

Padrões de ativação cerebral em idosos saudáveis durante tarefa de memória verbal de reconhecimento

Brain activation patterns during verbal recognition memory in elderly healthy volunteers: a single-photon emission computerized tomography study

Geraldo Busatto Filho^a, Griselda EJ de Garrido^b, Carla G Cid^c, Cássio MC Bottino^d, Cândida HP de Camargo^c, Célia MD Cheda^a, Michael F Glabus^e, Ana Maria M Alvarez^f, Claudio C de Castro^b, Wilson Jacob Filho^g e Carlos A Buchpiguel^h

^aDepartamento de Psiquiatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM/USP). ^bInstituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas da FM/USP. ^cInstituto de Psiquiatria (IPq) do HC-FM/USP. ^dProjeto Terceira Idade (Proter) do IPq-HC-FM/USP. São Paulo, SP, Brasil. ^eDepartment of Medical Physics, University of Edinburgh, UK. ^fDepartamento de Fisiopatologia Experimental da FM/USP. ^gDepartamento de Clínica Médica da FM/USP. ^hServiço de Medicina Nuclear do Hospital do Coração, Associação Sanatório Sírio. São Paulo, SP, Brasil

Resumo **Introdução:** Estudos que utilizam as técnicas de PET, SPECT e ressonância magnética funcional têm permitido o mapeamento dos circuitos cerebrais ativadas durante diversas tarefas cognitivas. O campo da memória declarativa tem sido um dos mais intensamente estudados. No presente estudo, usa-se a técnica de mapeamento do fluxo sanguíneo cerebral regional (FSCr) por SPECT para investigar mudanças na atividade cerebral durante uma tarefa de memória episódica, em voluntários idosos saudáveis (n=15).

Métodos: Duas avaliações de SPECT foram realizadas na mesma sessão, usando a técnica de dose dividida do traçador 99 m-Tc-HMPAO. Medidas de FSCr foram registradas durante uma tarefa de reconhecimento de material verbal previamente aprendido e durante uma tarefa-controle mais simples. Comparações de FSCr foram realizadas automaticamente, utilizando o programa *Statistical Parametric Mapping* (SPM).

Resultados: Observou-se aumento de FSCr durante a tarefa de memória em várias regiões cerebrais, incluindo: córtex pré-frontal lateral bilateralmente (mais acentuadamente à esquerda); porções posteriores e mediais de córtex parieto-occipital à esquerda; hemisférios cerebelares bilateralmente; e córtex temporal lateral bilateralmente (p<0,001, não corrigido para comparações múltiplas). Foram observados também focos inesperados de diminuição de FSCr em cíngulo posterior direito, córtex orbitofrontal esquerdo, córtex temporal inferior direito e vermis cerebelar esquerdo (p<0,05, corrigido para comparações múltiplas).

Conclusão: Esses resultados sugerem que circuitos neuronais multifocais são engajados durante memória de reconhecimento e replicam localizações cerebrais descritas anteriormente na literatura. O uso desse protocolo em pacientes com transtornos neuropsiquiátricos poderá permitir a investigação de anormalidades cerebrais subjacentes aos déficits de memória presentes nesses transtornos.

Descritores SPECT. Memória. Fluxo sanguíneo regional. Cérebro. Envelhecimento. Cognição.

Abstract **Introduction:** PET, SPECT and functional magnetic resonance imaging studies have allowed the delineation of brain circuits activated during several types of cognitive tasks. The field of declarative memory has been one of the most extensively investigated. In the present study, the regional cerebral blood flow (rCBF) SPECT technique was used to investigate changes in brain activity during a verbal memory task in a group of elderly healthy volunteers (n=15).

Methods: Two SPECT acquisitions were performed in the same session, using the split-dose ^{99m}Tc-HMPAO technique. Measures of rCBF were taken during a recognition memory task and a simpler control task. Between-task comparisons were performed automatically using the Statistical Parametric Mapping (SPM) program.

Results: Increased rCBF during the memory task was seen in several brain regions, including: the lateral prefrontal cortex on both hemispheres (more intensely on the left side); posterior and medial portions of the left occipital and parietal cortices; the right and left cerebellar hemispheres; and the right and left lateral temporal cortex (p<0.001, uncorrected for multiple comparisons). Unexpected foci of decreased rCBF were seen in the right posterior cingulate cortex, left orbitofrontal cortex, right inferior temporal cortex and left cerebellar vermis (p<0.05, corrected for multiple comparisons).

Conclusion: These results suggest that multifocal neural circuits are engaged during recognition memory, and replicate locations seen in previous studies in the literature. The use of the protocols described here in patients with neuropsychiatric disorders may allow investigation of brain abnormalities underlying the memory deficits seen in these disorders.

Keywords Tomography, emission-computed, single-photon. Memory. Regional blood flow. Brain. Aging. Cognition.

Introdução

Nos últimos anos, técnicas de neuroimagem têm sido intensamente utilizadas na investigação do funcionamento cerebral humano. Os métodos mais tradicionais são a tomografia por emissão de pósitrons (*positron emission tomography* – PET) e a tomografia por emissão de fóton único (*single photon emission computed tomography* – SPECT).^{1,2} Ambas permitem a construção de mapas tridimensionais de atividade cerebral a partir da detecção de raios gama emitidos por traçadores marcados com isótopos radioativos administrados por via venosa ou inalatória. Os traçadores mais comuns mapeiam o fluxo sanguíneo cerebral regional (FSCr), que representa um índice fiel do funcionamento cerebral local.¹ Mais recentemente, desenvolveu-se também a técnica de ressonância magnética funcional (RMf) que permite a detecção de mudanças transitórias no grau de oxigenação da hemoglobina, a qual ocorre em paralelo às variações de FSCr causadas por aumentos ou diminuições na demanda de atividade cerebral local.³

As técnicas de PET, SPECT e RMf têm trazido grandes avanços ao campo da neuropsicologia. Imagens do funcionamento cerebral, obtidas em voluntários normais durante a execução de tarefas mentais, permitem a identificação das áreas envolvidas na realização dos mais diversos processos cognitivos, envolvendo atenção, memória, funções executivas e outros.⁴ Antes do desenvolvimento das técnicas de neuroimagem, o estudo das bases neurais de operações cognitivas tinha como recurso mais forte a investigação de déficits neuropsicológicos em pacientes com lesões cerebrais localizadas.⁵ Estudos de lesão são muito informativos, mas têm limitações importantes. Inferências sobre os mecanismos cerebrais subjacentes à perda de uma função cognitiva podem ser feitas exclusivamente em relação à área lesada, mas não a respeito das áreas adicionais que também são relevantes para o desempenho daquela função. Já com as técnicas de neuroimagem, pode-se avaliar o padrão de funcionamento do cérebro inteiro durante a realização de tarefas, mapeando circuitos cerebrais multifocais em vez de regiões isoladas. Além disso, imagens sequenciais podem ser adquiridas durante diferentes tarefas na mesma sessão experimental, permitindo o mapeamento das áreas cerebrais especificamente envolvidas nos diferentes estágios de uma determinada função mental. O desenho mais tradicional consiste na comparação dos padrões de FSCr durante uma tarefa de interesse (“tarefa de ativação”) e uma “tarefa-controle” mais simples que compartilha os componentes menos específicos presentes na tarefa de ativação.⁶ Assim, quando as imagens da tarefa de ativação e controle são contrastadas entre si, os aumentos de atividade regional verificados podem ser diretos

e unicamente atribuídos ao processo cognitivo de maior interesse, presente apenas na tarefa de ativação.

