlação.

7 CONCLUSÃO

A RMf é um método de imagem não invasivo, que não utiliza radiação ionizante e não faz uso de meios de contraste exógenos. Portanto, além de reduzir o tempo que todos os relacionados com exame ficam envolvidos com o estudo, a dificuldade por trás do exame deixa de ser do paciente (com problemas cognitivos e de mobilidade) em realizar a tarefa e passa a ser do processamento dos dados deste exame.

Sabendo que é possível visualizar as mesmas áreas que são funcionalmente ativas quando se executa uma tarefa e também no estado de repouso, quando são correlacionadas (BISWAL et al., 1995) (LOWE; MOCK; SORENSON, 1998) (CORDES et al., 2001) (FOX et al., 2005) (DAMOISEAUX et al., 2006), estudos de imagem funcional por rs-fMRI contribuem com a prática clínica tornando a rotina de realização mais fácil de executar pelo paciente.

Com relação às dificuldades técnicas que envolvem a própria aquisição das imagens de RMf e também a influência dos sinais fisiológicos não neurais interpretação dos dados, os artefatos podem ser corrigidos através da adequada metodologia empregada no pré-processamento de RMf (LOHMANN et al., 2013). Portanto, esse trabalho surgiu com o intuito de investigar qual a metodologia para pré-processamento dos dados rs-fMRI fornece resultados mais estáveis entre um indivíduo e outro, quando se avalia a conectividade funcional cerebral.

Os resultados deste trabalho demonstraram que as estratégias “D” e “F” são as abordagens mais confiáveis. A única diferença entre elas é que a estratégia “F” inclui o *scrubbing* por *outlier*. Adicionalmente, eles apresentam diferenças que não são estatisticamente diferentes. A abordagem “D” já foi discutida por WEISSENBACHER et al., (2009) e teve provada a sua confiabilidade. No entanto, quando foi verificada a relação entre as medidas TG e os parâmetros de estimativa de ruído, entre as estratégias, percebe-se uma diminuição da dependência entre estes parâmetros quando adiciona-se a etapa de *scrubbing* por *outliers* (estratégia “F”).

Cabe ressaltar que as estratégias “E” e “G” apresentam resultados muito similares na maioria dos testes, o que se pode explicar pelo fato delas diferirem apenas na etapa de

regressão por SG. Como já discutido, se faz necessária uma avaliação de estratégia de pré-processamento somente com o SG, sem o *scrubbing* por movimento. Talvez isso tenha influenciado na correlação das medidas de TG com o movimento e com os *outliers*.

As primeiras estratégias demonstraram diminuir a dependência do movimento e dos *outliers* nas medidas de TG, no entanto, se mostraram menos confiáveis quando analisamos a MC. Por isso, e pelo fato de não serem mais usados em pesquisas recentes, elas não são recomendadas. No presente trabalho elas contribuíram para demonstrar que a escolha de diferentes estratégias pode afetar as medidas de TG.

A respeito dos níveis de limiarização, ainda não se tem na literatura um consenso sobre qual o limiar deve ser utilizado. Os resultados demonstraram que os diferentes níveis mudam os valores de TG. Portanto, sugere-se mais estudos para que se possa definir qual o nível de limiarização fornece resultados mais confiáveis quando se trabalha com TG.

Assim, baseado nos resultados encontrados neste trabalho, é recomendado usar a estratégia de pré-processamento “F” para aumentar a confiabilidade entre os sujeitos e reduzir a dependência do movimento da cabeça quando são realizadas medidas de TG.

O presente trabalho fez uso de um grupo homogêneo de indivíduos controle e demonstrou a confiabilidade de uma estratégia de pré-processamento que é capaz de reduzir a variância entre sujeitos controle. No entanto, cabe ressaltar que em estudos que comparam populações clínicas (por exemplo, pacientes *versus* controles) a redução na variação da MC pode não estar de acordo com os resultados apresentados neste trabalho. Portanto, se faz necessário um estudo de otimização em indivíduos não controle, a fim de, se necessário, selecionar e/ou desenvolver estratégias não utilizadas neste trabalho.

Esse trabalho faz parte de um estudo que está sendo realizado no Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul, denominado ACERTA (Avaliação de Crianças em Risco de Transtorno de Aprendizagem). O objetivo desse trabalho era otimizar um método de pré-processamento para rs-fMRI, para que pudesse ser aplicado nos pacientes do ACERTA. Portanto, a estratégia “F”, encontrada como sendo a mais confiável para realizar medidas de TG, será aplicada nesses pacientes e os resultados poderão ser comparados. Cabe ressaltar que, é importante também testar essa estratégia de pré-processamento em populações clínicas e controle, com outro método de pós-processamento (conectividade funcional baseada em *seed*, ICA, etc.) quando se deseja realizar medidas diferentes de conectividade funcional.

REFERÊNCIAS

ACHARD, S.; BULLMORE, E. Efficiency and cost of economical brain functional networks. **PLoS computational biology**, v. 3, n. 2, p. e17, 2 fev. 2007.

BASSETT, D. S. et al. Hierarchical organization of human cortical networks in health and schizophrenia. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 28, n. 37, p. 9239–48, 10 set. 2008.

BENNETT, C. M.; MILLER, M. B. How reliable are the results from functional magnetic resonance imaging? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1191, p. 133–55, mar. 2010.

BIRN, R. M. The role of physiological noise in resting-state functional connectivity. **NeuroImage**, v. 62, n. 2, p. 864–70, 15 ago. 2012.

BISWAL, B. et al. Functional Connectivity in the Motor Cortex of Resting. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 34, n. 9, p. 537–541, 1995.

BISWAL, B. B. et al. Toward discovery science of human brain function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 10, p. 4734–9, 9 mar. 2010.

BRAUN, U. et al. Test-retest reliability of resting-state connectivity network characteristics using fMRI and graph theoretical measures. **NeuroImage**, v. 59, n. 2, p. 1404–12, 16 jan. 2011.

BRIER, M. R. et al. Functional connectivity and graph theory in preclinical Alzheimer’s disease. **Neurobiology of aging**, v. 35, n. 4, p. 757–68, abr. 2014.

BULLMORE, E.; SPORNS, O. Complex brain networks: graph theoretical analysis of structural and functional systems. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 10, n. 3, p. 186–98, mar. 2009.

CHAVHAN, G. B. et al. Principles, techniques, and applications of T2*-based MR imaging and its special applications. **Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc**, v. 29, n. 5, p. 1433–49, 2009.

CORDES, D. et al. Frequencies contributing to functional connectivity in the cerebral cortex in “resting-state” data. **AJNR. American journal of neuroradiology**, v. 22, n. 7, p. 1326–33, ago. 2001.

COX, R. W. **AFNI: software for analysis and visualization of functional magnetic resonance neuroimages. Computers and biomedical research, an international journal**, jun. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8812068>>

COX, R. W. **Outlier Detection in fMRI Time Series** Procedures International Society for Magnetic Resonance. *Anais...* 2002 Disponível em: <<http://cds.ismrm.org/ismrm-2002/PDF5/1421.PDF>>

CRADDOCK, R. C. et al. A Whole Brain fMRI Atlas Generated Via Spatially Constrained Spectral Clustering. *Human brain mapping*, v. 33, n. 8, p. 1914–1928, ago. 2012.

DAMOISEAUX, J. S. et al. Consistent resting-state networks across healthy subjects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, n. 37, p. 13848–13853, 2006.

FOX, M. D. et al. The human brain is intrinsically organized into dynamic, anticorrelated functional networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, n. 27, p. 9673–9678, 5 jul. 2005.

FOX, M. D.; GREICIUS, M. Clinical applications of resting state functional connectivity. *Frontiers in systems neuroscience*, v. 4, n. June, p. 19, jan. 2010.

FOX, M. D.; RAICHLE, M. E. Spontaneous fluctuations in brain activity observed with functional magnetic resonance imaging. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 8, n. 9, p. 700–11, set. 2007.

FRANCO, A. R. et al. Impact of analysis methods on the reproducibility and reliability of resting-state networks. *Brain connectivity*, v. 3, p. 363–74, 2013.

FRISTON, K. et al. **SPM: Statistical Parametric Software**, 1991.

GAVRILESCU, M. et al. Functional Connectivity Estimation in fMRI Data: Influence of Preprocessing and Time Course Selection. *Human Brain Mapping*, v. 29, n. 9, p. 1040–1052, set. 2008.

HAACKE, E. M. et al. **Magnetic resonance imaging: physical principles and sequence design**. New York: John Wiley and Sons, Inc, 1999. p. 937

HUETTEL, S. A.; SONG, A. W.; MCCARTHY, G. **Functional Resonance Imaging**. [s.l.: s.n.]. p. 492

HUETTEL, S. A.; SONG, A. W.; MCCARTHY, G. **Functional Magnetic Resonance Imaging**. 2^a Edição ed. Sunderland, Massachusetts U.S.A.: Sinauer Associates, Inc, 2009. p. 510 p.

JO, H. J. et al. Mapping sources of correlation in resting state FMRI, with artifact detection and removal. *NeuroImage*, v. 52, n. 2, p. 571–82, 15 ago. 2010.

LEE, L.; HARRISON, L. M.; MECHELLI, A. A report of the functional connectivity workshop, Dusseldorf 2002. *NeuroImage*, v. 19, n. 2, p. 457–465, jun. 2003.

LEE, M. H.; SMYSER, C. D.; SHIMONY, J. S. Resting-State fMRI : A Review of Methods and Clinical Applications. *AJNR. American Journal of Neuroradiology*, p. 1–7, 2012.

LIANG, X. et al. Effects of different correlation metrics and preprocessing factors on small-world brain functional networks: a resting-state functional MRI study. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e32766, jan. 2012.

LIU, Y. et al. Disrupted small-world networks in schizophrenia. **Brain : a journal of neurology**, v. 131, n. Pt 4, p. 945–61, abr. 2008.

LOHMANN, G. et al. “More is different” in functional magnetic resonance imaging: a review of recent data analysis techniques. **Brain connectivity**, v. 3, n. 3, p. 223–39, jan. 2013.

LOWE, M. J.; MOCK, B. J.; SORENSON, J. A. Functional connectivity in single and multislice echoplanar imaging using resting-state fluctuations. **NeuroImage**, v. 7, n. 2, p. 119–32, fev. 1998.

MARGULIES, D. S. et al. Resting developments: a review of fMRI post-processing methodologies for spontaneous brain activity. **Magma (New York, N.Y.)**, v. 23, n. 5-6, p. 289–307, dez. 2010.

MEINDL, T. et al. Test-retest reproducibility of the default-mode network in healthy individuals. **Human brain mapping**, v. 31, p. 237–246, 2010.

MICHELOYANNIS, S. et al. The influence of ageing on complex brain networks: a graph theoretical analysis. **Human brain mapping**, v. 30, n. 1, p. 200–8, jan. 2009.

