

Revista Colombiana de Cancerología

www.elsevier.es/cancerologia



ORIGINAL

Análisis de espectros de resonancia magnética

Alfonso Lozano^{a,b,*}, Nathaly Barbosa^{c,d} y Luis Aguilles^c

^aGrupo de Radiología e Imágenes Diagnósticas, Instituto Nacional de Cancerología, ESE, Bogotá, D. C., Colombia

^bDepartamento de Imágenes Diagnósticas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia

^cGrupo de Física Médica y Radiológica, Departamento de Física, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia

^dGrupo de Medicina Nuclear, Instituto Nacional de Cancerología, ESE, Bogotá, D. C., Colombia

Recibido el 17 de julio de 2012; aceptado 9 de abril de 2013

PALABRAS CLAVE

Imágenes de
resonancia magnética;
Espectroscopia
de resonancia
magnética;
Metabolitos;
Cuantificación;
Reproducibilidad;
PRESS

Resumen

Objetivo: Estudiar el comportamiento del uso de razones entre metabolitos y de la comparación de un volumen de interés con uno contralateral para determinar cuál de estas 2 técnicas es la más apropiada para obtener una relación del comportamiento metabólico de un espectro de resonancia magnética.

Métodos: Fueron reclutados 10 voluntarios sanos, en los que fueron analizados el lóbulo parietal, el lóbulo temporal y los ganglios basales.

Resultados: La cuantificación directa del espectro mostró un mayor coeficiente de variación dentro de los análisis realizados, lo cual justifica usar técnicas con referentes endógenos. El estudio de un volumen contralateral mostró ser una técnica con dispersión e índice de lateralidad altos. El uso de la creatina (Cr) como metabolito de control presentó un coeficiente de variación menor que la primera técnica evaluada. Los resultados hallados (ganglios basales: N-acetil-aspartato/Cr: 3 ± 6 ; colina/Cr: 2 ± 4 . Lóbulo temporal: N-acetil-aspartato/Cr: 5 ± 5 ; colina/Cr: 8 ± 12 . Lóbulo parietal: N-acetil-aspartato/Cr: $2,0 \pm 0,6$; colina/Cr: $0,9 \pm 0,5$) muestran valores similares a los encontrados en la literatura, con variaciones regionales considerables.

Conclusiones: La técnica de cuantificación de la razón de los metabolitos con la Cr es la más adecuada para usar en el Instituto Nacional de Cancerología, por tener una dispersión menor y por arrojar valores cercanos a los reportados en la literatura en las diferentes regiones anatómicas estudiadas.

© 2012 Instituto Nacional de Cancerología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: alfolozc@gmail.com (A. Lozano).

KEYWORDS

Magnetic resonance images;
Magnetic resonance spectroscopy;
Magnetic;
Metabolites;
Quantification;
Reproducibility;
PRESS

Magnetic resonance spectrum analysis**Abstract**

Objective: To study the performance in the use of metabolite ratios and the comparison of a contralateral volume of interest in order to determine which of these two techniques is most suitable for obtaining a ratio of the metabolite behaviour of a magnetic resonance spectrum.

Methods: The parietal lobe, the temporal lobe, and basal ganglions were analysed in the 10 healthy volunteers included in the study.

Results: The direct quantification of the spectra showed a wide coefficient of variation within the analyses performed, which justified using techniques with endogenous references. The study of a contralateral volume showed to be a technique with a high dispersion and laterality index. The use of creatinine (Cr) as a control metabolite had a lower coefficient of variation than the first technique evaluated. The results obtained (basal ganglions: N-acetyl-aspartate/Cr: 3 ± 6 ; choline/Cr: 2 ± 4 . Temporal lobe: N-acetyl-aspartate/Cr: 5 ± 5 ; choline/Cr: 8 ± 12 . Parietal Lobe: N-acetyl-aspartate/Cr: 2.0 ± 0.6 ; choline/Cr: 0.9 ± 0.5) showed similar values to those obtained in the literature, with considerable anatomical region variations.