Um dos domínios cognitivos mais intensamente investigados em estudos de neuroimagem funcional tem sido o da memória declarativa para fatos e eventos. Déficits de memória declarativa são relevantes para diversos transtornos neuropsiquiátricos, como doença de Alzheimer⁷ e esquizofrenia.⁸ Os processos de memória envolvem diversos estágios, incluindo: formação de novos traços de memória (“*encoding*”); consolidação e estocagem desses traços em longo prazo; e processos de busca e acesso a traços previamente memorizados (recuperação ou “*retrieval*”).⁹ Estudos de neuroimagem, avaliando aspectos de “*encoding*”, usam tarefas em que o indivíduo memoriza estímulos novos (listas, pares de palavras ou objetos) contrastadas com tarefas-controle sem componentes de memorização como, por exemplo, a repetição de palavras. Nesses estudos, as áreas mais frequentemente ativadas em sujeitos normais têm sido o córtex pré-frontal, o cerebelo e as áreas temporais mediais.⁴ Os estudos de recuperação de memória usam tradicionalmente dois tipos de tarefas: evocação (“*recall*”) ou reconhecimento (“*recognition*”). Nas tarefas de evocação, os indivíduos tentam se lembrar de estímulos aprendidos anteriormente – palavras ou objetos – com a ajuda de dicas (“*cued recall*”) ou livremente (“*free recall*”). Já nas tarefas de reconhecimento, são apresentados estímulos aprendidos anteriormente misturados com estímulos novos, e o indivíduo decide quais foram apresentados antes. Tarefas de recuperação ativam mais comumente porções de córtex pré-frontal lateral, córtex temporal, córtex parieto-occipital medial, cíngulo anterior e cerebelo.⁴

Poucos estudos de neuroimagem funcional têm sido realizados durante tarefas de ativação cognitiva. Na presente investigação, utiliza-se SPECT para quantificar as mudanças de FSCr provocadas durante uma tarefa de memória declarativa que envolve o reconhecimento de material verbal previamente aprendido. O protocolo de ativação foi desenvolvido com o objetivo de investigar, numa etapa posterior, anormalidades de funcionamento cerebral associadas aos déficits de memória em pacientes com quadros demenciais. Neste artigo, reportam-se os resultados do estudo-piloto de validação do protocolo numa amostra de 15 voluntários idosos saudáveis. Os padrões de ativação cerebral foram avaliados utilizando o programa automático de análise denominado *Statistical Parametric Mapping* (SPM), que é considerado internacionalmente como padrão-ouro para a análise estatística de dados de pesquisa de PET e SPECT cerebral.¹⁰⁻¹² Com base na literatura anterior de neuroimagem, a hipótese deste estudo foi a de que a tarefa de reconhecimento verbal ativaria circuitos cerebrais, envolvendo córtex pré-frontal lateral, temporal e parieto-occipital medial, além de cíngulo anterior e cerebelo.

Métodos

Amostra

Um grupo de 15 voluntários sadios foi recrutado por contatos sociais da equipe e do “Grupo de Atendimento Multidisciplinar ao Idoso” (Gamia) do Ambulatório de Geriatria do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da USP (FM/USP). Foram usados os seguintes critérios de exclusão:

- idade inferior a 65 anos;
- escore inferior a 28 no miniexame do estado mental;¹³
- história pregressa ou atual de transtornos psiquiátricos maiores, incluindo transtornos psicóticos de humor, ansiosos, de abuso de álcool e/ou drogas e doenças sistêmicas e/ou neurológicas graves;
- antecedentes familiares de primeiro grau de síndromes demenciais e transtornos maiores de humor e psicóticos;
- história de tratamento com fármacos com ação sobre o sistema nervoso central.

O estudo recebeu aprovação pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da FM/USP (HC-FM/USP), pela Comissão de Ética do Hospital do Coração da Associação Sanatório Sírio, onde foram realizados os exames de SPECT, e pela Comissão Científica e Ética do Instituto do Coração (InCor) do HC-FM/USP, onde foram realizados exames de ressonância magnética estrutural. Ao aceitar participar do estudo, cada sujeito assinou um termo de consentimento padronizado.

Avaliação clínica

Os sujeitos foram avaliados pela entrevista estruturada “Cambridge Examination for Mental Disorders of the Elderly” (CAMDEX)¹⁴ e complementada por questionário para coleta de dados demográficos, médico-gerais e de antecedentes familiares. Todos os sujeitos foram submetidos também a uma bateria neuropsicológica detalhada, que foi aplicada por uma das autoras do artigo, incluindo: subitens da Escala de Wechsler de Inteligência (WAIS-R), avaliando vocabulário, dígitos diretos e inversos;¹⁵ teste “Fuld Object Memory Evaluation”,¹⁶ testes de Trilhas A e B;¹⁷ teste de fluência verbal;⁶ teste de desenho do relógio;¹⁸ e subitens do “Cambridge Mental Disorders Cognitive Examination” (CAMCOG),¹⁴ incluindo realização de gestos sob comando, mímica de manipulação de objetos, testes de capacidade de abstração, percepção e cálculo. Todos os sujeitos tiveram escores dentro da normalidade para a faixa etária em cada teste aplicado.

Todos as pessoas participantes do estudo foram submetidas ao exame de ressonância magnética estrutural, utilizando equipamento Philips Gyroscan S15-ACS, de 1,5 Tesla (Philips Medical Equipment). As imagens foram inspecionadas por um radiologista que permaneceu cego para a identidade de todos os sujeitos. Foram observados sinais inespecíficos compatíveis com o envelhecimento cerebral normal, incluindo aumento de sulcos corticais, alargamento de ventrículos e hiperintensidades de sinal em T2 na substância branca periventricular e subcortical. Nenhum indivíduo apresentou sinais de outras lesões orgânicas cerebrais que demandassem a exclusão dos mesmos da amostra.