MURPHY, K. et al. The impact of global signal regression on resting state correlations: are anti-correlated networks introduced? **NeuroImage**, v. 44, n. 3, p. 893–905, 1 fev. 2009.

NORRIS, D. G. Principles of magnetic resonance assessment of brain function. **Journal of magnetic resonance imaging : JMRI**, v. 23, n. 6, p. 794–807, jun. 2006.

OGAWA, S. et al. Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 24, p. 9868–72, dez. 1990.

POWER, J. D. et al. Functional network organization of the human brain. **Neuron**, v. 72, n. 4, p. 665–78, 17 nov. 2011.

RAEMAEKERS, M. et al. Test-retest variability underlying fMRI measurements. **NeuroImage**, v. 60, n. 1, p. 717–27, mar. 2012.

RAICHLE, M. E. The restless brain. **Brain connectivity**, v. 1, n. 1, p. 3–12, jan. 2011.

REYNOLDS, R. **AFNI program-afni_proc.py**. Disponível em: <http://afni.nimh.nih.gov/pub/dist/doc/program_help/afni_proc.py.html>. Acesso em: 1 jul. 2014.

ROSEN, B. R.; BUCKNER, R. L.; DALE, A. M. Event-related functional MRI : Past , present , and future. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. February, p. 773–780, 1998.

- RUBINOV, M. et al. Small-world properties of nonlinear brain activity in schizophrenia. **Human brain mapping**, v. 30, n. 2, p. 403–16, fev. 2009.
- RUBINOV, M.; SPORNS, O. Complex network measures of brain connectivity: uses and interpretations. **NeuroImage**, v. 52, n. 3, p. 1059–69, set. 2010.
- SAAD, Z. S. et al. A new method for improving functional-to-structural MRI alignment using local Pearson correlation. **NeuroImage**, v. 44, n. 3, p. 839–48, 1 fev. 2009.
- SANZ-ARIGITA, E. J. et al. Loss of “small-world” networks in Alzheimer’s disease: graph analysis of fMRI resting-state functional connectivity. **PloS one**, v. 5, n. 11, p. e13788, jan. 2010.
- SKIDMORE, F. M. et al. Reliability analysis of the resting state can sensitively and specifically identify the presence of Parkinson disease. **NeuroImage**, v. 75, p. 249–261, 2013.
- SMITH, S. M. et al. Advances in functional and structural MR image analysis and implementation as FSL. **NeuroImage**, v. 23 Suppl 1, p. S208–19, jan. 2004.
- SMITH, S. M. The future of fMRI connectivity. **NeuroImage**, v. 62, n. 2, p. 1257–66, 15 ago. 2012.
- THOMASON, M. E. et al. Resting-state fMRI can reliably map neural networks in children. **NeuroImage**, v. 55, n. 1, p. 165–75, 1 mar. 2011.
- TIAN, L. et al. Hemisphere- and gender-related differences in small-world brain networks: a resting-state functional MRI study. **NeuroImage**, v. 54, n. 1, p. 191–202, 1 jan. 2011.
- TURNER, J. A. et al. Reliability of the amplitude of low-frequency fluctuations in resting state fMRI in chronic schizophrenia. **Psychiatry research**, v. 201, n. 3, p. 253–5, 31 mar. 2012.
- VAN DIJK, K. R. A. et al. Intrinsic functional connectivity as a tool for human connectomics: theory, properties, and optimization. **Journal of Neurophysiology**, v. 103, n. 1, p. 297–321, jan. 2010.
- WANG, L. et al. Age-related changes in topological patterns of large-scale brain functional networks during memory encoding and recognition. **NeuroImage**, v. 50, n. 3, p. 862–72, 15 abr. 2010.
- WEISSENBACHER, A. et al. Correlations and anticorrelations in resting-state functional connectivity MRI: A quantitative comparison of preprocessing strategies. **NeuroImage**, v. 47, n. 4, p. 1408–1416, 1 out. 2009.
- YAN, C.-G. et al. Addressing head motion dependencies for small-world topologies in functional connectomics. **Frontiers in human neuroscience**, v. 7, n. December, p. 910, jan. 2013.

APÊNDICE A – Script gerador

```

echo #-----#
echo # preprocessing ${subj} #
echo #-----#

cd ${study}/${subj}

afni_proc.py \
  -subj_id ${study}${subj} \
  -script proc.${study}${subj}.${steps}.tcsch \
  -out_dir PROC.${steps}_${subj} \
  -dsets ${epi_dir}/${epi_data}+orig \
  -copy_anat ${anat_dir}/${anat_data}+orig \
  -blocks despike tshift align tsrc volreg scale regress \
  -tcat_remove_first_trs 3 \
  -tshift_opts_ts -tpattern alt+z2 \
  -volreg_align_e2a \
  -volreg_tsrc_warp \
  -tsrc_base ${template} \
  -regress_opts_3dD \
  -jobs 6 \
  -regress_apply_mot_types demean \

cd ../..
end
exit

```

APÊNDICE B – Script do pré-processamento

```
#!/bin/tcsh -xef

echo "auto-generated by afni_proc.py, Fri Jan 31 17:09:42 2014"
echo "(version 4.03, September 19, 2013)"
echo "execution started: `date`"

# execute via :
# tcsh -xef proc.Pek_STDAH1050975.min.tcsh |& tee
output.proc.Pek_STDAH1050975.min.tcsh

# ===== auto block: setup
=====
# script setup

# take note of the AFNI version
afni -ver

# check that the current AFNI version is recent enough
afni_history -check_date 16 Aug 2013
if ( $status ) then
    echo "*** this script requires newer AFNI binaries (than 16 Aug 2013)"
    echo " (consider: @update.afni.binaries -defaults)"
    exit
endif

# the user may specify a single subject to run with
if ( $#argv > 0 ) then
    set subj = $argv[1]
else
    set subj = Pek_STDAH1050975
endif

# assign output directory name
set output_dir = PROC.min_1050975

# verify that the results directory does not yet exist
if ( -d $output_dir ) then
    echo output dir "$subj.results" already exists
    exit
endif
```

```

# set list of runs
set runs = (`count -digits 2 1 1`)

# create results and stimuli directories
mkdir $output_dir
mkdir $output_dir/stimuli

# copy anatomy to results dir
3dcopy anat_1/mprageAFNI+orig $output_dir/mprageAFNI

# ===== auto block: tcat
=====
# apply 3dTcat to copy input dsets to results dir, while
# removing the first 3 TRs
3dTcat -prefix $output_dir/pb00.$subj.r01.tcat rest_1/restAFNI+orig'[3..$]'

# and make note of repetitions (TRs) per run
set tr_counts = ( 233 )

# -----
# enter the results directory (can begin processing data)
cd $output_dir

# ===== auto block: outcount
=====
# data check: compute outlier fraction for each volume
touch out.pre_ss_warn.txt
foreach run ( $runs )
    3dToutcount -automask -fraction -polort 4 -legendre \
        pb00.$subj.r$run.tcat+orig > outcount.r$run.1D

    # outliers at TR 0 might suggest pre-steady state TRs
    if ( `1deval -a outcount.r$run.1D"{0}" -expr "step(a-0.4)"` ) then
        echo "*** TR #0 outliers: possible pre-steady state TRs in run $run" \
            >> out.pre_ss_warn.txt
    endif
end

# concatenate outlier counts into a single time series
cat outcount.r*.1D > outcount_rall.1D

```

```

# ===== despiking
=====
# apply 3dDespiking to each run
foreach run ( $runs )
    3dDespiking -nomask -prefix pb01.$subj.r$run.despiking \
        pb00.$subj.r$run.tcats+orig
end

# ===== tshifting
=====
# time shift data so all slice timing is the same
foreach run ( $runs )
    3dTshift -tzero 0 -quintic -prefix pb02.$subj.r$run.tshift \
        -tpattern alt+z2 \
        pb01.$subj.r$run.despiking+orig
end

# ===== aligning
=====
# for e2a: compute anat alignment transformation to EPI registration base
# (new anat will be intermediate, stripped, mprageAFNI_ns+orig)
align_epi_anat.py -anat2epi -anat mprageAFNI+orig \
    -save_skullstrip -suffix _al_junk \
    -epi pb02.$subj.r01.tshift+orig -epi_base 2 \
    -epi_strip 3dAutomask \
    -volreg off -tshift off

# ===== tlrc
=====
# warp anatomy to standard space
@auto_tlrc -base MNI_caez_N27+tlrc -input mprageAFNI_ns+orig -no_ss

# ===== volreg
=====
# align each dset to base volume, align to anat, warp to tlrc space

# verify that we have a +tlrc warp dataset
if ( ! -f mprageAFNI_ns+tlrc.HEAD ) then
    echo "*** missing +tlrc warp dataset: mprageAFNI_ns+tlrc.HEAD"
    exit
endif

# create an all-1 dataset to mask the extents of the warp

```

```

3dcalc -a pb02.$subj.r01.tshift+orig -expr 1 -prefix rm.epi.all1

# register and warp
foreach run ( $runs )
  # register each volume to the base
  3dvolreg -verbose -zpad 1 -base pb02.$subj.r01.tshift+orig'[2]' \
    -1Dfile dfile.r$run.1D -prefix rm.epi.volreg.r$run \
    -cubic \
    -1Dmatrix_save mat.r$run.vr.aff12.1D \
    pb02.$subj.r$run.tshift+orig

# concatenate volreg, epi2anat and tlrc transformations
cat_matvec -ONELINE \
  mprageAFNI_ns+tlrc::WARP_DATA -I \
  mprageAFNI_al_junk_mat.aff12.1D -I \
  mat.r$run.vr.aff12.1D > mat.r$run.warp.aff12.1D

# apply concatenated xform : volreg, epi2anat and tlrc
3dAllineate -base mprageAFNI_ns+tlrc \
  -input pb02.$subj.r$run.tshift+orig \
  -1Dmatrix_apply mat.r$run.warp.aff12.1D \
  -mast_dxyz 3 \
  -prefix rm.epi.nomask.r$run

# warp the all-1 dataset for extents masking
3dAllineate -base mprageAFNI_ns+tlrc \
  -input rm.epi.all1+orig \
  -1Dmatrix_apply mat.r$run.warp.aff12.1D \
  -mast_dxyz 3 -final NN -quiet \
  -prefix rm.epi.1.r$run

# make an extents intersection mask of this run
3dTstat -min -prefix rm.epi.min.r$run rm.epi.1.r$run+tlrc
end

# make a single file of registration params
cat dfile.r*.1D > dfile_rall.1D

# compute motion magnitude time series: the Euclidean norm
# (sqrt(sum squares)) of the motion parameter derivatives
1d_tool.py -infile dfile_rall.1D -set_nruns 1 \
  -derivative -collapse_cols euclidean_norm \
  -write motion_{$subj}_enorm.1D