Conclusions: The technique that measures the ratio of the metabolites with Cr is the most suitable for use in the *Instituto Nacional de Cancerología* (National Oncology Institute), due to having a lower dispersion and producing results near those reported in the literature in the different anatomical regions studied.

© 2012 Instituto Nacional de Cancerología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Si bien las técnicas de imágenes de resonancia magnética son usadas habitualmente en el diagnóstico de tumores primarios, secundarios y otras lesiones intracraneales, la espectroscopia por resonancia magnética (ERM) proporciona información por completo diferente, relacionada con la proliferación de las membranas celulares, el daño neuronal, el metabolismo energético y las transformaciones necróticas de tejidos cerebrales o tumorales. El uso de estas 2 técnicas en conjunto ha desempeñado un papel muy importante en el estudio no solo de los tumores, sino de traumas, epilepsias, esclerosis múltiple, demencia, etc.¹⁻⁶.

Cuantificación de espectros

A diferencia de las imágenes, el resultado de los estudios de ERM son gráficas que, a través de picos, presentan la concentración de diferentes metabolitos (fig. 1). Sin embargo, la forma del espectro se ve influenciada por las variaciones en los campos magnéticos usados para su adquisición; es decir, depende, principalmente, del equipo, de las antenas usadas y de la morfología de los pacientes, por lo que una simple inspección visual no permite la correcta interpretación de los espectros.

Se han desarrollado técnicas de cuantificación que buscan relacionar el área de los picos con la concentración del metabolito y expresarla en unidades de milimolaridad (mmol/L, o bien, en mM)⁷, mediante el uso de referencias internas (generalmente, el agua del parénquima no suprimida) o externas (que pueden ser agua o acetato de sodio contenidas en un tubo puesto cerca a la cabeza del paciente)⁸⁻¹⁰. Ambos métodos tienen limitaciones importantes relacionadas con los principios físicos y químicos de la adquisición; sin

embargo, el problema más importante dentro de la práctica clínica radica en que dichas técnicas requieren un análisis matemático, en el que se incluyen los tiempos de relajación, la estimación de la cantidad de sustancia gris y blanca, el

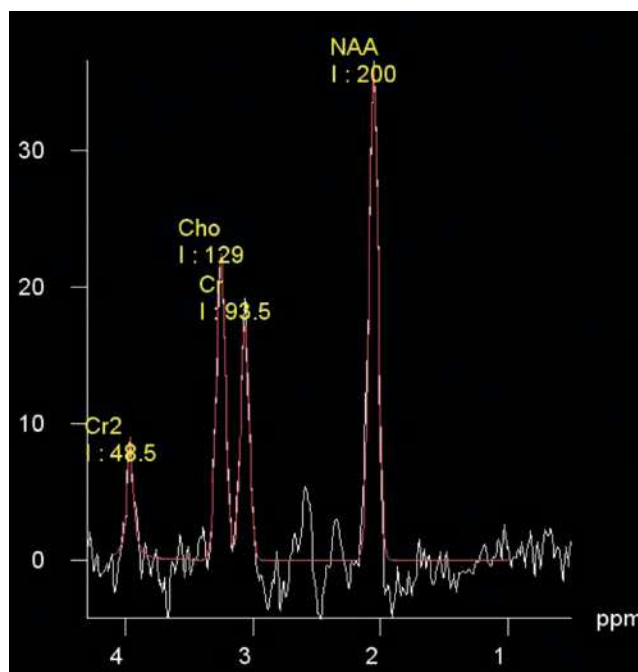


Figura 1 Espectro obtenido en los ganglios basales del lado izquierdo de uno de los voluntarios evaluados. Se muestra que la calidad de los espectros es aceptable, según el criterio clínico, en términos de la relación señal-ruido y del ancho de los picos.

número de protones incluidos en la muestra (que se relaciona, a su vez, con el volumen y la localización del área por evaluar); tales cálculos resultan complicados si no se cuenta con personal experto que los realice¹¹.