Tarefa de ativação cognitiva para os exames de SPECT

A tarefa de memória de reconhecimento teve seu material gravado por locutor profissional em estúdio especializado e arquivado num *compact-disc* (CD), utilizado para apresentação durante a sessão experimental. O primeiro passo da tarefa consistiu na apresentação de uma lista com 12 palavras comuns da língua portuguesa (1 palavra a cada 2 segundos) por fone de ouvido. Ao final dessa apresentação, o sujeito era instruído a evocar livremente o maior número possível de palavras. A lista era apresentada até que o sujeito rememorasse 9 palavras, ou até que fossem completadas 5 apresentações. Terminada essa fase de aprendizagem, aguardava-se o período de 1,5 minuto, antes que se iniciasse a fase de memória de reconhecimento (a “tarefa de ativação”). Nessa tarefa de reconhecimento, o indivíduo escutava uma lista de 60 palavras, da qual constavam as 12 da lista inicial, apresentadas 2 vezes (24 palavras no total) e misturadas aleatoriamente com 36 novas palavras não apresentadas antes. Essa lista de 60 palavras era apresentada no ritmo de 1 palavra a cada 5 segundos (5 minutos no total), e, durante a apresentação da mesma, o sujeito segurava um apontador a laser, mantendo o dedo polegar sobre o botão de disparo. O sujeito era instruído a apertar esse botão sempre que reconhecesse uma das palavras aprendidas anteriormente. Já na tarefa-controle, o paciente escutava pelo fone de ouvido uma lista contendo as palavras “sim” por 24 vezes e as palavras “não” por 36 vezes, perfazendo um total de 60 estímulos (1 a cada 5 segundos). Durante essa apresentação, o sujeito segurava o apontador a laser e era instruído a disparar somente quando escutasse a palavra “sim”. As tarefas de ativação e controle foram construídas utilizando os princípios de “subtração cognitiva”,⁶ sendo semelhantes na quantidade de material auditivo apresentado e no número de vezes em que o botão de resposta deveria ser apertado, mas diferindo pela existência de um componente mnemônico verbal somente na tarefa de ativação. Esse desenho permitiu que, na comparação das imagens relativas a cada uma das tarefas, fosse possível atribuir eventuais diferenças de FSCr ao componente de memória, presente exclusivamente na tarefa de ativação.

Aquisição de imagens de SPECT cerebral

As medidas de FSCr foram obtidas no Serviço de Medicina Nuclear do Hospital do Coração – Associação Sanatório Sírio, após a administração endovenosa do traçador hexametil-propileno amino oxime (HMPAO – Ceretec[®], Amersham International plc), marcado com tecnécio-99 m. Após injeção, o 99 m-Tc-HMPAO cruza rapidamente a barreira hemato-liquórica, em proporção direta ao FSCr.¹⁹ Sua rápida transformação em um metabólito hidrofílico causa a retenção intracelular do composto por diversas horas.²⁰ Obtém-se, assim, um quadro praticamente estável de emissão de raios gama, que corresponde ao padrão de FSCr vigente durante a injeção de 99 m-Tc-HMPAO. É esse o padrão de FSCr que é registrado durante a fase de aquisição das imagens de SPECT, mesmo que essa aquisição seja realizada vários minutos mais tarde do que o momento da injeção. Neste estudo, foi utilizado um protocolo de “dose dividida” (“split-dose”) do 99 m-Tc-HMPAO, permitindo a realização de dois exames de FSCr consecutivos com SPECT dentro da mesma sessão, cada qual após a

administração da metade da dose do traçador (15 mCi por injeção).²¹ Após deitar o sujeito numa maca, era inserida uma cânula endovenosa para posterior administração do traçador radioativo. Em seguida, os fones de ouvido e o apontador a laser eram posicionados, além de uma venda ser colocada sobre os olhos do sujeito. A tarefa controle (“SIM” e “NÃO”) era iniciada e, ao fim de um minuto, a primeira dose do traçador era injetada. Após o término da tarefa, o sujeito era levado para a sala do equipamento de SPECT para a aquisição da primeira seqüência de imagens. De volta à sala de enfermagem, iniciava-se a tarefa de ativação de memória e, após o primeiro minuto da fase de reconhecimento de palavras, a segunda dose do traçador era administrada, utilizando a mesma cânula venosa. Após o término dessa tarefa, a aquisição de uma nova seqüência de imagens de SPECT era realizada. As imagens de SPECT foram obtidas utilizando o equipamento de dois detectores GE-Optima (GE Medical Systems) com colimadores de alta resolução. Uma matriz de 64 por 64 pixels foi utilizada (pixel de 4,5 mm x 4,5 mm) com 128 projeções (de 10 segundos cada) coletadas ao longo de uma rotação de 360° (tempo total de 22 minutos). O procedimento total, incluindo a realização das tarefas e as duas aquisições de imagens de SPECT, teve a duração de aproximadamente 75 minutos.

As 128 projeções foram combinadas num volume tridimensional e reconstruídas utilizando protocolo de retroprojeção filtrada (“filtered back-projection”), com pré-filtragem por meio de filtros Butterworth (“cut-off frequency” = 0,59, número de ordem = 10). Compensação para atenuação de fótons foi realizada utilizando o algoritmo de Chang e pressupondo um coeficiente uniforme de atenuação igual a 0,12 cm⁻¹. As imagens foram reorientadas e fatiadas em cortes transversais paralelos, à medida que unia as comissuras anterior e posterior, assim como em cortes coronais e sagitais perpendiculares a esse plano; todos possuíam espessura de 1 pixel.

Processamento de imagens de SPECT e análise estatística “voxel-a-voxel”

Os cortes transversais de SPECT de todos os sujeitos foram transferidos para uma estação de trabalho SUN UltraSparc 1, no centro de medicina nuclear do HC-FM/USP, e convertidos para o formato *Analyze*, que foi utilizado para a leitura de dados no programa SPM (versão 1999), que funciona sobre o programa MATLAB versão 5.3.

A primeira etapa do processamento das imagens com o SPM consistiu no alinhamento do par de imagens de cada sujeito (tarefa-controle e tarefa de ativação), necessário em vista da dificuldade em se garantir o mesmo posicionamento da cabeça do sujeito nas duas aquisições de imagens de SPECT. O passo seguinte consistiu numa transformação “elástica” das 2 seqüências de imagens de todos os sujeitos, a fim de realizar uma normalização das mesmas para um espaço anatômico padronizado, baseado no *Atlas Estereotáxico* de Talairach & Tornoux.²² Após esse processamento, a dimensão final do voxel – unidade básica tridimensional das imagens – passou a ser igual a 2x2x2 mm. Após a normalização espacial, cada voxel do volume cerebral passou a ter um valor de coordenadas fixo nos eixos x,y,z, dentro do *Atlas Estereotáxico*, correspondendo à mesma localiza-

ção cerebral em ambas as seqüências de imagens de todos os sujeitos. Com isso, a captação radioativa em cada um dos milhares de voxels passa a ser vista como uma variável independente, que pode ser comparada estatisticamente entre os grupos.