```

```

# -----
# create the extents mask: mask_epi_extents+tlrc
# (this is a mask of voxels that have valid data at every TR)
# (only 1 run, so just use 3dcopy to keep naming straight)
3dcopy rm.epi.min.r01+tlrc mask_epi_extents

# and apply the extents mask to the EPI data
# (delete any time series with missing data)
foreach run ( $runs )
    3dcalc -a rm.epi.nomask.r$run+tlrc -b mask_epi_extents+tlrc \
        -expr 'a*b' -prefix pb03.$subj.r$run.volreg
end

# create an anat_final dataset, aligned with stats
3dcopy mprageAFNI_ns+tlrc anat_final.$subj

# ===== scale
=====
# scale each voxel time series to have a mean of 100
# (be sure no negatives creep in)
# (subject to a range of [0,200])
foreach run ( $runs )
    3dTstat -prefix rm.mean_r$run pb03.$subj.r$run.volreg+tlrc
    3dcalc -a pb03.$subj.r$run.volreg+tlrc -b rm.mean_r$run+tlrc \
        -c mask_epi_extents+tlrc \
        -expr 'c * min(200, a/b*100)*step(a)*step(b)' \
        -prefix pb04.$subj.r$run.scale
end

# ===== regress
=====

# compute de-means motion parameters (for use in regression)
1d_tool.py -infile dfile_rall.1D -set_nruns 1 \
    -demean -write motion_demean.1D

# compute motion parameter derivatives (just to have)
1d_tool.py -infile dfile_rall.1D -set_nruns 1 \
    -derivative -demean -write motion_deriv.1D

# run the regression analysis
3dDeconvolve -input pb04.$subj.r*.scale+tlrc.HEAD \

```

```

-polort 4 \
-num_stimts 6 \
-stim_file 1 motion_demean.1D'[0]' -stim_base 1 -stim_label 1 roll \
-stim_file 2 motion_demean.1D'[1]' -stim_base 2 -stim_label 2 pitch \
-stim_file 3 motion_demean.1D'[2]' -stim_base 3 -stim_label 3 yaw \
-stim_file 4 motion_demean.1D'[3]' -stim_base 4 -stim_label 4 dS \
-stim_file 5 motion_demean.1D'[4]' -stim_base 5 -stim_label 5 dL \
-stim_file 6 motion_demean.1D'[5]' -stim_base 6 -stim_label 6 dP \
-jobs 6 \
-fout -tout -x1D X.xmat.1D -xjpeg X.jpg \
-fitts fitts.$subj \
-errts errts.{$subj} \
-bucket stats.$subj

# if 3dDeconvolve fails, terminate the script
if ( $status != 0 ) then
  echo '-----'
  echo '** 3dDeconvolve error, failing...!'
  echo ' (consider the file 3dDeconvolve.err)!'
  exit
endif

# display any large pariwise correlations from the X-matrix
1d_tool.py -show_cormat_warnings -infile X.xmat.1D |& tee out.cormat_warn.txt

# create an all_runs dataset to match the fitts, errts, etc.
3dTcat -prefix all_runs.$subj pb04.$subj.r*.scale+tlrc.HEAD

# -----
# create a temporal signal to noise ratio dataset
# signal: if 'scale' block, mean should be 100
# noise : compute standard deviation of errts
3dTstat -mean -prefix rm.signal.all all_runs.$subj+tlrc
3dTstat -stdev -prefix rm.noise.all errts.{$subj}+tlrc
3dcalc -a rm.signal.all+tlrc \
      -b rm.noise.all+tlrc \
      -expr 'a/b' -prefix TSNR.$subj

# -----
# compute sum of non-baseline regressors from the X-matrix
# (use 1d_tool.py to get list of regressor colums)

```

```

set reg_cols = `1d_tool.py -infile X.xmat.1D -show_indices_interest`
3dTstat -sum -prefix sum_ideal.1D X.xmat.1D[$reg_cols]"

# also, create a stimulus-only X-matrix, for easy review
1dcat X.xmat.1D[$reg_cols]" > X.stim.xmat.1D

# ===== auto block: generate review scripts =====

# generate a review script for the unprocessed EPI data
gen_epi_review.py -script @epi_review.$subj \
  -dsets pb00.$subj.r*.tcat+orig.HEAD

# generate scripts to review single subject results
# (try with defaults, but do not allow bad exit status)
gen_ss_review_scripts.py -exit0

# ===== auto block: finalize =====
=====

# remove temporary files
\rm -f rm.*

# if the basic subject review script is here, run it
# (want this to be the last text output)
if ( -e @ss_review_basic ) ./@ss_review_basic |& tee out.ss_review.$subj.txt

# return to parent directory
cd ..

echo "execution finished: `date`"

#
=====
=====
# script generated by the command:
#
# afni_proc.py -subj_id Pek_STDAH1050975 -script \
#   proc.Pek_STDAH1050975.min.tcsh -out_dir PROC.min_1050975 -dsets \
#   rest_1/restAFNI+orig -copy_anat anat_1/mprageAFNI+orig -blocks despike \
#   tshift align tlrc volreg scale regress -tcat_remove_first_trs 3 \
#   -tshift_opts_ts -tpattern alt+z2 -volreg_align_e2a -volreg_tlrc_warp \

```

```
# -tlrc_base MNI_caez_N27+tlrc -regress_opts_3dD -jobs 6 \
# -regress_apply_mot_types demean
```

APÊNDICE C – Resultado completo do teste t pareado

As tabelas abaixo estão divididas por medida de TG e nível de limiarização. As letras A, B, C... G indicam as estratégias de pré-processamento (Tabela 2) e o número entre parênteses indica o nível de limiarização. Nas tabelas só está representado os pares que não possuem diferença significativa ($p > 0,05$).

Tabela 11 - Resultado do teste t pareado para a Eficiência Global no nível de limiarização 0,2.

Eficiência Global (0,2)	A	B	C	D	E	F	G
A	-						
B		-					
C			-				
D				-		X	
E					-		
F						-	
G							-

Tabela 12 - Resultado do teste t pareado para o Comprimento do Caminho Característico no nível de limiarização 0,2.

Comprimento do caminho característico (0,2)	A	B	C	D	E	F	G
A	-						
B		-					
C			-				
D				-		X	
E					-		

A	-						
B		-					
C			-				
D				-	X		
E					-		
F						-	
G							-

Tabela 16 - Resultado do teste t pareado para o Comprimento do Caminho Característico no nível de limiarização 0,3.

Comprimento do Caminho Característico (0,3)	A	B	C	D	E	F	G
A	-						
B		-					
C			-				
E				-	X		
F					-		
G						-	
H							-

Tabela 17 - Resultado do teste t pareado para o Coeficiente de Agrupamento no nível de limiarização 0,3.

Coeficiente de Agrupamento (0,3)	A	B	C	D	E	F	G
A	-						
B		-					
C			-	X	X	X	X

D				-	X	X	
E					-	X	
F						-	
G							-

Tabela 18 - Resultado do teste t pareado para a Eficiência Local no nível de limiarização 0,3.

Eficiência Local (0,3)	A	B	C	D	E	F	G
A	-						
B		-					
C			-				X
D				-	X	X	
E					-	X	
F						-	
G							-

Tabela 19 - Resultado do teste t pareado para a Eficiência Global no nível de limiarização 0,4.

Eficiência Global (0,4)	A	B	C	D	E	F	G
A	-						
B		-					
C			-				
D				-		X	X
E					-		
F						-	X
G							-

A	-						
B		-					
C			-				
D				-	X	X	
E					-	X	
F						-	
G							-

Tabela 23 - Resultado do teste t pareado para a Eficiência Global no nível de limiarização 0,5.

Eficiência Global (0,5)	A	B	C	D	E	F	G
A	-						
B		-					
C			-				
D				-		X	X
E					-		
F						-	X
G							-

Tabela 24 - Resultado do teste t pareado para o Comprimento do Caminho Característico no nível de limiarização 0,5.

Comprimento do Caminho Característico (0,5)	A	B	C	D	E	F	G
A	-						
B		-					
C			-		X		

D				-	X	X	X
E					-	X	
F						-	X
G							-

Tabela 25 - Resultado do teste t pareado para o Coeficiente de Agrupamento no nível de limiarização 0,5.

Coeficiente de Agrupamento (0,5)	A	B	C	D	E	E	F
A	-						
B		-					
C			-				
D				-	X	X	X
E					-	X	
F						-	X
G							-

Tabela 26 - Resultado do teste t pareado para a Eficiência Local no nível de limiarização 0,5.

Eficiência Local (0,5)	A	B	C	D	E	F	G
A	-						
B		-					
C			-				
D				-	X	X	X
E					-	X	
F						-	X
G							-

APÊNDICE D – Resumo aceito na *Resting State Conference*

Comparing Scrubbing Strategies and how they Affect Graph Theoretical Measures in Resting State fMRI

N.K.Aurich¹, A.M. Marques da Silva^{1,2}, A.R. Franco^{1,2}

¹Graduate Program in Electrical Engineering, PUCRS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, ²Brain Institute (InsCer), PUCRS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul

Background: Graph theory (GT) is increasingly being applied to neuroimaging data to study the human brain connectome, at the structural and functional level [S. Achard and E. Bullmore, 2007]. However, measures from GT, such as global efficiency (GE), characteristic path length (CPL), average clustering coefficient (ACC) and average local efficiency (ALE) can alter simply based on the quality of the data and not just the mental state and/or diagnosis of the subject undergoing a resting state fMRI scan [H. Cao et al. 2013, C.G. Yan et al. 2013]. In fMRI data there are several sources of noise, including head motion, which has been show to have a great impact on GT measurements [C.G. Yan et al. 2013]. In order to correct possible artifacts in measures of connectivity, a method (scrubbing) [J. D. Power et. al 2011] was applied. Typically, scrubbing has been performed based on motion parameters, where time-points with excessive motion are censored. However, these motion parameters do not measure several other sources of noise that affect fMRI data, including those related to hardware imperfections and physiological noise. There are other measurements that seed to find outliers within the functional data [R. W. Cox, 2002], which identifies time-points that exceed a typical range. The aim of this paper is to evaluate how the choice of scrubbing method (head motion or outlier measurements) affects GT measurements.

Methods: A subset of healthy controls (N=102) from the 1000 Functional Connectome Project was used in this analysis. [B. B. Biswal et al. 2010]. All functional data were preprocessed through conventional resting state preprocessing steps using AFNI [R. W. Cox, 1996], including regressing noise measurements (WM, CSF and 6 motion parameters). Data were processed through two different scrubbing methods: Method 1 (censoring excessive head motion) and Method 2 (censoring data outliers), whereas the default parameters from ANFI were chosen. Data were then subdivided into 200 nodes [R. C. Craddock, 2012] and GT measurements were performed with the Brain Connectivity Toolbox [M. Rubinov and O. Sporns 2010]. The connectivity matrix was thresholded at three different levels (L): 0.2, 0.3, and 0.5.