Por lo anterior, se estudian las técnicas de análisis más usadas en ERM, las cuales, aunque no permiten cuantificar la concentración metabólica, sí conducen a una evaluación más adecuada de los espectros que la inspección visual. Estas se basan en patrones endógenos, como el método de razones entre metabolitos y el uso de espectros de control como referencia. En el método de las razones entre metabolitos, las áreas halladas en cada uno de los picos del espectro son reportadas como la razón entre estas y el área de un pico de referencia, donde la creatina (Cr) es el metabolito más usado en los espectros de ¹H. Esta técnica permite identificar anomalías metabólicas, al encontrar variaciones respecto a los valores de los espectros de tejido normal sano. Sin embargo, en la literatura se reporta que el sacrificio en exactitud y en precisión cuando se usa esta técnica excede los beneficios que ofrece¹². Además de lo anterior, los niveles de Cr pueden modificarse cuando hay focos de esclerosis múltiple, VIH y demencia⁴, así como traumas, abscesos o neoplasmas, y todo ello hace que el control no sea válido³.

Por otro lado, el uso de espectros de control como referencia basa su análisis en la comparación del espectro hallado en el volumen de interés (VOI) con su correspondiente volumen contralateral (VC), ubicado en la misma región anatómica del otro hemisferio; así, el paciente es su propio control. Es decir, cuando se tiene un espectro de tejido sano como referencia, podrán identificarse alteraciones metabólicas en el VOI ubicado en la misma región anatómica del control VC; sin embargo, los resultados se hacen dependientes de las posibles variaciones del campo magnético entre estas 2 posiciones: el VOI y su VC¹.

Al identificar las variables que pueden afectar estas 2 técnicas de análisis se pretende, entonces, evaluar su reproducibilidad, por medio de estudios en un grupo de voluntarios sanos; dichos estudios se llevan a cabo en las mismas condiciones que los realizados en la práctica clínica de la institución, con el fin de determinar los rangos clínicos que pueden llevar a la detección de anomalías metabólicas, y no a variaciones propias del experimento en los exámenes realizados en el servicio de imágenes diagnósticas del Instituto Nacional de Cancerología (INC).

Métodos

El estudio se realizó en un equipo de resonancia Siemens Essenza de 1.5T del INC. Fueron reclutados 10 voluntarios sanos en un estrecho rango de edad, con una media de 26 ± 3 años, a quienes se les realizaron estudios de imágenes de resonancia magnética y de ERM cerebrales de ¹H. Estos fueron incluidos en el estudio si, y solo si, eran considerados sanos, no tenían ningún tipo de dispositivo que pudiera verse afectado por los campos magnéticos o que degradara la calidad de la imagen (como aparatos de ortodoncia), y aceptaban su participación en el estudio con la firma de un consentimiento informado. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Investigaciones del INC.

Para posicionar los VOI y para excluir patologías, se realizaron imágenes estructurales con el protocolo de cráneo del INC (tiempo de repetición/tiempo de eco): SE sagital (401 ms/13 ms); Flair Blade axial (8.500 ms/13 ms); T₂ Blade axial (4.110 ms/119 ms); T₂ Blade coronal (4.500 ms/111 ms); Eco planar imaging (EPI) (3.800 ms/119 ms) y Spin-Echo (SE) axial T₁ (420 ms/8,1 ms); todas ellas, con un campo de visión de 230×230 mm². No fue necesario el uso de medio de contraste para los propósitos del estudio.

Se estudiaron las 3 regiones anatómicas de mayor relevancia clínica: una en los ganglios basales, otra en el lóbulo parietal y, finalmente, una en el lóbulo temporal; las 3 fueron tomadas en ambos hemisferios (fig. 2). El tamaño del VOI fue de $15 \times 15 \times 15$ mm³ en los lóbulos, y de $20 \times 20 \times 20$ mm³ en los ganglios basales.

Previamente a la obtención del espectro, se obtuvo una supresión débil de agua con la secuencia CHESS (*chemical shift selective*), con un ancho de banda de 35 Hz. La secuencia usada para la selección del VOI fue la PRESS (*point resolved spectroscopy*), con 128 promedios, un tiempo de eco de 135 ms y tiempo de repetición de 1.500 ms. Antes de la medida, el equipo ajustó automáticamente el campo magnético con *shimming* de primer y segundo orden, sin realizar ningún otro ajuste por parte del usuario.