Antes da comparação estatística, duas etapas adicionais de processamento foram executadas utilizando o programa SPM. Sabe-se que o padrão de FSCr, obtido com o 99 m-Tc-HMPAO, permanece estável por várias horas após a injeção.²⁰ Dessa forma, com a técnica de “dose dividida”, o padrão de captação do traçador no segundo exame de SPECT representa o FSCr correspondente à execução da tarefa de memória superposto ao padrão anteriormente obtido, durante a execução da tarefa-controle, visto que não há tempo suficiente para a eliminação cerebral da primeira dose do traçador.²¹ Por esse motivo, após a normalização espacial dos pares de imagens, foi realizada neste estudo uma subtração voxel-a-voxel dos padrões de captação da tarefa-controle nas imagens de ativação do segundo exame. Nessa subtração, foi feita correção para decaimento radioativo da primeira injeção do traçador. Em seguida, os pares de imagens (tarefa-controle e tarefa de ativação “subtraída”) foram suavizadas (“Gaussian smoothing”) com um kernel isotrópico de 12 mm. Esse procedimento de suavização tem o objetivo de eliminar ruídos das imagens, além de amenizar pequenas variações anatômicas interindividuais.

Após a subtração e a suavização das imagens, diferenças estatisticamente significativas de FSCr, entre a imagem da tarefa de ativação “subtraída” e a tarefa-controle, puderam ser investigadas para cada voxel do volume cerebral, usando *t* testes de Student (pareados). Nessa etapa da análise, variações interindividuais no fluxo sanguíneo cerebral global que poderiam confundir os resultados foram levadas em conta pela transformação escalar dos valores da captação radioativa de todos os sujeitos (proportional scaling). O número total de voxels comparados entre os grupos foi de 211.554. Os valores do teste estatístico resultantes para cada voxel foram transformados em escores Z, e os voxels para os quais se identificou significância acima de um limiar de Z>3,09 (correspondendo a p<0,001, não corrigido para comparações múltiplas) foram mapeados sobre o espaço anatômico padronizado de Talairach & Tornoux.²² Achados de aumento de FSCr, durante a tarefa de ativação envolvendo regiões cerebrais incluídas na hipótese a priori (córtex pré-frontal lateral, córtex parieto-occipital medial, córtex temporal, cíngulo anterior e cerebelo), foram considerados significativos no limiar estatístico de Z>3,09 (p<0,001) não corrigido para comparações múltiplas. Quanto maior o valor de Z obtido numa dada região, maior a significância estatística da diferença entre as duas tarefas. Outros resultados não previstos foram valorizados somente se fossem significativos após correção para comparações múltiplas (no nível de p<0,05), baseada na teoria de campos Gaussianos randômicos.¹¹ Dentro do programa SPM, esse tipo de correção leva em conta não só o número de voxels testados no volume cerebral total, mas também a extensão dos focos de significância estatística obtidos (dada pelo número de voxels contíguos dentro de um dado foco).¹¹

Resultados

Na fase de aprendizado da lista inicial, todos os sujeitos aprenderam o número mínimo de 9 palavras. O número médio de tentativas foi de 3,67 (desvio-padrão (DP) = 0,9; mínimo = 2, máximo = 5). Na tarefa de reconhecimento de palavras, o índice médio de acertos foi de 87,5% (DP = 12,4; mínimo = 58,3%, máximo = 100%).

A Figura A mostra os focos de aumento significativo de FSCr durante a tarefa de memória de reconhecimento, em comparação com a tarefa-controle. Todos os voxels mostrados na figura tiveram seu valor de escore Z maior que 3,09 (correspondendo a $p < 0,001$, não corrigido para comparações múltiplas). Observou-se uma área extensa de aumento de FSCr durante a tarefa de ativação no córtex pré-frontal lateral esquerdo, correspondendo à área de Brodmann (AB) de número 10 (Z máximo = 4,37; incluindo 367 voxels contíguos, todos com $Z > 3,09$). Dois outros pequenos focos de ativação durante a tarefa de memória foram observados em porções mais superiores de córtex pré-frontal lateral, correspondendo, respectivamente, à AB 6 em hemisfério esquerdo (Z máx. = 3,93; 83 voxels contíguos) e à mesma área de Brodmann (AB 6) em hemisfério direito (Z máx. = 3,49; 37 voxels).

Houve outras áreas previstas na hipótese que apresentaram aumento significativo de FSCr durante a tarefa de memória, incluindo: hemisférios cerebelares direitos (Z máx. = 3,51; 151 voxels) e esquerdo (Z máx. = 3,61; 41 voxels); pequenos focos

em córtex occipital e parietal póstero-medial à esquerda, abrangendo o cúneo (AB 18, Z máx. = 3,64; 31 voxels), o pré-cúneo (AB 19, Z máx. = 3,54; 29 voxels) e o giro lingual (AB 17, Z máx. = 3,66; 22 voxels); e dois focos em córtex temporal lateral envolvendo o giro temporal superior esquerdo (AB 22, Z máx. = 4,09; 53 voxels) e as proximidades do giro temporal inferior direito (AB 37, Z máx. = 3,95; 88 voxels). Foram observados outros focos de ativação não previstos na hipótese inicial, localizados em córtex somatosensorial superior (AB 4), córtex parietal superior direito (AB 7 e AB 39/40), córtex occipital infero-lateral direito (AB 18), córtex pré-motor esquerdo (AB 6) e córtex pré-frontal medial esquerdo (AB 6) (Figura A), mas nenhum destes permaneceu significativo após correção para comparações múltiplas. Por fim, foram observadas áreas de diminuição significativa de FSCr durante a tarefa de memória (Figura B), incluindo: foco amplo em cíngulo posterior direito (AB 23) estendendo-se ao córtex parietal antero-medial direito (Z máx. = 4,79; 926 voxels); foco em córtex orbitofrontal infero-medial esquerdo (Z máx. = 4,51; 316 voxels); foco nas proximidades do vérmis cerebelar à esquerda (Z máx. = 4,61; 243 voxels); e foco em giro temporal inferior direito (AB 20, Z máx. = 4,57; 180 voxels) estendendo-se medialmente até as proximidades do hipocampo e giro parahipocampal no mesmo hemisfério. Todos esses focos de diminuição de FSCr atingiram significância estatística após correção para comparações múltiplas ($p < 0,05$).