Results: For each GT measure and thresholding levels, pairwise t-tests were performed to compare the two scrubbing methods. Significant statistical difference ($p < 0.01$) was found in 7 out of 12 pairs of measures, with the exception of ACC at $L = 0.2$, ACC and ALE at $L = 0.3$, and CPL at $L = 0.5$. Statistical difference ($p < 0.05$) of ACC was shown at $L = 0.5$.

Additionally, the correlation between the GT measures and average motion estimation, for both scrubbing methods, was calculated. Scrubbing method 1 showed a higher correlation compared to method 2, for all nine correlation contrasts.

Conclusions: More than half of GT measures were strongly affected by changing the scrubbing method, where ACC was less affected. This is worrisome, since a minor change, choosing scrubbing method, can substantially affect GT measures. Additionally, results have shown that scrubbing method with data outliers reduces motion related variation within data more than using motion estimation.

APÊNDICE E – Artigo submetido para a *Frontiers in Neuroscience*

Evaluating the Reliability of Different Preprocessing Steps to Estimate Graph Theoretical Measures in Resting State fMRI data

Nathassia Kadletz Aurich¹, José Osmar Alves Filho¹, Ana Maria Marques da Silva^{1,3,4}, Alexandre Rosa Franco^{1,2,3*}

¹Department of Electrical Engineering, School of Engineering, PUCRS, Porto Alegre, Brazil

²Graduate Program in Neuroscience, School of Medicine, PUCRS, Porto Alegre Brazil

³Brain Institute of Rio Grande do Sul (InsCer-RS), PUCRS, Porto Alegre, Brazil

⁴School of Physics, PUCRS, Porto Alegre, Brazil

* Correspondence: Alexandre Rosa Franco, Brain Institute of Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, 90610-000, Brazil.

alexandre.franco@pucrs.br

Keywords: resting state, functional MRI, graph theory, reliability, pre-processing

Abstract

With resting-state functional MRI (rs-fMRI) there are a variety of post-processing methods that quantify the human brain connectome. However, prior to calculating the functional connectivity of the brain, there is a choice of several preprocessing steps that need to be selected. In this paper, we have tested seven different preprocessing schemes and assessed the reliability between and within them through graph theoretical measures. Different schemes were tested on a publicly available dataset with rs-fMRI of healthy controls. The brain was parcellated into 190 nodes (CC200) and graph theoretical measures were calculated; global efficiency (GEFF), characteristic path length (CPL), clustering coefficient (ACC), and average local efficiency (ALE). Results indicate that results can significantly differ, based on which preprocessing steps are selected. We also found dependence between motion and graph theoretical measurements in most preprocessing strategies. However, with the use of scrubbing based on outliers within the functional time-series, results indicate an increase in reliability of GT measurements with a reduction in correlation with head motion.

1. Introduction

Resting-state functional MRI (rs-fMRI) is a neuroimaging method that has emerged as a powerful tool to evaluate functional connectivity patterns of the human brain (Fox and Greicius, 2010). Neuroimaging studies have demonstrated that the brain has a connectivity topology that can vary depending on mental state (Greicius, 2008), neuropsychological disorder (Liu et al., 2008; Sanz-Arigitá et al., 2010; Bassett et al., 2008; Rubinov et al., 2009;

Brier et al., 2014), sex (Tian et al., 2011) and even age (Achard and Bullmore, 2007; Micheloyannis et al., 2009; Wang et al., 2010). However, these studies depend on a signal (blood oxygen level dependency - BOLD) that is described by low frequency fluctuations ($<0,1\text{Hz}$) (Biswal et al., 1995) and has a very low signal to noise ratio. Thus even the slightest source of noise such as physiological fluctuations (respiration and cardiac fluctuations) as well as head motion can highly influence the final measures of connectivity. Hence, the preprocessing steps chosen to remove these non-neuronal fluctuations of these data is extremely important (Birn, 2012; Shmueli et al., 2007).

In a recent review, Bennett and Miller, (2010) highlight the importance of measuring the reliability in fMRI. They note that reliability of fMRI data is not high compared to other scientific measures, and there is still much work to be done to improve the reliability estimates. There are a considerable amount of methods to evaluate the reliability (intraclass correlation coefficient (ICC), Pearson correlation, coefficient of variation, cluster overlap, voxel counts, etc.), and the decision depends on the method that is being evaluated. With task-based fMRI, the reproducibility of the level of activation, cluster size and cluster location based on a task are of great relevance (Raemaekers et al., 2012). However, in rs-fMRI, there are several choices of post-processing methodologies that evaluate the brain's functional connectivity (Margulies et al., 2010), which their reliability needs to be measured.

In rs-fMRI, functional connectivity can be measured by variety of methods, including Independent Component Analysis (ICA), seed-based functional connectivity, Analysis of Low Frequency Fluctuations (ALFF), Graph Theory (GT), etc (Margulies et al., 2010; Rubinov and Sporns, 2010). Our group has previously (Franco et al., 2013) analyzed the reliability and reproducibility of Resting State Networks (RSN), according to two post-processing methods (ICA and seed-based functional connectivity) were reliability was assessed through ICC. Meindl et al. (Meindl et al., 2010) evaluated the test-retest reproducibility of the Default Mode Network (DMN) measured by ICA. In their study, patients were scanned in three different sessions, with two rs-fMRI runs at each session, in order to assess the inter-session and intra-session reproducibility. Reproducibility was measured by: absolute number of voxels in the volume of interest (VOI), displacement of the center of gravity of the VOIs and overlapping voxels for a respective VOI. Thomason et al., (2011) studied the reliability of the connectivity map through a longitudinal study of rs-fMRI of children. Using a Pearson's correlation, they evaluated the reliability within and between session in six RSNs. Turner et al., (2012) verified the reliability of ALFF in patients with schizophrenia. Test-rested was assessed through ICC, where results indicated that the reliability to be medium to moderate. More recently, Skidmore et al., (2013) used a cross-validation method for evaluating the reliability of ALFF in patients with Parkinson's disease.

Reliability studies generally evaluate the test-retest of a method through the same preprocessing strategy. This is important when dealing with longitudinal studies. However, it is known that a critical source of variation between studies can arise from simply removing, or changing parameters including from the preprocessing step on the functional data. Two independent studies, Weissenbacher et al., (2009) and Chang and Glover, (2009) analyzed the

VAN DEN HEUVEL et al. (2009)		x									19 controls
YAN et al. (2013)		x			x****	x	x	x	x		158 controls

* used two band-pass frequencies (0.04 - 0.08 Hz), (0.0083 - 0.15 Hz)

** Band-passed in three different frequency ranges: 0.01–0.1 Hz; 0.01–0.027 Hz; and 0.027–0.073 Hz

*** tested with and without global signal regression

**** performed motion regression with two different parameters; regressão por realinhamento: rigid-body 6-parametermodel and Friston 24-parametermode

Table 1 presents different studies that used GT measures to analyze the functional connectivity in controls as well as individuals with psychological and neurological diseases. Based on this table and knowing that adding or removing different stages of preprocessing can greatly affect the final results, we propose to evaluate different preprocessing methods of rs-fMRI data and how they affect GT measures. We have chosen seven different preprocessing schemes to evaluate the reliability between them and within them. This was tested on a publicly available dataset with rs-fMRI of healthy controls (http://fcon_1000.projects.nitrc.org/indi/IndiPro.html). Graph-based algorithms require the specification of network nodes. We used a parcellation mask in which the brain was segmented into 190 regions (CC200 - not including the cerebellum) based on functional similarity (Craddock et al., 2012). Graph theoretical measures evaluated were global efficiency (GEFF), characteristic path length (CPL), average clustering coefficient (ACC), and average local efficiency (ALE). Finally, preprocessing steps will be evaluated onto which preprocessing steps furnish the most stable graph theoretical measures across different subjects.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

The resting state fMRI data used in this paper consists in a publically available dataset, the 1000 Functional Connectomes Project which is part of the International Neuroimaging Data-sharing Initiative (INDI) (Biswal et al., 2010). A subset of these dataset was selected, where the inclusion criteria was; healthy control, right handed, data was collected from a homogeneous population and where there was a small variance in age between subject. A total of 102 subject from the Peking University where selected (Mean age = 11.62 ± 1.76 ; 43 female). All data was collected in a Siemens 3.0T MRI scanner with the following parameters, TR = 2000ms, TE = 30ms, and 240 image volumes (8 minutes).

2.2. Data Preprocessing

Functional data was preprocessed using AFNI's "afni_proc.py" scripting algorithm (http://afni.nimh.nih.gov/pub/dist/doc/program_help/afni_proc.py.html). Seven different preprocessing strategies have been evaluated. However, for all the preprocessing strategies, data underwent minimal preprocessing steps. Initially, the first 3 images where removed to avoid T1 effects, despiked, slice-time corrected, 3d motion corrected, nuisance regression with motion parameters, registered to MNI152 (using the T1 structural image), and scaled to percent signal change (average = 100). Registration to MNI space was visually inspected for

each subject. Spatial smoothing was not performed in order to not extend blood oxygen level dependency (BOLD) signal between different regions of interest (nodes). Additionally, motion parameters, as well as the average BOLD signal of cerebrospinal fluid (CSF), white matter (WM) and whole brain were extracted for subsequent use.

The seven preprocessing strategies are detailed in Table 2. The different strategies are based on increasing the number of processing techniques and of what is typically performed within the resting-state literature. Bandpass filtering consists of filtering the functional data between 0.01 and 0.1 Hz. WM, CSF and Global signal regression is a multiple regression step where the extracted CSF, WM or Global signals are used as nuisance variables. We are evaluating two different scrubbing options; either scrubbing based on motion parameters, or based on signal outliers within the BOLD data. Scrubbing consists of removing (censoring) time points of the functional data that pass a threshold chosen a-priori. This technique has only recently started to be used as a preprocessing step within resting state data (Power et al., 2014, 2012; Yan et al., 2013) using motion parameters.

Scrubbing based on motion parameters initially starts by estimating the amount of motion that occurs between subsequent images within the six motion parameters (translation: x,y,z; rotation: roll, pitch, yaw) estimated during the 3D motion correction preprocessing step. The amount of motion in each image is calculated by the sum of square differences in displacement:

$$Mot(i)_s = ((x_i - x_{i-1})^2 + (y_i - y_{i-1})^2 + (z_i - z_{i-1})^2 + (r_i - r_{i-1})^2 + (p_i - p_{i-1})^2 + (yaw_i - yaw_{i-1})^2)^{1/2} \text{ Equation (1)}$$

where x, y and z are the translation estimates and r, p, yaw are the rotation estimates, i is the image, and s is the subject. Time points that have motion above 0.2 mm were censored.