Procesamiento y análisis

Los espectros fueron procesados con el *software* jMRUI¹³; este, a diferencia de los incluidos en los equipos comerciales, permite el análisis paso a paso de la señal, además es gratuito y abierto. Fueron incluidos en el estudio solo los



Figura 2 Localización de los volúmenes de interés en un corte axial.

espectros con un ancho de banda a mitad de altura del agua menor que 7 Hz ($5,80 \pm 1,20$ Hz), y dicha señal fue suprimida por la descomposición de valor único de Hankel-Lanczos. Se usó un filtro gaussiano de 5 Hz como apodización, y la señal fue ajustada mediante el algoritmo AMARES¹⁰, con la cual se analizó como una superposición de 3 componentes: N-acetil-aspartato (NAA) a 2,02 ppm, Cr a 3,02 ppm y colina (Cho) a 3,22 ppm. La relación señal-ruido fue de: 80 ± 18 en los espectros de los ganglios basales; de 45 ± 7 , en los del lóbulo parietal, y de 34 ± 7 , en los del lóbulo temporal.

Con los datos obtenidos en cada una de las regiones, se evaluó la simetría de los espectros mediante el índice de lateralidad (IL)¹⁴:

$$L = \frac{2(VOI_D - VOI_I)}{VOI_D + VOI_I}$$

donde: VOI_D es el VOI del lado derecho, y VOI_I , el del izquierdo.

A su vez, en la práctica clínica vendrían siendo el VOI y el VC, dependiendo de su ubicación. Se analizaron también las razones entre metabolitos: NAA/Cr y Cho/Cr; y en ambos casos se determinó el coeficiente de variación (CV) como la razón entre la desviación estándar y el valor medio para comparar ambas técnicas. Los resultados se analizaron a través de los percentiles del 25, 50 y 75, y se utilizaron diagramas de cajón-bigotes para mostrar el comportamiento de las variables continuas.

Resultados

Calidad de los espectros

Los espectros con un ancho de banda a mitad de altura del agua menor que 7 Hz fueron en todos los casos de muy buena calidad en cuanto a la interpretación clínica que puede extraerse de estos (fig. 1). En ningún caso, la relación

señal-ruido ni el ancho de los picos se consideraron como una fuente de mala interpretación de los resultados, según criterio médico, lo que, a su vez, concuerda con los altos valores de las relaciones señal-ruido encontradas.

Cuantificación directa del área de los picos

El área de los picos estudiados (NAA, Cr y Cho) se determinó en cada una de las regiones anatómicas estudiadas; los resultados se muestran en la figura 3. Se observa en todos los casos que la mediana es inferior en el lóbulo parietal, y superior en los ganglios basales, y que existen variaciones significativas en los valores medios de todos los metabolitos en las diferentes regiones. La dispersión de estos fue similar en todos los casos. Analizando el CV, se halla en los ganglios basales: NAA = 0,19; Cho = 0,33; Cr = 0,34; en el lóbulo parietal: NAA = 0,33; Cho = 0,45; Cr = 0,66; y en el temporal: NAA = 0,21; Cho = 0,44; Cr = 0,75.

Índice de lateralidad

Los resultados de los IL se muestran en la figura 4 para el NAA, la Cr y la Cho, en las regiones anatómicas estudiadas. Aunque la mediana en todos los casos es menor que 0,2, el tercer cuartil se incrementa en el lóbulo parietal hasta 0,7. Ni en el lóbulo temporal ni en los ganglios basales se excede de 0,4. El CV encontrado para el IL fue en los ganglios basales: NAA = 0,05; Cho = 0,07; Cr = 0,01; en el lóbulo parietal: NAA = 0,13; Cho = 0,12; Cr = 0,01; y en el temporal: NAA = 0,08; Cho = 0,09; Cr = 0,05.