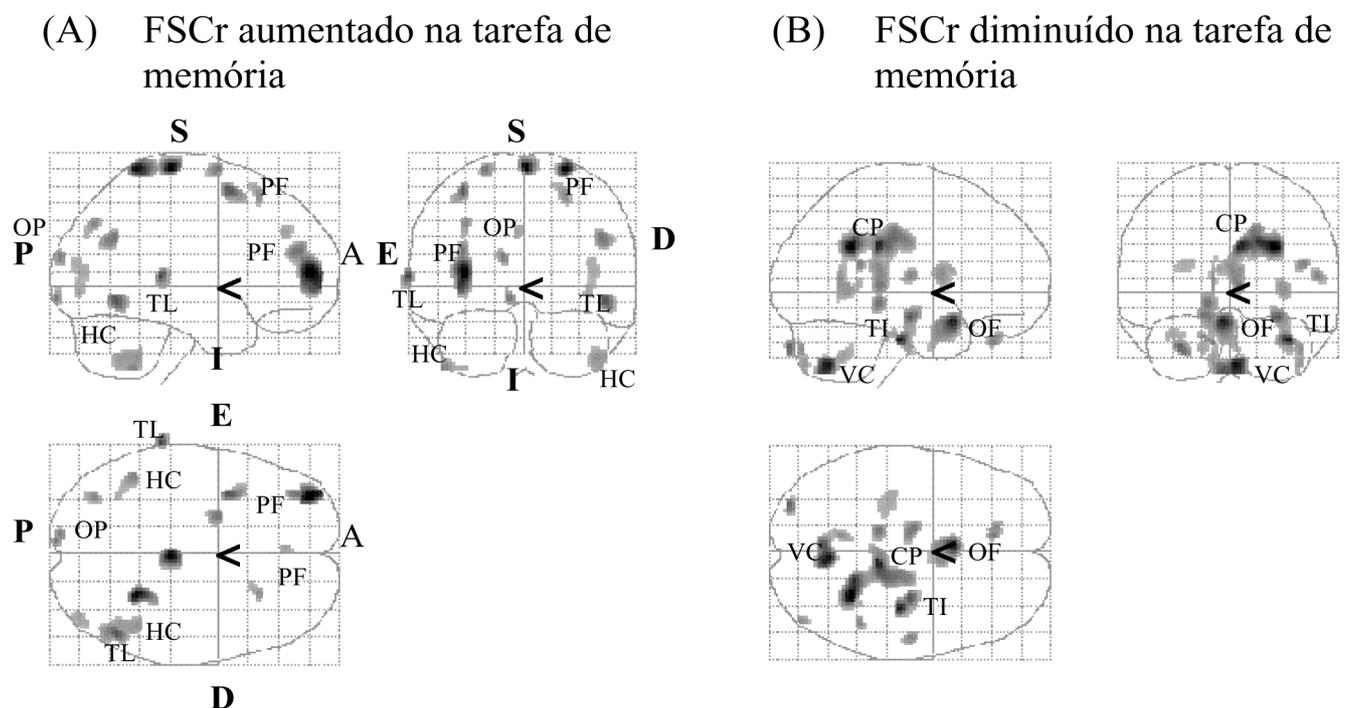


Figura - Mapas paramétricos estatísticos mostrando focos de diferença significativa de fluxo sanguíneo cerebral regional (FSCr) entre a tarefa de memória e a tarefa-controle, no limiar estatístico de $Z=3,09$ (correspondendo a $p < 0,001$, não corrigido para comparações múltiplas).

Na figura A, são observados diversos focos de aumento de FSCr durante a tarefa de memória, envolvendo regiões incluídas na hipótese a priori (indicadas pelas letras): córtex pré-frontal lateral bilateral (PF), córtex occipital e parietal póstero-medial à esquerda (OP), córtex temporal lateral bilateralmente (TL) e hemisférios cerebelares bilateralmente (HC). São também observados na Figura A outros focos de aumento de FSCr não previstos na hipótese inicial, os mais robustos dos quais em porções superiores de córtex somatosensorial e parietal à direita, mas nenhum destes permaneceu significativo após correção para comparações múltiplas. Na figura B, focos inesperados de diminuição de FSCr durante a tarefa de memória são mostrados em cíngulo posterior direito (CP), córtex orbitofrontal (OF), córtex temporal inferior direito (TI) e vérmis cerebelar esquerdo (VC). Todos esses focos de diminuição de FSCr resistiram à correção para comparações múltiplas ($p < 0,05$). O volume total de voxels testados foi igual a 211.554. Outras abreviaturas: A: anterior; P: posterior; E: esquerdo; D: direito; S: superior; I: inferior.

Discussão

Usando a técnica de SPECT, este estudo avaliou padrões de ativação cerebral em voluntários idosos durante uma tarefa de memória, envolvendo o reconhecimento de material verbal previamente aprendido. Foram observadas mudanças de FSCr em diversas regiões cerebrais, confirmando a noção de que circuitos neuronais multifocais são engajados para a realização adequada desse tipo de operação mental.²³

O foco mais intenso de ativação durante a tarefa de memória foi localizado em córtex pré-frontal lateral esquerdo. A ativação de córtex pré-frontal tem sido o achado mais freqüente em estudos de neuroimagem durante tarefas de evocação de memória em adultos jovens.⁴ Nesses estudos, ativações em córtex pré-frontal têm sido freqüentemente atribuídas à manutenção do estado mental voltado para a recuperação de informações – *retrieval mode* –, independentemente do grau de acurácia das respostas do sujeito na tarefa.²⁴ Alguns autores têm proposto que, em adultos jovens, tarefas de evocação envolvem lateralização dos padrões de ativação para o córtex pré-frontal direito.²⁵ No entanto, estudos que utilizam tarefas de reconhecimento semelhantes as deste estudo têm demonstrado ativação de córtex pré-frontal esquerdo.^{36,37} Da mesma forma, tarefas de memória semântica, mais relacionadas ao conhecimento genérico sobre palavras, conceitos e significados, apresentam também tendência à lateralização para o córtex pré-frontal esquerdo.²⁵ Neste estudo, a ativação pré-frontal foi bilateral e, consideravelmente, mais intensa em hemisfério esquerdo. Esse padrão de ativação em hemisfério esquerdo pode estar relacionado ao uso de estratégias semânticas pelos sujeitos na tentativa de auxiliar a rememoração do material verbal aprendido antes.^{4,36} Uma outra possibilidade é a de que o padrão bilateral de ativação pré-frontal deveu-se à seleção de sujeitos idosos para este estudo.