Table 2 - Description of the different preprocessing strategies evaluated.

Preprocessing strategy	Bandpass filtering	CSF and WM regression	Scrubbing with motion parameters	Scrubbing with Outliers	Global Signal Regression
A					
B	X				
C		X			
D	X	X			
E	X	X	X		
F	X	X		X	
G	X	X	X		X

In scrubbing based on outliers the time points are censored based directly on the signal intensity of the voxels throughout time (Cox, 2002). Specifically, for each voxel, the median ($m(v)$) and the median absolute deviation ($MAD(v)$) are calculated. Next, an acceptable intensity range for each voxel is defined by $[m(v) - a \cdot MAD(v) ; m(v) + a \cdot MAD(v)]$, where $a = Q^{-1}(0.01/N) \cdot \sqrt{(\pi/2)}$, and $Q()$ is the reversed Gaussian cumulative distribution function (cdf) and N is the length of the time series. If a time point of a particular voxel is outside this range, it is considered an outlier. For each time point, the total amount of outliers within all the voxels within a brain mask is computed. Time points are censored where 10% of voxels are considered outliers. The algorithm for estimating outliers was first shown and can be seen in detail here (Cox, 2002).

2.3. Regions of Interest (Nodes)

A publically available mask was used to segment the brain into 190 regions of interest (ROIs), the CC200 (Craddock et al., 2012). The ten regions that are contained within cerebellum were excluded from the analysis. For each subject, the average time series of the voxels within each ROI was calculated and subsequently used to calculate the graph theoretical measurements.

2.4. Graph Theory Measures

The connectivity matrix (CM) was estimated by pair-wise correlating (Pearson's r) the time series of the 190 nodes, leaving a total of 17955 correlation pairs. Before calculating the GT measures, a threshold must be applied to the CM. Four different threshold levels were tested (0.2, 0.3, 0.4 e 0.5), and subsequently binarized. GT measures were calculated in a freely available toolbox, Brain Connectivity Toolbox (<https://sites.google.com/site/bctnet/>). Global Efficiency (GEFF), Characteristic Path Length (CPL), Average Clustering Coefficient, and Average Local Efficiency (ALF) were measured for each subject, at each preprocessing strategy and threshold. A detailed review about these measures can be seen in (Rubinov and Sporns, 2010).

2.5. Statistical Analysis

We performed three distinct statistical analyses to evaluate the reliability of the different preprocessing strategies and also assess relationship with motion estimates.

2.5.1. Test 1 – Reliability across different strategies

Reliability across the seven different preprocessing strategies was evaluated. This was calculated through a repeated measures one-way ANOVA. This statistical analysis was performed for each GT measurement and also at each threshold level (0.2, 0.3, 0.4, and 0.5), with a total of 20 one-way ANOVAS. Follow up paired t-tests were also calculated in order to directly compare the different preprocessing strategies.

2.5.2. Test 2 – Reliability of the connectivity matrix

In order to fully evaluate how preprocessing methods affect the functional data, we have tested the reliability of the CM. The CM was evaluated directly without calculating the GT

measures. For each node pair, the standard deviation was calculated across the 102 subjects. Therefore, for each preprocessing method there is a standard deviation matrix that estimates how much variance there is across subjects within each node pair. Figure 1 illustrates a schematic of this test. Additionally, the average correlation was calculated for each preprocessing method.

2.5.3. Test 3 –Motion versus GT measures correlation

The relationship between the average motion and GT measurements was assessed. A correlation (Pearson's r) between each GT measurement and the average motion estimation of each subject was calculated. This test was performed to evaluate the ability to reduce, or remove the dependency of these GT measurements on the head motion. A similar analysis was performed by Yan et al. (Yan et al., 2013).

3. Results

3.1. Test 1 – Reliability across different strategies

A repeated measure ANOVA with a Greenhouse-Geisser correction determined that mean value of all the GT measurements differed significantly ($p < 0.001$) between different preprocessing strategies at each threshold. Since there is a total of 336 (21 pairs of preprocessing strategies, 4 levels of threshold and 4 different preprocessing methods) post-hoc paired t-tests performed (using Bonferroni correction), a summary of these tests is shown in Table 3. The grand majority of the paired t-tests indicated a statistical difference ($p < 0.05$) between the preprocessing strategies. Therefore, Table 1 only indicates the tests where the hypothesis was not rejected ($p > 0.05$), i.e. there was no statistical difference between the preprocessing strategies at a particular threshold and GT measure. Preprocessing strategies A and B differed statistically from all other preprocessing methods, consequently are not shown in Table 3. Numbers indicate the total amount of paired t-tests that were not rejected at a particular preprocessing strategy pair and GT measure across threshold levels. For example, when comparing preprocessing strategies 'C' and 'G' for ACC, there was statistical significant difference only at the 0.5 threshold, and no difference in thresholds 0.2, 0.3, and 0.4. Hence forward the number '3' in the cell. A detailed description of all the results post-hoc paired t-tests can be seen in supplementary Table 1.

Table 3 - Results from Test 1. Numbers indicate the amount of post-hoc paired t-tests (one for each threshold level) that did not show statistical differences between preprocessing strategies. Preprocessing strategies (A, B, C, ...) are described in Table 2.

Preprocessing Strategy	GT Measure	Preprocessing Strategy			
		D	E	F	G
C	GEFF				
	CPL		1		
	ACC	1	1	1	3

	ALE				2
D	GEFF	-		4	2
	CPL	-	1	4	1
	ACC	-	4	4	1
	ALE	-	3	4	2
E	GEFF	-	-	1	1
	CPL	-	-	1	
	ACC	-	-	4	
	ALE	-	-	4	
F	GEFF	-	-	-	2
	CPL	-	-	-	1
	ACC	-	-	-	1
	ALE	-	-	-	1

GEFF – Global Efficiency

CPL – Characteristic Path Length

ACC – Average Cluster Coefficient

ALE – Average Local Efficiency

3.2. Test 2 – Reliability of the connectivity matrix

Figure 1 exhibits the matrices that display the standard deviation across subjects for each node pair for each preprocessing strategy and their mean value. Additionally, the average correlation score for each preprocessing strategy is; A = 0.2640, B = 0.2967, C = 0.0291, D = 0.0251, E = 0.0225, F = 0.0238, and G = 0.0009.

3.3. Test 3 – Motion versus GT measures correlation

Pearson's correlation scores comparing the average motion of a subject per scan and their GT measure, at each threshold, are shown in Table 4.

Table 4 - Correlation scores between preprocessing strategies and average motion estimation parameters. Threshold levels were applied to the connectivity matrix. Preprocessing strategies (A, B, C, ...) are described in Table 2.

GT Measurement	Threshold level	A	B	C	D	E	F	G
GEFF	0.2	0.435	0.426	0.378	0.293	0.658	0.21	0.757
	0.3	0.446	0.423	0.384	0.313	0.701	0.253	0.72
	0.4	0.454	0.417	0.382	0.314	0.694	0.257	0.704
	0.5	0.46	0.432	0.334	0.269	0.675	0.188	0.687
	Mean	0.44875	0.4245	0.3695	0.29725	0.682	0.227	0.717
CPL	0.2	-0.427	-0.423	-0.378	-0.282	-0.667	-0.23	-0.762
	0.3	-0.411	-0.418	-0.305	-0.24	-0.664	-0.194	-0.695
	0.4	-0.388	-0.397	-0.133	-0.156	-0.589	-0.114	-0.629
	0.5	-0.351	-0.374	-0.001	-0.04	-0.368	-0.008	-0.241
	Mean	-0.39425	-0.403	-0.20425	-0.1795	-0.572	-0.1365	-0.58175
ACC	0.2	0.409	0.434	0.358	0.293	0.485	0.21	0.53

	0.3	0.423	0.448	0.339	0.286	0.391	0.182	0.405
	0.4	0.441	0.444	0.359	0.34	0.475	0.267	0.492
	0.5	0.456	0.442	0.354	0.286	0.516	0.211	0.568
	Mean	0.43225	0.442	0.3525	0.30125	0.46675	0.2175	0.49875
ALE	0.2	0.409	0.434	0.358	0.293	0.485	0.21	0.53
	0.3	0.436	0.442	0.361	0.29	0.531	0.228	0.517
	0.4	0.443	0.419	0.366	0.319	0.579	0.256	0.583
	0.5	0.453	0.422	0.369	0.286	0.58	0.196	0.608
	Mean	0.43525	0.42925	0.3635	0.297	0.54375	0.2225	0.5595

GEFF – Global Efficiency

CPL – Characteristic Path Length

ACC – Average Cluster Coefficient

ALE – Average Local Efficiency

4. Discussion

The objective of this study was to evaluate the reliability of GT measures across different preprocessing strategies and also test the reliability within a particular strategy. For us to be able to apply fMRI, or more specifically, rs-fMRI in a clinical setting, we must first critically evaluate its reliability and reproducibility at the subject level (Bennett and Miller, 2010). There are many sources of variability in fMRI data and unfortunately the steps chosen in the preprocessing pipeline can be one of these variables. Based on Table 1, there isn't a consensus on which preprocessing strategy is the best to be applied to functional data. Therefore, if there isn't even a consensus on the preprocessing strategies used to preprocess functional data, how can we establish if fMRI is reliable or not? We have chosen to test some of the mostly used preprocessing strategies for resting state data (Table 2), including a novel method, scrubbing by two different measurements (motion and BOLD signal outliers).

With a large (N=102) homogeneous group, we evaluated whether seven different preprocessing strategies can significantly change GT measurements. Analyzing results from Table 3, final measurements can be altered significantly simply by including or removing a preprocessing step. Only preprocessing strategies 'D' and 'F' do not differ at the different threshold levels tested. The difference between the pipelines in 'D' and 'F' is that 'F' includes a scrubbing with outliers step.

Figure 2 shows the average GT measurements for all the preprocessing methods and different thresholds tested. It is evident that preprocessing strategies 'A' and 'B' differ the most from the other methods. These two pipelines are the ones that employ the least amount of processing steps. Additionally, the average correlation scores in the CM are the largest for methods 'A' and 'B', with $r=0.2640$ and $r=0.2967$ respectively. As seen in Table 1, earlier studies in GT employed similar preprocessing strategies. In general, methods 'D' through 'G' do not differ as much and are typically the preprocessing strategies mostly used in the more

recent studies. Preprocessing method 'C', which does not include bandpass filtering, is also different in most GT measurements (Table 3) compared to other methods.

Test number 2 had the purpose of evaluating directly the CM across subjects, without calculating the final GT measurements. Reliability was assessed by calculating, at each node pair, the variance in correlation score across subjects within a preprocessing strategy. Figure 3 indicates that, given the preprocessing strategy chosen, there can be an increase or decrease in the variation of the CM across subjects. The lowest variation can be seen in methods 'C' with an increase in method 'A'. Methods 'D' and 'F' have almost identical variation in the CM across subjects, with an average standard deviation of the CM equal to 0.1729 and 0.1722 respectively. The highest average standard deviation is seen in methods 'B', 'E' and 'G'.