Razones entre metabolitos

En la figura 5 se esquematizan los resultados de las razones entre el NAA y la Cho con la Cr. En los ganglios basales y en el lóbulo parietal, el primer y el tercer cuartiles se encuentran muy cerca de su mediana, aunque los valores máximos en los ganglios basales estén muy distantes de ellos. Esto no se observa en el lóbulo temporal, donde el tercer cuartil re-

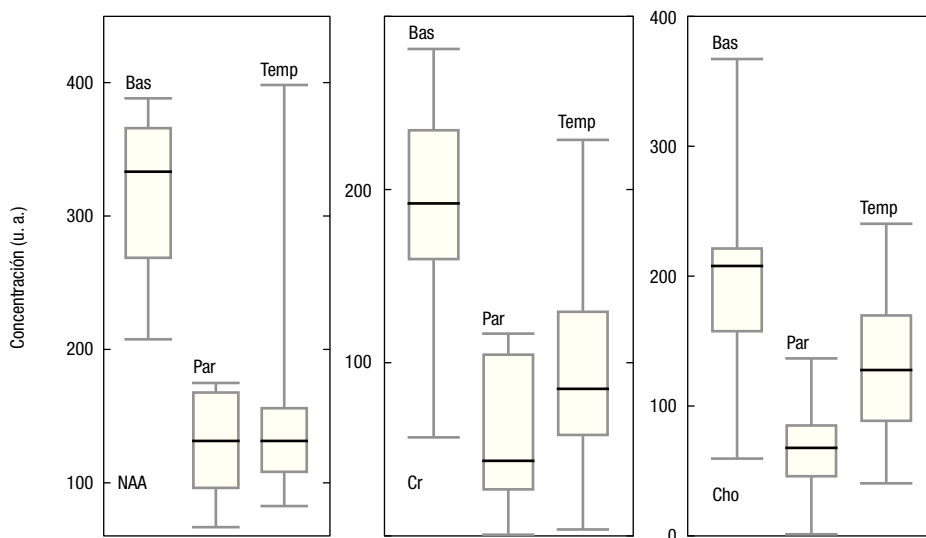


Figura 3 Concentraciones de los picos de N-acetil-aspartato, creatina y colina en las 3 regiones de interés: Bas: ganglios basales; Par: lóbulo parietal; y Temp: lóbulo temporal, expresados como el área bajo cada uno en unidades arbitrarias.

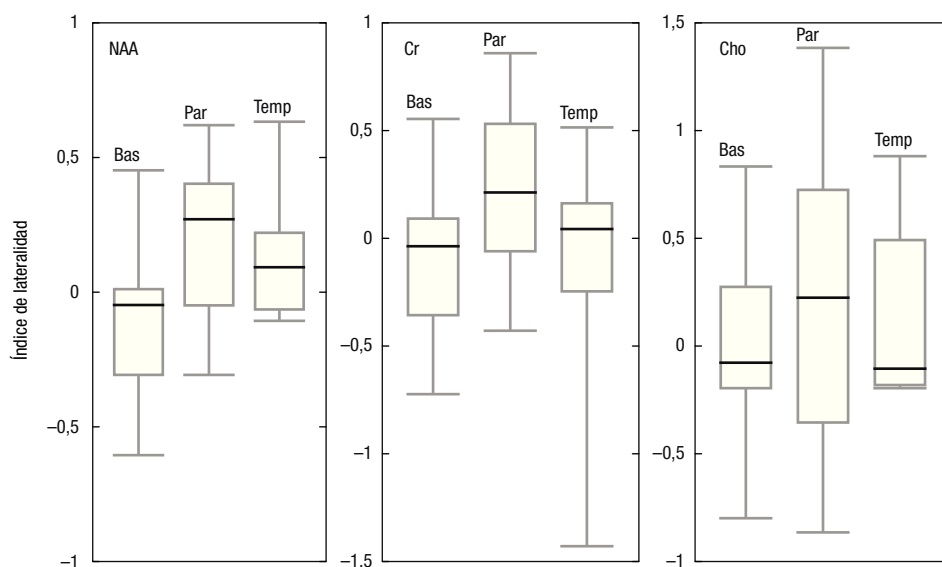


Figura 4 Índice de lateralidad para el N-acetil-aspartato, la creatina y la colina en las 3 regiones de interés: Bas: ganglios basales; Par: lóbulo parietal; y Temp: lóbulo temporal.