Em outros estudos de PET, em voluntários idosos durante tarefas de recuperação, têm sido observados padrões de ativação do córtex pré-frontal menos lateralizados para o hemisfério direito em comparação com adultos jovens.²⁸ Os aumentos de atividade em córtex pré-frontal esquerdo durante tarefas de rememoração em idosos poderiam representar um fenômeno compensatório relacionado ao esforço de rememoração, que é sabidamente mais intenso do que em adultos jovens.⁴

A ativação de porções posteriores e mediais de córtex parieto-occipital (abrangendo cúneo e pré-cúneo), também vistas no presente estudo, tem sido reportada com considerável consistência em estudos de PET e RMf durante tarefas de memória.^{26,29} É possível que essas áreas cerebrais, comumente implicadas na formação de imagens mentais,³⁰ sejam ativadas em virtude do uso de estratégias de imagieria pelos sujeitos, a fim de facilitar o processo de evocação de informações previamente aprendidas.³¹ No entanto, alguns estudos têm demonstrado que a ativação do pré-cúneo é igualmente intensa se as palavras evocadas estão associadas aos graus maiores ou menores de imageabilidade.³² Outros estudos têm demonstrado que o envolvimento do pré-cúneo é proporcional ao número de acertos em tarefas de memória, sugerindo que a atividade nessa região cerebral está relacionada especificamente ao sucesso na evocação de memórias, independentemente de aspectos ligados à imagieria.³³ Essa últi-

ma possibilidade é compatível com os resultados deste estudo, visto que a maioria dos voluntários teve um índice elevado de acertos na tarefa de reconhecimento.

Observou-se também ativação bilateral dos hemisférios cerebelares durante a tarefa de memória. Contradizendo a visão clássica de que o cerebelo teria atribuições exclusivamente motoras, diversos estudos de lesão ou de neuroimagem funcional em voluntários normais têm demonstrado a relevância do cerebelo para execução de tarefas de memória, linguagem, atenção e planejamento.³⁴ Em vários estudos de neuroimagem, observa-se que ativações cerebelares tendem a se atenuar com a prática da realização da tarefa cognitiva, sugerindo um papel menos intenso do cerebelo à medida que o desempenho se automatiza.³⁵ No que diz respeito a comportamentos motores, atribui-se ao cerebelo o papel de incorporar informações sensoriais do mundo externo e proprioceptivas internas que facilitam processos de seleção e controle da ação motora.³⁶ De forma similar, tem-se sugerido que o cerebelo poderia contribuir em tarefas cognitivas pela integração de informações do mundo externo e por motivações internas, incorporando ambas para o aprendizado de tarefas cognitivas dentro de um novo contexto, até que as mesmas sejam automatizadas.³⁷

Em estudos de lesão em humanos, danos em porções de córtex temporal medial, incluindo o hipocampo e o giro parahipocampal, são os mais comumente implicados no surgimento de síndromes amnésticas,³⁸ sendo que lesões em hemisfério esquerdo levam às perdas mais significativas para material verbal.³⁹ Surpreendentemente, no entanto, estudos de PET e SPECT, na última década, foram poucas vezes capazes de demonstrar ativação do córtex temporal medial durante tarefas de memória.^{21,40} No presente estudo, observam-se focos de ativação de córtex temporal durante a tarefa de memória, mas os mesmos estiveram localizados em porções laterais desse lobo cerebral. Além disso, um foco inesperado de diminuição de FSCr foi observado no giro temporal inferior direito durante a tarefa de memória, estendendo-se medialmente até as proximidades do hipocampo. É possível que as limitações de resolução espacial da técnica de SPECT utilizada neste estudo tenham impedido uma distinção mais clara entre porções mediais e laterais do córtex temporal. É interessante notar que estudos mais recentes, usando RMf ou equipamentos de PET de maior resolução espacial, têm conseguido demonstrar de forma muito mais consistente a ativação de porções do córtex temporal medial durante tarefas de memória.⁴ Esses estudos têm também sugerido que porções distintas do córtex temporal desempenhem papéis diferentes durante operações mnemônicas,⁴ o que poderia ajudar a explicar os achados variáveis em porções laterais e mediais do córtex temporal direito e esquerdo neste estudo.

Por fim, foram inesperados os achados de diminuição significativa de FSCr em cíngulo posterior e córtex orbitofrontal inferomedial durante a tarefa de memória. Ativações dessas regiões têm sido demonstradas em estudos de provocação de medo e ansiedade.⁴¹⁻⁴³ O engajamento dessas regiões neste estudo poderia estar relacionado às diferenças nos aspectos de ansiedade e expectativa geradas durante a realização das duas tarefas e da administração venosa das respectivas doses do traçador. É possível que a etapa

da tarefa-controle tenha gerado um grau maior de ansiedade e apreensão nos sujeitos do estudo, visto que a mesma foi sempre realizada antes da tarefa de memória. Uma alternativa em estudos futuros seria variar aleatoriamente a ordem em que as duas tarefas são realizadas na amostra de sujeitos estudada.

Uma outra limitação potencial da metodologia empregada diz respeito aos intervalos de tempo entre cada etapa do experimento. Apesar de a duração das tarefas neuropsicológicas e de as aquisições de imagens terem se mantido sempre constantes, não foi possível evitar variações interindividuais pela ordem de minutos no intervalo entre a injeção do traçador e o início da respectiva aquisição de dados de SPECT. Isto se deu devido às diferenças entre os sujeitos no grau de destreza para a locomoção entre as salas e na compreensão das instruções durante a fase de posicionamento da cabeça no campo de visão dos detectores do equipamento de SPECT. No entanto, apesar de não se ter controlado explicitamente essas variações de tempo neste experimento, é pouco provável que as mesmas pudessem influenciar os resultados estatísticos do mesmo. Sabe-se que a janela de tempo para a consolidação inicial do padrão de captação cerebral dos traçadores de FSCr tem a duração de 2 a 3 minutos,⁴⁴ ainda que estudos de validação do 99 m-Tc-HMPAO em voluntários normais reportem um pequeno grau de refluxo do traçador para fora do cérebro durante os primeiros 10 minutos.⁴⁵ No entanto, após esses 10 minutos iniciais, a distribuição cerebral do fármaco permanece bastante estável por várias horas, com perdas estimadas de apenas 0,4% da atividade a cada hora.⁴⁵ O período dentro do qual esses exames foram realizados após a injeção do 99 m-Tc-HMPAO esteve sempre dentro dessa janela de estabilidade da distribuição cerebral, tornando, portanto, pouco provável que variações da ordem de minutos entre os exames dos diferentes sujeitos pudessem confundir os resultados. Além disso, a transformação escalar dos valores de captação radioativa de cada voxel, que se realizou em proporção à captação radioativa global do cérebro, foi equivalente ao processo tradicional de obtenção de índices "semiquantitativos" de FSCr com SPECT², no qual a captação radioativa numa dada região de interesse é "normalizada" pela divisão por um valor de referência (por exemplo, a média de captação radioativa em todas as regiões cerebrais daquele sujeito). Como o ritmo de decaimento da captação do 99 m-Tc-HMPAO na fase de estabilidade pós-injeção é constante para qualquer região cerebral, variações interindividuais no tempo entre injeção e aquisição de dados afetariam igualmente tanto o valor da captação radioativa em cada voxel individual (numerador) quanto o valor médio do cérebro como um todo (denominador). Não haveria, portanto, nenhuma consequência sobre a razão entre esses dois valores (o índice semiquantitativo de FSCr).