The final test performed was to verify the relationship of GT measurements and subject head motion. Across the different GM measurements and threshold levels, on average, preprocessing strategy 'F' has the lowest correlation with head motion, closely followed by method 'D'. The other preprocessing strategies show increased correlation with average head motion estimates.

Yan et al. (2013) found similar results to ours regarding head motion. They compared preprocessing using scrubbing by motion parameters with global signal nuisance regression, and found that using a combination of both increases the relationship of GT measurements and motion estimation, compared to only using global regression. In addition, Liang et al. (2012) investigated the reliability of GT measurements on rs-MRI and found that the use of the global signal regression produces less reliable results than without using this preprocessing step, even when measured between scans acquired with short and long intervals. Also in respect to global signal regression, the average CM among subjects for the 'G' preprocessing strategy is close to zero, which may indicate the number of positive and negative correlation scores is near. This corroborates the study by Braun et al., (2011), where they assessed the reliability of CM and found that the number of negative correlations varied greatly between the different strategies. With the use of the global signal regression, approximately half of the correlations were negative, whereas the other methods that number ranges from 0 to 34.8%.

Considering all the tests performed, preprocessing strategies 'D' and 'F' portray as being the most reliable methods. The only difference between them is that preprocessing strategy 'F' includes a scrubbing through outliers step. Additionally, they also present results that cannot be statistically differentiated (Table 3). Preprocessing method 'D' is a well-established preprocessing pipeline that has been proven to be a reliable scheme (Weissenbacher et al., 2009). There is however a decrease in dependency between on GT measures and head motion when using the scrubbing with outliers scheme (method 'F'). Therefore, based on the results, we recommend using preprocessing strategy 'F' to increase the reliability across subjects and reduce the dependency on head motion. We were unable to find in the literature articles that have used scrubbing based on outliers on GT measures to compare results.

We have shown a preprocessing strategy that is reliable among a large homogeneous group, were we point to a method that best reduces the variance across subjects (controls) and controls for head motion. However, in research studies were it is intended to compare clinical populations (i.e. patients vs. controls) a reduction in the variation of the CM might not be optimal. This is the major limitation of this study. Also, different preprocessing strategies can be selected and/or developed that were not tested in this study. Finally, further research needs to be performed to establish which preprocessing strategy reduces intra-group variation, while increasing inter-group differences.

5. Acknowledgement

The authors would like to acknowledge the financial support of Dr. Buchweitz through CAPES project, PUCRS for the N. Aurich's graduate scholarship and 1000 Connectomes Functional Project which is part of the International Neuroimaging Data-sharing Initiative (INDI) for making this dataset available.

6. References

- Achard, S., and Bullmore, E. (2007). Efficiency and cost of economical brain functional networks. *PLoS Comput. Biol.* 3, e17. doi:10.1371/journal.pcbi.0030017.
- Bassett, D. S., Bullmore, E., Verchinski, B. a, Mattay, V. S., Weinberger, D. R., and Meyer-Lindenberg, A. (2008). Hierarchical organization of human cortical networks in health and schizophrenia. *J. Neurosci.* 28, 9239–48. doi:10.1523/JNEUROSCI.1929-08.2008.
- Bennett, C. M., and Miller, M. B. (2010). How reliable are the results from functional magnetic resonance imaging? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1191, 133–55. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05446.x.
- Birn, R. M. (2012). The role of physiological noise in resting-state functional connectivity. *Neuroimage.* doi:10.1016/j.neuroimage.2012.01.016.
- Biswal, B. B., Mennes, M., Zuo, X.-N., Gohel, S., Kelly, C., Smith, S. M., Beckmann, C. F., Adelman, J. S., Buckner, R. L., Colcombe, S., et al. (2010). Toward discovery science of human brain function. *PNAS* 107, 4734–9. doi:10.1073/pnas.0911855107.
- Biswal, B., Yetkin, F. Z., Haughton, V. M., and Hyde, J. S. (1995). Functional Connectivity in the Motor Cortex of Resting. *Magn. Reson. Med.* 34, 537–541.
- Braun, U., Plichta, M. M., Esslinger, C., Sauer, C., Haddad, L., Grimm, O., Mier, D., Mohnke, S., Heinz, A., Erk, S., et al. (2012). Test-retest reliability of resting-state connectivity network characteristics using fMRI and graph theoretical measures. *Neuroimage* 59, 1404–1412. doi:10.1016/j.neuroimage.2011.08.044.

- Brier, M. R., Thomas, J. B., Fagan, A. M., Hassenstab, J., Holtzman, D. M., Benzinger, T. L., Morris, J. C., and Ances, B. M. (2014). Functional connectivity and graph theory in preclinical Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 35, 757–68. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.10.081.
- Chang, C., and Glover, G. H. (2009). Effects of model-based physiological noise correction on default mode network anti-correlations and correlations. *Neuroimage* 47, 1448–59. doi:10.1016/j.neuroimage.2009.05.012.
- Cox, R. W. (2002). Outlier Detection in fMRI Time Series. in *Proceedures International Society for Magnetic Resonance*, 1.
- Craddock, R. C., James, G. A., Holtzheimer, P. E., Hu, X. P., and Mayberg, H. S. (2012). A Whole Brain fMRI Atlas Generated Via Spatially Constrained Spectral Clustering. *Hum. Brain Mapp.* 33, 1914–1928. doi:10.1002/hbm.21333.
- Van Dijk, K. R. a, Sabuncu, M. R., and Buckner, R. L. (2012). The influence of head motion on intrinsic functional connectivity MRI. *Neuroimage* 59, 431–8. doi:10.1016/j.neuroimage.2011.07.044.
- Fox, M. D., and Greicius, M. (2010). Clinical applications of resting state functional connectivity. *Front. Syst. Neurosci.* 4, 19. doi:10.3389/fnsys.2010.00019.
- Franco, A. R., Mannell, M. V, Calhoun, V. D., and Mayer, A. R. (2013). Impact of analysis methods on the reproducibility and reliability of resting-state networks. *Brain Connect.* 3, 363–74. doi:10.1089/brain.2012.0134.
- Greicius, M. (2008). Resting-state functional connectivity in neuropsychiatric disorders. *Curr. Opin. Neurol.* 21, 424–30. doi:10.1097/WCO.0b013e328306f2c5.
- Hallquist, M. N., Hwang, K., and Luna, B. (2013). The nuisance of nuisance regression: spectral misspecification in a common approach to resting-state fMRI preprocessing reintroduces noise and obscures functional connectivity. *Neuroimage* 82, 208–25. doi:10.1016/j.neuroimage.2013.05.116.
- Liang, X., Wang, J., Yan, C., Shu, N., Xu, K., Gong, G., and He, Y. (2012). Effects of different correlation metrics and preprocessing factors on small-world brain functional networks: a resting-state functional MRI study. *PLoS One* 7, e32766. doi:10.1371/journal.pone.0032766.
- Liu, Y., Liang, M., Yuan Zou, Hao, Y., Song, M., Yu, C., Liu, H., Liu, Z., and Jiang, T. (2008). Disrupted small-world networks in schizophrenia. *Brain* 131, 945–61. doi:10.1093/brain/awn018.
- Margulies, D. S., Böttger, J., Long, X., Lv, Y., Kelly, C., Schäfer, A., Goldhahn, D., Abbushi, A., Milham, M. P., Lohmann, G., et al. (2010). Resting developments: a review of fMRI post-

processing methodologies for spontaneous brain activity. *MAGMA*. doi:10.1007/s10334-010-0228-5.

Meindl, T., Teipel, S., Elmouden, R., Mueller, S., Koch, W., Dietrich, O., Coates, U., Reiser, M., and Glaser, C. (2010). Test-retest reproducibility of the default-mode network in healthy individuals. *Hum. Brain Mapp.* 31, 237–46. doi:10.1002/hbm.20860.

Micheloyannis, S., Vourkas, M., Tsirka, V., Karakonstantaki, E., Kanatsouli, K., and Stam, C. J. (2009). The influence of ageing on complex brain networks: a graph theoretical analysis. *Hum. Brain Mapp.* 30, 200–8. doi:10.1002/hbm.20492.

Power, J. D., Barnes, K. a, Snyder, A. Z., Schlaggar, B. L., and Petersen, S. E. (2012). Spurious but systematic correlations in functional connectivity MRI networks arise from subject motion. *Neuroimage* 59, 2142–54. doi:10.1016/j.neuroimage.2011.10.018.

Power, J. D., Mitra, A., Laumann, T. O., Snyder, A. Z., Schlaggar, B. L., and Petersen, S. E. (2014). Methods to detect, characterize, and remove motion artifact in resting state fMRI. *Neuroimage* 84, 320–41. doi:10.1016/j.neuroimage.2013.08.048.

Raemaekers, M., du Plessis, S., Ramsey, N. F., Weusten, J. M. H., and Vink, M. (2012). Test-retest variability underlying fMRI measurements. *Neuroimage* 60, 717–27. doi:10.1016/j.neuroimage.2011.11.061.

Rubinov, M., Knock, S. a, Stam, C. J., Micheloyannis, S., Harris, A. W. F., Williams, L. M., and Breakspear, M. (2009). Small-world properties of nonlinear brain activity in schizophrenia. *Hum. Brain Mapp.* 30, 403–16. doi:10.1002/hbm.20517.

Rubinov, M., and Sporns, O. (2010). Complex network measures of brain connectivity: uses and interpretations. *Neuroimage* 52, 1059–69. doi:10.1016/j.neuroimage.2009.10.003.

Sanz-Arigita, E. J., Schoonheim, M. M., Damoiseaux, J. S., Rombouts, S. a R. B., Maris, E., Barkhof, F., Scheltens, P., and Stam, C. J. (2010). Loss of “small-world” networks in Alzheimer’s disease: graph analysis of FMRI resting-state functional connectivity. *PLoS One* 5, e13788. doi:10.1371/journal.pone.0013788.

Satterthwaite, T. D., Elliott, M. a, Gerraty, R. T., Ruparel, K., Loughhead, J., Calkins, M. E., Eickhoff, S. B., Hakonarson, H., Gur, R. C., Gur, R. E., et al. (2012). An improved framework for confound regression and filtering for control of motion artifact in the preprocessing of resting-state functional connectivity data. *Neuroimage*. doi:10.1016/j.neuroimage.2012.08.052.

Shmueli, K., van Gelderen, P., de Zwart, J. a, Horovitz, S. G., Fukunaga, M., Jansma, J. M., and Duyn, J. H. (2007). Low-frequency fluctuations in the cardiac rate as a source of variance in the resting-state fMRI BOLD signal. *Neuroimage* 38, 306–20. doi:10.1016/j.neuroimage.2007.07.037.