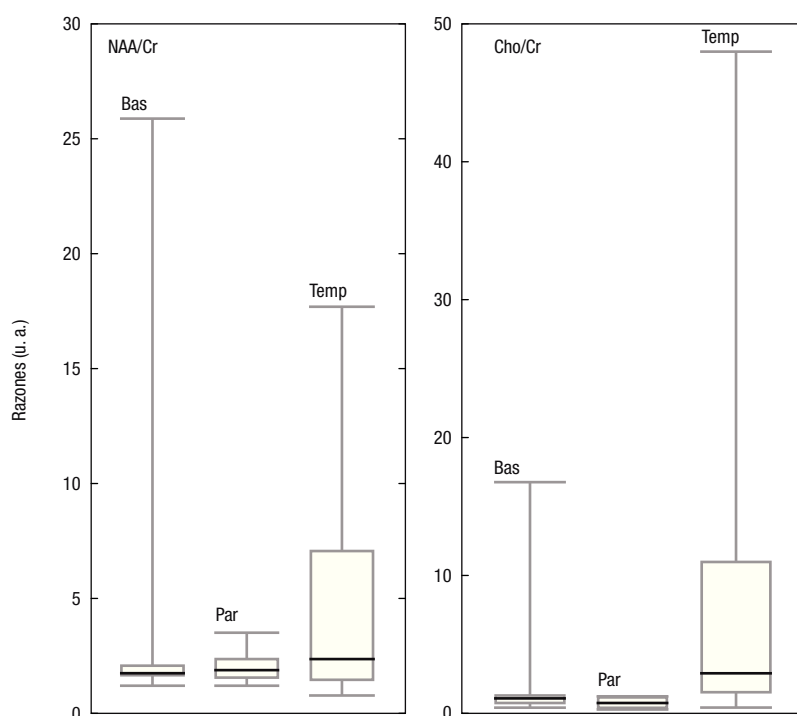


Figura 5 Razones entre metabolitos en las 3 regiones de interés: Bas: ganglios basales; Par: lóbulo parietal; y Temp: lóbulo temporal.

sulta ser mucho mayor que el primer cuartil y el valor máximo está muy por encima de este. Lo anterior concuerda con las desviaciones estándares halladas en el estudio de las áreas de los picos en las mencionadas regiones anatómicas.

Para esta técnica de análisis, el CV hallado fue en los ganglios basales: NAA/Cr = 0,001; Cho/Cr = 0,007; en el lóbulo parietal: NAA/Cr = 0,003; Cho/Cr = 0,003; y en el temporal: NAA/Cr = 0,001, Cho/Cr = 0,008.

Los valores encontrados para los voluntarios normales de las razones de los metabolitos se muestran en la tabla 1.

Tabla 1 Datos obtenidos de las razones entre metabolitos. Valor medio $\pm$ desviación estándar

Localización	NAA/Cr	Cho/Cr
Ganglios basales	3 ± 6	2 ± 4
Lóbulo temporal	5 ± 5	8 ± 12
Lóbulo parietal	$2,0 \pm 0,6$	$0,9 \pm 0,5$

Cho: colina; Cr: creatina; NAA: N-acetil-aspartato.

Discusión

Cuantificación directa

Analizando los valores encontrados, se observa que las variaciones más pequeñas ocurren en el NAA y en la región anatómica correspondiente a los ganglios basales; esto se puede explicar fácilmente, debido a que el NAA es el pico más grande de todo el espectro en el tejido encefálico sano, y a que los ganglios basales presentan una buena uniformidad de campo, por su ubicación respecto al cráneo y al estar en el centro de la antena.