Há outras limitações da metodologia empregada neste estudo que devem ser mencionadas. Dada a janela de tempo para a retenção inicial do padrão de captação cerebral do 99 m-Tc-HMPAO de 2 a 3 minutos,⁴⁴ as imagens de SPECT representam a somatória de tudo o que ocorreu durante o desempenho da tarefa nesse

período que é bastante longo. Além disso, o padrão fixo de captação dos traçadores de SPECT permite a realização de no máximo duas aquisições de imagens na mesma sessão experimental e, ainda assim, demandando o procedimento de subtração entre os pares de imagens para que as mesmas possam ser contrastadas entre si. A discriminação visual das diferenças nos padrões de ativação cerebral entre a tarefa de ativação e a tarefa-controle nessas imagens de SPECT é muito pouco nítida. Isto faz com que essa técnica seja pouco informativa para a análise de casos individuais, servindo mais para a comparação estatística de médias de grupos estudados. Diferentemente, a técnica de RMf permite que um número ilimitado de imagens sequenciais sejam adquiridas na mesma sessão, graças à completa não invasividade do método e à sua alta resolução temporal (da ordem de poucos segundos).⁴⁶ As várias repetições das tarefas durante uma mesma sessão de RMf proporcionam poder estatístico suficiente para a detecção de regiões de ativação significativa num único indivíduo, além de permitir a análise tradicional de médias de grupos. Essas características, aliadas a uma superior resolução espacial, à ausência de uso de materiais radioativos e à crescente disponibilidade, fazem da RMf a técnica de eleição atualmente aplicada para estudos de neuroimagem durante tarefas de ativação.

No entanto, as características da técnica de SPECT podem ser vantajosas em algumas situações específicas. A retenção dos traçadores de FSCr por longos períodos permite que a coleta de imagens de SPECT seja feita sempre em uma etapa posterior à da tarefa de estimulação.⁴⁷ Com isso, é possível aclimatar o sujeito ao ambiente físico e ao contexto de aquisição dos dados de SPECT depois de realizada a tarefa de estimulação. Essa propriedade pode ser atraente nos casos de alguns pacientes com transtornos neuropsiquiátricos que têm dificuldades de desempenhar as tarefas propostas e tolerar os desconfortos da restrição de espaço físico e dos ruídos sonoros dos equipamentos atuais de RM. No caso do protocolo deste estudo, desenvolvido para posterior uso em quadros demenciais, essas características da técnica de SPECT podem ser vistas como vantajosas. Além disso, a incorporação do método SPM à metodologia do presente estudo proporcionou automatização completa da análise quantitativa e estatística dos dados de SPECT. O SPM tem mais sensibilidade para detectar achados significativos em comparação com métodos tradicionais de quantificação de FSCr por meio da delimitação manual de regiões de interesse.⁴⁸ Ao usar esse método, pôde-se, no presente estudo, identificar vários focos cerebrais de aumento de FSCr durante a tarefa de memória, muitos dos quais replicando achados prévios na literatura. Esses resultados sugerem que o presente método de SPECT poderá ser útil em estudos futuros, investigando alterações cerebrais subjacentes aos déficits de memória em transtornos neuropsiquiátricos.

Agradecimento

A Keila Nunes pelo auxílio na análise de dados deste estudo.

Referências

1. Raichle ME. Circulatory and metabolic correlates of brain function in normal humans. In: Plum F, editor. *The nervous system: higher functions of the brain*. Bethesda: American Physiological Society; 1987. p. 643-74.
2. Busatto GF. SPET blood flow studies and the functional anatomy of psychiatric disorders. In: Kerwin RW, editor. *Neurobiology and Psychiatry*. V. 3. Cambridge: Cambridge University Press; 1995. p. 81-109.