Skidmore, F. M., Yang, M., Baxter, L., von Deneen, K. M., Collingwood, J., He, G., White, K., Korenkevych, D., Savenkov, a, Heilman, K. M., et al. (2013). Reliability analysis of the resting state can sensitively and specifically identify the presence of Parkinson disease. *Neuroimage* 75, 249–61. doi:10.1016/j.neuroimage.2011.06.056.

Thomason, M. E., Dennis, E. L., Joshi, A. a, Joshi, S. H., Dinov, I. D., Chang, C., Henry, M. L., Johnson, R. F., Thompson, P. M., Toga, A. W., et al. (2011). Resting-state fMRI can reliably map neural networks in children. *Neuroimage* 55, 165–75. doi:10.1016/j.neuroimage.2010.11.080.

Tian, L., Wang, J., Yan, C., and He, Y. (2011). Hemisphere- and gender-related differences in small-world brain networks: a resting-state functional MRI study. *Neuroimage* 54, 191–202. doi:10.1016/j.neuroimage.2010.07.066.

Turner, J. a, Chen, H., Mathalon, D. H., Allen, E. a, Mayer, A. R., Abbott, C. C., Calhoun, V. D., and Bustillo, J. (2012). Reliability of the amplitude of low-frequency fluctuations in resting state fMRI in chronic schizophrenia. *Psychiatry Res.* 201, 253–5. doi:10.1016/j.psychresns.2011.09.012.

Wang, L., Li, Y., Metzak, P., He, Y., and Woodward, T. S. (2010). Age-related changes in topological patterns of large-scale brain functional networks during memory encoding and recognition. *Neuroimage* 50, 862–72. doi:10.1016/j.neuroimage.2010.01.044.

Weissenbacher, A., Kasess, C., Gerstl, F., Lanzenberger, R., Moser, E., and Windischberger, C. (2009). Correlations and anticorrelations in resting-state functional connectivity MRI: A quantitative comparison of preprocessing strategies. *Neuroimage* 47, 1408–1416. doi:10.1016/j.neuroimage.2009.05.005.

Yan, C.-G., Craddock, R. C., He, Y., and Milham, M. P. (2013). Addressing head motion dependencies for small-world topologies in functional connectomics. *Front. Hum. Neurosci.* 7, 910. doi:10.3389/fnhum.2013.00910.

7. Figure legends

Figure 1 – An illustrative schematic of Test 2. For each node pair, the standard deviation of the correlation (r_s) is calculated across subjects. The Standard Deviation Matrix is used to assess the reliability of a preprocessing strategy.

Figure 2 – Graph Theoretical Measurements for each of the preprocessing strategies and threshold level applied to the connectivity matrix. Error bars indicate standard deviation across groups and GEFF – Global Efficiency, CLP – Characteristic Path Length, ACC - Average Cluster Coefficient, ALE – Average Local Efficiency. Preprocessing strategies (A, B, C, ...) are described in Table 2.

Figure 3 – Standard Deviation Matrices, which are results from Test 2. The mean standard deviation (stdev) is indicated for each preprocessing strategy and is calculated only from the

right-superior diagonal of the matrix. Preprocessing strategies (A, B, C, ...) are described in Table 2.

8. Supplementary Material

Supplementary Tables: Follow-up paired t-test results from Test 1.

APÊNDICE F – Artigo submetido para Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica**CORRELATION BETWEEN NOISE ESTIMATES AND GRAPH THEORETICAL MEASUREMENTS ON RESTING STATE FMRI DATA**

N. K. Aurich¹, A. R. Franco^{1,2,3}, J. O. Alves Filho¹, A. M. Marques da Silva^{1,3,4}

¹Department of Electrical Engineering, School of Engineering, PUCRS, Porto Alegre, Brazil

²Graduate Program in Neuroscience, School of Medicine, PUCRS, Porto Alegre Brazil

³Brain Institute of Rio Grande do Sul (InsCer-RS), PUCRS, Porto Alegre, Brazil

⁴School of Physics, PUCRS, Porto Alegre, Brazil

email: alexandre.franco@pucrs.br

Abstract: Graph theory applied to functional Magnetic Resonance Imaging (fMRI) analysis allows valuable and distinct information of the functional network structure within the brain. Due to the sensitivity of graph theoretical measures, any noise in the data may alter these measurements, including head motion. However, noise in fMRI can be generated not only by head motion, but several other undesired sources, such as physiological noise or equipment errors. The amount of noise can be estimated through an outlier measurement of the time series within the voxels. This article aims to assess the impact of noise in fMRI data in Graph Theoretical Measurements (GTM), in a normal population, using two parameters: patient motion and number of outliers in the functional data. We correlate the GTM (Global Efficiency, GE; Characteristic Path Length, CPL; Average Local Efficiency, ALE; Average Clustering Coefficient, ACC) with the two noise parameters with different thresholds (0.2, 0.3, 0.5). We found high levels of correlation between GTM and patient motion estimation (ME) and outlier measurements (OM). However, there is a greater correlation between OM and GTM than ME and GTM. Our results demonstrated that GTM are affected by more than just head motion, by observing the outliers within the functional time series.

Keywords: fMRI, resting state, graph theoretical measures

Introduction

The analysis of complex networks is an area that is currently being extensively explored. The neural networks of the brain is a typical example of a complex network. The analysis of complex networks allows us to describe important properties of complex systems, quantifying their topology. The study of topological properties of the network is called graph theory. When graph theory is applied to evaluate functional magnetic resonance images (fMRI), the nodes are the brain regions (i.e. regions of interest - ROIs) chosen a priori, and the edges are the connections (i.e. functional correlation) between the ROIs [1].

The application of graph theory in fMRI allows us to get valuable and distinct information that is not obtained by usual methods for evaluating brain connectivity [2], such as ROI connectivity maps. Furthermore, through the use of resting state fMRI (rs-fMRI) and electroencephalography data, it was demonstrated that the brain is organized in such a way that it embraces several small-world properties [3][4][5]. Graph theory is increasingly being applied in neuroimaging data, and novel measurements are being created and tested for their potential applicability to study the connectome of the human brain at a structural and functional level [1][6].

Neuroimaging studies have shown that the brain topology can vary according to mental state, including neuropsychological disorders [7] [8] [9], age [4] [10] [11] and even sex [12]. Henceforward, even between healthy individuals the architecture of the neural network can be distinct.

Knowing that head motion alters the signal and induces erroneous correlations in rs-fMRI data [13] a study of the impact of head motion on measurements of graph theory was required. Yan et al., [15] evaluated different forms of motion estimation in rs-fMRI and found that graph theoretical measurements (GTM) vary quite substantially depending on level of motion.

However, noise in fMRI can be generated not only by head motion [14] but several other undesired reasons, such as: thermal noise intrinsic to the patient and electronic equipment's, noise related to the imperfections of hardware, noise related to cardiac, respiratory cycle and other physiological processes.

This article aims to assess the impact of noise in fMRI data in GTM, in a normal population, using two parameters: patient motion and number of outliers in the functional data. The latter was chosen because outlier measurements not only address motion, but also other sources of noise.

Materials and methods

Data Sample

The sample used in this work consists in a publically available dataset, the 1000 connectomes Functional Project which is part of the International Neuroimaging Data-sharing Initiative (INDI) (http://fcon_1000.projects.nitrc.org/) [15]. One hundred and two subjects from a subset of these dataset from Peking University were used in this study, including right handed healthy controls.

Data preprocessing

All functional data was preprocessed using AFNI [16]. Data was initially despiked, slice-time corrected, and motion corrected as explained below. Then it was spatially normalized to a

standard space (MNI152), and passed through a band-pass filter (0.01 - 0.1 Hz). Additionally, the average signal of white matter and cerebrospinal fluid as well as the six estimated motion parameters were regressed against the functional data.

Motion Estimate (ME)

Motion correction in functional data is performed using a 6-parameter rigid body affine transformation (AFNI - 3dvolreg). Specifically, using a reference image (typically the first image in the functional scan) and an optimization algorithm (linearized weighted least squares) the six motion parameters (translation: x,y,z; rotation: roll, pitch, yaw) are estimated in each functional image and used to align data in preprocessing steps. The amount of motion in each image is calculated by:

$$\text{Mot}(i)_s = \sqrt{(x_i - x_{(i-1)})^2 + (y_i - y_{(i-1)})^2 + (z_i - z_{(i-1)})^2 + (r_i - r_{(i-1)})^2 + (p_i - p_{(i-1)})^2 + (\text{yaw}_i - \text{yaw}_{(i-1)})^2} \quad (1)$$

where x, y and z are the translation estimates and r, p, yaw are the rotation estimates, i is image, and s is the subject. The amount of motion of each subject within a functional scan was estimated by calculating the average of Mot(i)s across time, denoted here as motion estimate (ME) score. ME scores were correlated with GTM.

Outlier Measurement (OM)

Outliers measurement is calculated by analyzing time series of all the voxels within the brain. For each voxel, the median ($m(v)$) and the median absolute deviation ($MAD(v)$) are calculated. Next, an acceptable intensity range for each voxel is defined by $[m(v) - a \cdot MAD(v); m(v) + a \cdot MAD(v)]$, where $a = Q^{-1}(0.01/N) \cdot \sqrt{\pi/2}$, and $Q()$ is the reversed Gaussian cdf and N is the length of the time series. If a time point of a particular voxel is outside this range, it is considered an outlier. For each time point, the total amount of outliers within all the voxels is computed. Finally, the average number of outliers throughout time is defined as the outlier measurement (OM) and is compared to GTM [17].

Network Extraction

To define the nodes, a mask that divides the brain into 200 regions [18] was used. To define the edges, a connectivity matrix was created by calculating the pairwise functional correlation between each node-pair. Using the Brain Connectivity Toolbox [1], the following GTM were computed: characteristic path length (CPL), global efficiency (GE), average clustering coefficient (ACC), and average local efficiency (ALE).

Results

The average ME across all subjects is 0.0672 (± 0.0232) and the average OM is 0.0028 (± 0.0069). With a 0.2 threshold on the connectivity matrix, the resulting average GTM were: GE= 0.568 (± 0.022), CPL=1.959 (± 0.065), ALE=0.659 (± 0.055) and ACC=0.430 (± 0.051). Correlation between ME and OM and GTM (with different thresholds on the connectivity matrix and corresponding statistical p-score) are displayed in Tables 1 and 2, respectively.

Table 1. Correlation – Graph theoretical Measures and Motion Estimation

GT Measures	Threshold		
	0.2	0.3	0.5
GE	0.293 ($p < 0.005$)	0.313 ($p < 0.001$)	0.269 ($p < 0.01$)
CPL	-0.282 ($p < 0.005$)	-0.240 ($p < 0.05$)	-0.040 ($p > 0.05$)
ALE	0.293 ($p < 0.005$)	0.290 ($p < 0.005$)	0.286 ($p < 0.005$)
ACC	0.261 ($p < 0.01$)	0.286 ($p < 0.005$)	0.286 ($p < 0.005$)

GT – Graph Theoretical, GE – Global Efficiency, CPL – Characteristic Path Length, ALE – Average Local Efficiency and ACC – Average Clustering Coefficient.