Aunque los valores medios de los lóbulos parietal y temporal están cerca entre ellos para los 3 metabolitos, en la Cho la diferencia es del 46%, y en la Cr, del 47%. Los CV encontrados son altos incluso para la Cr, que se considera la de menor variación, por su metabolismo ($0,59 \pm 0,22$), lo cual sustenta la idea principal de realizar análisis de espectros a través de referencias internas (endógenas o propias del espectro), y no con solo una inspección visual de este.

Índice de lateralidad

Si se busca el análisis de anomalías del comportamiento de los metabolitos del espectro con este método, han de considerarse variaciones en el IL mayores que 0,5 en los ganglios basales y en el lóbulo temporal, mientras que en el lóbulo parietal es necesario considerar un límite de 0,8. Los valores encontrados son muy altos, y difieren de los reportados en la literatura^{11,12}. Esto dificulta, a su vez, el estudio de patologías que involucren leves variaciones en las concentraciones metabólicas.

Razones

Los valores reportados en la literatura para las razones entre metabolitos, $NAA/Cr = 1,37 \pm 1,16$, $Cho/Cr = 0,81 \pm 1,53$ en la sustancia blanca del lóbulo parietal, y $NAA/Cr = 1,43 \pm 1,16$, $Cho/Cr = 0,82 \pm 1,30$ en el tálamo¹⁴; $NAA/Cr = 1,51 \pm 0,10$ y $Cho/Cr = 0,87 \pm 0,10$, nuevamente del lóbulo parietal¹⁵, y $NAA/Cr = 4,8 \pm 2,3$; $Cho/Cr = 7,7 \pm 3,7$, del lóbulo occipital¹⁶, concuerdan con los valores hallados en las regiones anatómicas estudiadas. Sin embargo, las desviaciones estándares son significativamente mayores que el valor medio en los ganglios basales y el lóbulo temporal; este comportamiento se asemeja al descrito por Minatti et al.¹⁴. Debido a las importantes variaciones regionales, sería necesario determinar sus valores en cada región anatómica, y no solo en las estudiadas.

El hecho de que los coeficientes de variación de la técnica de razones entre metabolitos se encuentren en un orden de magnitud por debajo de la técnica del VOI contralateral respalda la idea de que las variaciones en los campos magnéticos en los 2 hemisferios son significativamente mayores que las variaciones propias de los ajustes de los metabolitos.

Si bien se reporta que el sacrificio en exactitud y precisión cuando se usa esta técnica excede los beneficios que ofrece¹², en las condiciones actuales de adquisición de espectros se ve que presenta una variación más pequeña y concordante con los valores reportados en la literatura.

Conclusiones

El presente estudio pretendió evaluar la reproducibilidad de las técnicas de análisis de los espectros obtenidos con los protocolos actuales del servicio de imágenes diagnósticas del INC. Los espectros con un ancho de banda a mitad de altura del agua menor que 7 Hz fueron considerados de muy buena calidad, según criterio médico. Se halló que las técnicas de análisis basadas en la inspección visual (áreas de los metabolitos) no presentan una buena reproducibilidad, incluso tratándose de tejido encefálico sano, por lo cual se justifica el uso de técnicas basadas en la concentración endógena de metabolitos.

Se encontró que las variaciones en los IL son muy grandes, lo cual lleva a que valores por encima de 0,5 en lesiones localizadas en los ganglios basales o en el lóbulo temporal sean necesarios para descartar diferencias propias del experimento y atribuirse, correctamente, a cambios metabólicos específicos de ese tejido. En el lóbulo parietal, las diferencias son del orden de 0,7 en el IL. Por lo tanto, las patologías con pequeñas variaciones podrían no ser detectadas con esta técnica de cuantificación.

Usando la razón entre los metabolitos, se observa que, si bien esta se ve afectada, nuevamente, por las desviaciones entre los sujetos, los valores hallados concuerdan con los reportados en la literatura, y muestran, además, que las amplias desviaciones estándares son propias según la localización anatómica. Sin embargo, se encuentran variaciones regionales importantes, por lo cual es necesario determinar sus valores en cada región anatómica.