3. Ogawa S, Lee TM, Kay AR, Tank DW. Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87:9868-72.
4. Cabeza R, Nyberg L. *Imaging Cognition II: An Empirical Review of 275 PET and fMRI Studies*. *J Cogni Neurosci* 2000; 12:1-47.
5. Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1957;20:11-21.
6. Frith CD, Friston KJ, Liddle PF, Frackowiak RS. A PET study of word finding. *Neuropsychol* 1991;29:1137-48.
7. Butters N, Salmon DP, Heindel W, Granholm E. Episodic, semantic and procedural memory: some comparisons of Alzheimer and Huntington disease patients. In: Terry RD, editor. *Aging and the Brain*. New York: Raven Press New York; 1988.
8. Tamlyn D, McKenna PJ, Mortimer AM, Lund CE, Hammond S, Baddeley AD. Memory impairment in schizophrenia: its extent, affiliations and neuropsychological character. *Psychol Med* 1992;22:101-15.
9. Tulving E. *Elements of episodic memory*. New York: Oxford University Press; 1983.
10. Friston KJ, Holmes A, Poline JB, Price CJ, Frith CD. Detecting activations in PET and fMRI: levels of inference and power. *Neuroimage* 1996;4:223-35.
11. Friston KJ, Frith CD, Liddle PF, Frackowiak RS. Comparing functional (PET) images: the assessment of significant change. *J Cereb Blood Flow Metab* 1991;11:690-9.
12. Busatto GF, Zamignani DR, Buchpiguel CA, Garrido GEJ, Glabus MF, Rocha ET, et al. A voxel-based investigation of regional cerebral blood flow abnormalities in obsessive-compulsive disorder using single photon emission computed tomography (SPECT). *Psychiatry Res* 2000;99(1):15-27.
13. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. 'Mini-mental state'. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiat Res* 1975;12:189-98.
14. Roth M, Tym E, Mountjoy CQ, Huppert FA, Hendrie H, Verma S, et al. CAMDEX - a standardized instrument for the diagnosis of mental disorder in the elderly with special reference to the early detection of dementia. *Br J Psychiatry* 1986;149:698-709.
15. Wechsler D. *Wechsler Adult Intelligence Scale-Revised*. New York: Psychological Corporation; 1981.
16. Masur DM, Sliwinski M, Lipton RB, Blau AD, Crystal HA. Neuropsychological prediction of dementia and the absence of dementia in healthy elderly persons. *Neurology* 1994;44:1427-32.
17. Reitan RM. Validity of the trail making test as an indicator of organic brain damage. *Percept Mot Skills* 1958;8:271-6.
18. Battersby WS, Bender MB, Pollack M, Kahn RL. Unilateral "spatial agnosia" ("inattention") in patients with cortical lesions. *Brain* 1956;79:68-93.
19. Ell PJ, Cullum I, Costa DC. Regional cerebral blood flow mapping with a new Tc-99m-labelled compound. *Lancet* 1985;ii:50-1.
20. Neirinckx RD, Canning LR, Piper IM, Nowotnik DP, Pickett RD, Holmes RA, et al. Technetium-99m d,l-HM-PAO: a new radiopharmaceutical for SPECT imaging of regional cerebral blood perfusion. *J Nucl Med* 1987;28:191-202.
21. Busatto GF, Costa DC, Ell PJ, Pilowsky LS, David AS, Kerwin RW. Regional cerebral blood flow (rCBF) in schizophrenia during verbal memory activation: a 99mTc-HMPAO single photon emission tomography (SPET) study. *Psychol Med* 1994;24:463-72.
22. Talairach J, Tournoux P. *A Co-Planar Stereotaxic Atlas of a Human Brain*. Stuttgart: Thieme; 1988.
23. Mesulam MM. Large-scale neurocognitive networks and distributed processing for attention, language, and memory. *Ann Neurol* 1990;28:597-613.
24. Nyberg L, Tulving E, Habib R, Nilsson LG, Kapur S, Houle S, et al. Functional brain maps of retrieval mode and recovery of episodic information. *Neuroreport* 1995;7:249-52.
25. Nyberg L, Cabeza R, Tulving E. PET studies of encoding and retrieval: the HERA model. *Psychonomic Bull Rev* 1995;3:135-48.
26. Busatto G, Howard RJ, Ha Y, Brammer M, Wright I, Woodruff PW, et al. A functional magnetic resonance imaging study of episodic memory. *Neuroreport* 1997;8:2671-5.
27. Nolde SF, Johnson MK, D'Esposito M. Left prefrontal activation during episodic remembering: An event-related fMRI study. *Neuroreport* 1998;9:3509-14.
28. Madden DJ, Turkington TG, Provenzale JM, Denny LL, Hawk TC, Gottlob LR, et al. Adult age differences in functional neuroanatomy of verbal-recognition memory. *Hum Brain Mapp* 1999;7:115-35.
29. Fletcher PC, Frith CD, Baker SC, Shallice T, Frackowiak RS, Dolan RJ. The mind's eye-precuneus activation in memory-related imagery. *Neuroimage* 1995;2:195-200.
30. Kosslyn SM, Thompson WL, Kim IJ, Alpert NM. Topographical representations of mental images in primary visual cortex. *Nature* 1995;378:496-8.
31. Fletcher PC, Shallice T, Frith CD, Frackowiak RSJ, Dolan RJ. Brain activity during memory retrieval: The influence of imagery and semantic cuing. *Brain* 1996; 119:1587-96.
32. Krause BJ, Schmidt D, Mottaghy FM, Taylor J, Halsband U, Herzog H, et al. Episodic retrieval activates the precuneus irrespective of the imagery content of word pair associates: A PET study. *Brain* 1999;122:225-63.
33. Kapur S, Craik FI, Jones C, Brown GM, Houle S, Tulving E. Functional role of the prefrontal cortex in retrieval of memories: a PET study. *Neuroreport* 1995;6:1880-4.
34. Schmahmann JD, Sherman JC. The cerebellar cognitive affective syndrome. *Brain* 1998;121:561-79.
35. Raichle ME, Fiez JA, Videen TO, MacLeod AM, Pardo JV, Fox PT, et al. Practice-related changes in human brain functional anatomy during nonmotor learning. *Cereb Cortex* 1994;4:8-26.
36. Dolan RJ. A cognitive affective role for the cerebellum. *Brain* 1998;121:545-6.
37. Thach WT. On the specific role of the cerebellum in motor learning and cognition: clues from PET activation and lesion studies in man. *Behav Brain Sci* 1996;19:411-31.
38. Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following abilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci* 1986;6:2950-67.
39. Milner B. Interhemispheric differences in the localization of psychological processes in man. *Br Med Bull* 1971;27:272-7.
40. Squire LR, Ojemann JG, Miezin FM, Petersen SE, Videen TO, Raichle ME. Activation of the hippocampus in normal humans: a functional anatomical study of memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:1837-41.
41. Fredrikson M, Fischer H, Wik G. Cerebral blood flow during anxiety provocation. *J Clin Psychiatry* 1997;58(Suppl 16):16-21.
42. Maddock RJ, Buonocore MH. Activation of left posterior cingulate gyrus by the auditory presentation of threat-related words: an fMRI study. *Psychiatry Res* 1997;5:1-14.
43. Rauch SL, Savage CR, Alpert NM, Fischman AJ, Jenike MA. The functional neuroanatomy of anxiety: a study of three disorders using positron emission tomography and symptom provocation. *Biol Psychiatry* 1997;42:446-52.
44. Sharp PF, Smith FW, Gemmill HG, Lyall D, Evans NT, Gvozdanovic D, et al. Technetium-99m HM-PAO stereoisomers as potential agents for imaging regional cerebral blood flow: human volunteer studies. *J Nucl Med* 1986;27:171-7.
45. Andersen AR, Friberg HH, Schmidt JF, Hasselbalch SG. Quantitative measurements of cerebral blood flow using SPECT and ^{99m}Tc-d,l-HMPAO compared to xenon-133. *J Cereb Blood Flow Metab* 1988;8:S69-81.
46. Buckner RL. Event-related fMRI and the hemodynamic response. *Hum Brain Mapp* 1998;6:373-7.
47. George MS, Ring HA, Costa DC, Ell PJ, Kouris K, Jarritt PH. Neuroactivation and Neuroimaging with SPET. London: Springer-Verlag; 1991.
48. Stamatakis EA, Glabus MF, Wyper DJ, Barnes A, Wilson JT. Validation of statistical parametric mapping (SPM) in assessing cerebral lesions: A simulation study. *Neuroimage* 1999;10:397-407.

Correspondência

Geraldo Busatto Filho

Rua Ovidio Pires Campos s/nº

05403-010 São Paulo, SP

E-mail: gbusatto@mtecnetps.com.br