Table 1. Correlation – Graph theoretical Measures and Outlier Measurements

GT	Threshold		
	0.2	0.3	0.5
GE	0.476 ($p < 0.001$)	0.475 ($p < 0.001$)	0.511 ($p < 0.001$)
CPL	-0.435 ($p < 0.001$)	-0.426 ($p < 0.001$)	-0.151 ($p > 0.05$)
ALE	0.375 ($p < 0.001$)	0.365 ($p < 0.001$)	0.397 ($p < 0.001$)
ACC	0.369 ($p < 0.001$)	0.333 ($p < 0.001$)	0.347 ($p < 0.001$)

GT – Graph Theoretical, GE – Global Efficiency, CPL – Characteristic Path Length, ALE – Average Local Efficiency and ACC – Average Clustering Coefficient.

A graphical representation of the correlation between GTM and GE are shown in Fig. 1(a) and 1(b). Analyzing Fig. 1(b) it appears that one subject exhibit an elevated amount of OM (indicated in a red circle). The correlation between the noise estimates (ME and OM) and

GTM (threshold = 0.2) were recalculated without the one subject with elevated OM. Correlation between ME and GTM are the following: GE=0.219 ($p<0.05$), CPL=-0.219 ($p<0.05$), ALE=0.240 ($p<0.05$) and ACC=0.203 ($p<0.05$). Correlation between OM and GTM without the outlier subjects are the following: GE=0.443 ($p<0.001$), CPL=-0.441 ($p<0.001$), ALE=0.377 ($p<0.001$) and ACC=0.342 ($p<0.001$). Finally, Additional analysis showed that there was a correlation of $r=0.453$ ($p<0.001$) between the ME and OM.

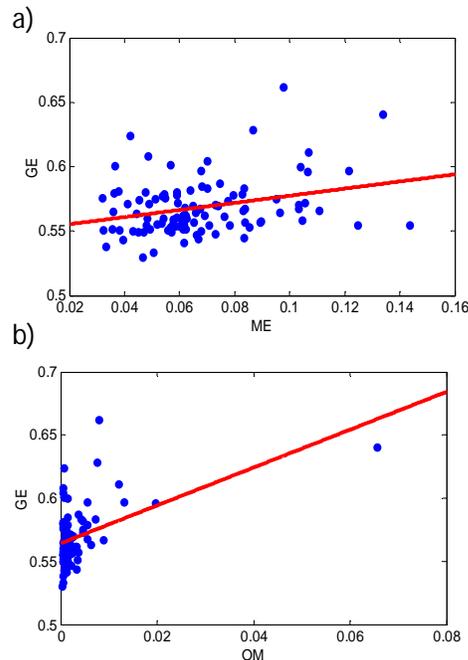


Figure 1 – Grafical representing of the correlation between (a) Global Efficiency (GE) and Motion Estimation (ME) and (b) GE and Outlier Measurement. In (b), red circles represent two subjects that had excessive outliers.

Discussion

The objective of this study was to evaluate the effect of two different methods to measure noise in fMRI data on graph theoretical measurements: estimation of head motion and the calculation time series outliers. Specifically, the effect was tested with a homogeneous group of healthy controls, which underwent an rs-fMRI scan. It was expected and desired that there would be little or even no relationship between noise measurements and GTM. However, it was observed that there is in fact a high level of correlation between noise measurements (ME and OM) and GTM.

It has been shown that head motion can affect GTM [19], however, there are also other sources of noise in fMRI that are not captured by algorithms that estimate motion. Within the preprocessing steps of fMRI, algorithms attempt to remove or minimize the effect of these imperfections within the data, using motion estimation and average signals from white matter

and cerebrospinal fluid (where it is expected to have no BOLD signal) as nuisance variables in a multiple regression analysis. We have performed these preprocessing steps in our study. It is supposed that OM is a means of measuring the effect of the all the different noise sources that may affect fMRI data.

Overall, our results indicate that the GTM are more highly correlated with OM compared to ME. This was observed for all the GTM and at different levels of threshold of the connectivity matrix (see Tables 1 and 2). The difference in the OM correlation with GTM, in all threshold are higher than ME.

It can also be observed that there is a general decrease in correlation between the noise estimates and GTM as connectivity matrix threshold increases. With higher thresholds only the stronger connections (higher r-scores) are kept, precisely those that are not affected by noise. Also, it was observed that there is still a high level of correlation between GTM and OM, even when the one subject with elevated OM level was removed from analysis. The removal of subjects with high level of noise or head motion from a study is usually done in fMRI studies. However, through the results in this article, this has been shown to not be sufficient since there still is a correlation between GTM and OM or ME.

Conclusion

Our results agree with the results obtained by previous study [19], where GTM are affected by head motion. However, we have extended the analysis and shown that GTM are affected by more than just head motion, by observing the outliers within the functional time series. This is indicated by the correlation score between ME and OM ($r=0.453$, $p<0.001$), where the correspondence between them is not perfect.

Measuring outliers in the time series within voxels is not a faultless measurement of the level of noise in functional data. However, there is still no complete and precise way to estimate noise.

Further work still needs to be done to completely understand the effects of noise in GTM. More importantly, we need to develop techniques that reliably “clean up” functional data to be used in brain topology measurements, in order to use GTM to understand different clinical populations or groups.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the financial support of Dr. Buchweitz through CAPES project, PUCRS for the N. Aurich’s scholarship and 1000 Connectomes Functional

Project which is part of the International Neuroimaging Data-sharing Initiative (INDI) for making this dataset available.

References

- [1] M. Rubinov and O. Sporns, “Complex network measures of brain connectivity: uses and interpretations.,” *Neuroimage*, vol. 52, no. 3, pp. 1059–69, Sep. 2010.
- [2] H. Cao, M. M. Plichta, A. Schäfer, L. Haddad, O. Grimm, M. Schneider, C. Esslinger, P. Kirsch, A. Meyer-Lindenberg, and H. Tost, “Test-retest reliability of fMRI-based graph theoretical properties during working memory, emotion processing, and resting state.,” *Neuroimage*, vol. 84, pp. 888–900, Jan. 2013.
- [3] S. Micheloyannis, E. Pachou, C. J. Stam, M. Vourkas, S. Erimaki, and V. Tsirka, “Using graph theoretical analysis of multi channel EEG to evaluate the neural efficiency hypothesis.,” *Neurosci. Lett.*, vol. 402, no. 3, pp. 273–7, Jul. 2006.
- [4] S. Achard and E. Bullmore, “Efficiency and cost of economical brain functional networks.,” *PLoS Comput. Biol.*, vol. 3, no. 2, p. e17, Feb. 2007.
- [5] M. P. van den Heuvel, C. J. Stam, M. Boersma, and H. E. Hulshoff Pol, “Small-world and scale-free organization of voxel-based resting-state functional connectivity in the human brain.,” *Neuroimage*, vol. 43, no. 3, pp. 528–39, Nov. 2008.
- [6] E. Bullmore and O. Sporns, “Complex brain networks: graph theoretical analysis of structural and functional systems.,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 10, no. 3, pp. 186–98, Mar. 2009.
- [7] Y. Liu, M. Liang, Yuan Zou, Y. Hao, M. Song, C. Yu, H. Liu, Z. Liu, and T. Jiang, “Disrupted small-world networks in schizophrenia.,” *Brain*, vol. 131, no. Pt 4, pp. 945–61, Apr. 2008.
- [8] D. S. Bassett, E. Bullmore, B. a Verchinski, V. S. Mattay, D. R. Weinberger, and A. Meyer-Lindenberg, “Hierarchical organization of human cortical networks in health and schizophrenia.,” *J. Neurosci.*, vol. 28, no. 37, pp. 9239–48, Sep. 2008.
- [9] M. Rubinov, S. a Knock, C. J. Stam, S. Micheloyannis, A. W. F. Harris, L. M. Williams, and M. Breakspear, “Small-world properties of nonlinear brain activity in schizophrenia.,” *Hum. Brain Mapp.*, vol. 30, no. 2, pp. 403–16, Feb. 2009.
- [10] S. Micheloyannis, M. Vourkas, V. Tsirka, E. Karakonstantaki, K. Kanatsouli, and C. J. Stam, “The influence of ageing on complex brain networks: a graph theoretical analysis.,” *Hum. Brain Mapp.*, vol. 30, no. 1, pp. 200–8, Jan. 2009.

- [11] L. Wang, Y. Li, P. Metzak, Y. He, and T. S. Woodward, "Age-related changes in topological patterns of large-scale brain functional networks during memory encoding and recognition.," *Neuroimage*, vol. 50, no. 3, pp. 862–72, Apr. 2010.
- [12] L. Tian, J. Wang, C. Yan, and Y. He, "Hemisphere- and gender-related differences in small-world brain networks: a resting-state functional MRI study.," *Neuroimage*, vol. 54, no. 1, pp. 191–202, Jan. 2011.
- [13] J. D. Power, K. a Barnes, A. Z. Snyder, B. L. Schlaggar, and S. E. Petersen, "Spurious but systematic correlations in functional connectivity MRI networks arise from subject motion.," *Neuroimage*, vol. 59, no. 3, pp. 2142–54, Feb. 2011.
- [14] S. A. Huettel, A. W. Song, and G. McCarthy, *Functional Magnetic Resonance Imaging*, 2a Edição. Sunderland, Massachusetts U.S.A.: Sinauer Associates, Inc, 2009, p. 510 p.
- [15] B. B. Biswal, M. et al., "Toward discovery science of human brain function.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 10, pp. 4734–9, Mar. 2010.
- [16] R. W. Cox, "AFNI: software for analysis and visualization of functional magnetic resonance neuroimages.," *Computers and biomedical research, an international journal*, vol. 29, no. 3. pp. 1–13, Jun-1996.
- [17] R. W. Cox, "Outlier Detection in fMRI Time Series," in *Procedures International Society for Magnetic Resonance*, 2002, vol. 10, p. 1.
- [18] R. C. Craddock, G. A. James, P. E. Holtzheimer, X. P. Hu, and H. S. Mayberg, "A Whole Brain fMRI Atlas Generated Via Spatially Constrained Spectral Clustering.," *Hum. Brain Mapp.*, vol. 33, no. 8, pp. 1914–1928, Aug. 2012.
- [19] C.-G. Yan, R. C. Craddock, Y. He, and M. P. Milham, "Addressing head motion dependencies for small-world topologies in functional connectomics.," *Front. Hum. Neurosci.*, vol. 7, no. December, p. 910, Jan. 2013.