Los CV de la técnica de coeficientes entre metabolitos se encuentran en un orden de magnitud por debajo de la usada de un volumen de control en el hemisferio opuesto; además, el comportamiento de la distribución presenta menor dispersión. Por ende, esta técnica debe ser la preferida frente a la comparación con un volumen contralateral.

Agradecimientos

Al INC, por el apoyo metodológico prestado, y a Ricardo Sánchez, por su valiosa colaboración en el planteamiento del estudio, así como en el análisis estadístico de este.

Financiación

El presente estudio fue financiado por la Convocatoria Inversión Nación 2012, del INC.

Bibliografía

1. Reiser MF, Semmler W, Hricak H. Magnetic resonance tomography. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2008.
2. Block W, Träber F, Flacke S, Jessen F, Pohl C, Schild H. In-vivo proton MR-spectroscopy of the human brain: Assessment of N-acetylaspartate (NAA) reduction as a marker for neurodegeneration. Amino Acids. 2002;23:317-23.
3. Butscher IM, Holtas S. Proton magnetic resonance spectroscopy in brain tumors: clinical applications. Neuroradiology. 2001;43:345-52.

4. Gujar SK, Maheshwari S, Björkman-Burtscher I, Sundgren PC. Magnetic resonance spectroscopy. *J Neuro-Ophthalmol*. 2005; 25:217-26.
5. Mathews VP, Barker PB, Blackband SJ, Chatham JC, Bryan RN. Cerebral metabolites in patients with acute and subacute strokes: concentrations determined by quantitative proton MR spectroscopy. *Am J Roentgenol*. 1995;165:633-8.
6. Möller-Hartmann W, Herminghaus S, Krings T, Marquardt G, Lanfermann H, Pilatus U, et al. Clinical application of proton magnetic resonance spectroscopy in the diagnosis of intracranial mass lesions. *Neuroradiology*. 2002;44:371-81.
7. Knight-Scott J, Haley AP, Rossmiller SR, Farace E, Mai WM, Christopher JM, et al. Molality as a unit of measure for expressing 1H MRS brain metabolite concentrations in vivo. *Magn Reson Imaging*. 2003;21:787-97.
8. Jansen JF, Backes WH, Nicolay K, Kooi ME. 1H MR spectroscopy of the brain: absolute quantification of metabolites. *Radiology*. 2006;240:318-32.
9. Michaelis T, Merboldt KD, Bruhn H, Hännicke W, Frahm J. Absolute concentrations of metabolites in the adult human brain in vivo: Quantification of localized proton MR spectra. *Radiology*. 1993; 187:219-27.
10. Christiansen P, Henriksen O, Stubgaard M, Gideon P, Larsson HBW. In vivo quantification of brain metabolites by 1H-MRS using water as an internal standard. *Magn Reson Imaging*. 1993;11-1:107-18.
11. Tofts PS, Wray S. A critical assessment of methods of measuring metabolite concentrations by NMR spectroscopy. *NMR Biomed*. 1988;1:1-10.
12. Li BS, Wang H, Gonen O. Metabolite ratios to assumed stable creatine level may confound the quantification of proton brain MR spectroscopy. *Magn Reson Imaging*. 2003;21:923-8.
13. Stefan D, Di Cesare F, Andrasescu A, Popa E, et al. Quantitation of magnetic resonance spectroscopy signals: the jMRUI software package. *Meas Sci Technol*. 2009. doi:10.1088/0957-0233/20/10/104035.
14. Minati L, Aquino D, Bruzzone MG, Erbetta A. Quantitation of normal metabolite concentrations in six brain regions by in vivo 1H MR spectroscopy. *J Med Phys*. 2010;35:154-63.
15. Webb PG, Sailasuta N, Kohler SJ, Raidy T, Moats RA, Hurd RE. Automated Single-Voxel Proton MRS: technical development and multisite verification. *MRM*. 1994;31:365-73.
16. Simmons A, Smail M, Moore E, Williams S. Serial precision of metabolite peak area ratios and water referenced metabolite peak areas in proton mr spectroscopy of the human brain. *Magn Reson Imaging*. 1998;16:319-30.