

Estudo do metabolismo muscular através da Espectroscopia de Ressonância Magnética (^{31}P -MRS) em voluntários sadios

T. S. Batista¹; C. E. G. Salmon¹; A. C. Santos²

¹Grupo de Física Médica, Departamento de Física, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, São Cristóvão-SE, Brasil

²Centro de Imagens e Física Médica, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14.040-903, Ribeirão Preto-SP, Brasil

thiago_sb@hotmail.com

(Recebido em 31 de julho de 2008; aceito em 06 de setembro de 2008)

Uma forma não invasiva de avaliação do metabolismo muscular dos seres humanos é através da Espectroscopia de Ressonância Magnética do núcleo de fósforo (^{31}P -MRS). Alguns estudos têm mostrado a variação da concentração de metabólitos fosforilados (PCr, ADP e Pi) e de outros parâmetros derivados (pH intracelular e $[\text{Mg}^{2+}]$), no músculo em repouso e após uma sessão de exercícios físicos. O objetivo deste trabalho foi promover um estudo quantitativo dos níveis dos metabólitos fosforilados presentes no músculo da panturrilha de voluntários em repouso e pós-exercício para criação de um banco de dados de indivíduos sadios. Sete voluntários saudáveis foram submetidos a exames de ^{31}P -MRS na panturrilha, em repouso e no pós-exercício. Após a definição das metodologias mais estáveis para calcular o pH, a $[\text{Mg}^{2+}]$ e a [ADP] através de comparações estatísticas, quantificamos os níveis metabólicos dos voluntários através do software livre jMRUI v 3.0. O PCr foi o metabólito mais estável, em repouso, e no pós-exercício apresentou um comportamento de recuperação na forma de uma mono-exponencial. O Pi apresentou-se como o metabólito mais sensível à detecção da atividade física e sua recuperação pós-exercício foi caracterizada por uma forma bi-exponencial. Foi reproduzido com êxito o comportamento esperado para o PCr e Pi no pós-exercício, determinando-se as diferentes constantes de tempo associadas ao processo de recuperação. Também foi detectado um comportamento linear do fosfomonoéster não reportado na literatura consultada.

Palavras-chave: ^{31}P -MRS, quantificação metabólica, metabolismo muscular.

Phosphorus 31 Magnetic Resonance Spectroscopy (^{31}P -MRS) is a powerful technique for evaluating human muscular metabolism. Some reports indicated the behavior of phosphorylated metabolites (PCr, ADP and Pi) and other indirect parameters (intracellular pH and $[\text{Mg}^{2+}]$) in muscles at rest and after an exercise load. The aim of this work is a quantitative study of the phosphorylated metabolite levels in the calf muscle of normal subjects at rest and post-exercise, in order to create a normal control database. ^{31}P spectra of seven volunteers were acquired in both conditions. Firstly, different quantification methodologies were evaluated to use the more reliable. The PCr metabolite was the more stable at rest and it had mono-exponential behavior after exercise. The Pi was the more sensible indicator of the physical activities. The time constants of the recuperation process are report for all the evaluated metabolites and parameters. Finally, the temporal behavior of phosphomonoesters was quantified.

Keywords: ^{31}P -MRS, metabolite quantification, muscular metabolism.

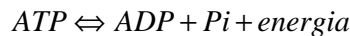
1. INTRODUÇÃO

Existe uma necessidade crescente de técnicas avançadas não-invasivas para avaliar a função dos tecidos e o metabolismo humano *in vivo*. Essas tecnologias permitem a determinação das propriedades vitais do tecido no estado normal e também a avaliação das mudanças dinâmicas no tecido sob condições patológicas.

A Espectroscopia de Ressonância Magnética (MRS – *Magnetic Resonance Spectroscopy*) é uma técnica que possibilita a medição não-invasiva de determinados compostos do músculo humano através do núcleo do átomo de fósforo (^{31}P). As vantagens da ^{31}P -MRS estão no fato de que os metabólitos contendo fósforo desempenham um papel importante no metabolismo energético, e possuem

concentrações razoavelmente elevadas, especialmente no tecido muscular. Essa técnica pode ser utilizada como ferramenta de diagnóstico médico, visto que com a determinação da concentração dos metabólitos presentes no músculo, temos como comparar o espectro do paciente com um espectro previamente padronizado de uma pessoa sadia e com isso detectar uma possível lesão.

O conteúdo energético do músculo é o resultado do balanço entre produção e utilização do ATP. O fornecimento de energia para a contração muscular é dado pela desfosforilação do ATP em ADP e em fosfato inorgânico (Pi), como mostra a reação abaixo:



Para o equilíbrio dessa reação, que é a base do metabolismo muscular, a fosfocreatina (PCr) também tem um papel importante visto que ela é clivada instantaneamente para reconstituir a molécula de ATP (utilizada posteriormente na contração muscular) a partir de um ADP e de um novo íon fosfato que se liga a ele, além de formar creatina por 2 a 7 segundos após um esforço muscular intenso. No músculo existem três fontes importantes de ATP e todas elas mantêm uma elevada razão ATP/ADP citoplasmática: atividade da creatina quinase (CK), glicólise anaeróbica (AnGly) e fosforilação oxidativa mitocondrial (OxPhos). Com o término de um exercício físico, ambas as vias de CK e AnGly são imediatamente desativadas. Os níveis de PCr são então restaurados via reação inversa de CK, utilizando o ATP produzido exclusivamente através de fosforilação oxidativa [1].

O pico de fosfato inorgânico (Pi) tem uma importância particular porque representa a soma de dois fosfatos inorgânicos visíveis: mono e dibásicos. Estas duas espécies de fosfatos participam do sistema de armazenamento de fosfato intracelular e estão em rápida mudança, dependendo do pH celular. O desvio químico do Pi é a média ponderada dessas duas espécies; mudanças no pH alteram o balanço entre essas duas espécies de fosfato e então produzem uma mudança no desvio químico do Pi. A “acidose” desloca o pico para mais perto e “alcalinose” desloca para mais distante do pico de fosfocreatina. Essas migrações do pico de Pi em relação à posição estável do pico de PCr podem ser usadas como uma medida muito sensível *in vivo* do pH intracelular [2].

O conhecimento dos níveis de ADP é altamente relevante, uma vez que o ADP é um importante regulador da síntese de ATP mitocondrial, o principal processo de entrega de energia das células [1]. A concentração de ADP em repouso e em atividade moderada no músculo, geralmente é dezenas de micromoles, muito baixa para permitir a detecção direta pela ^{31}P -MRS. Então, faz-se necessária uma estimativa indireta deste parâmetro. Porém, as metodologias reportadas na literatura para a determinação deste e de outros parâmetros indiretos são similares, mas da sua aplicação podem ser obtidos resultados significativamente diferentes [3, 4, 5, 6].

A concentração de magnésio livre $[\text{Mg}^{2+}]$ na célula é de considerável interesse desde que os complexos de Mg^{2+} de ADP e ATP são os substratos ativos para a ATPase e a quinase [1]. Este parâmetro deve ser também determinado de forma indireta a partir da separação dos desvios químicos entre alfa e beta ou gama ATP, os detalhes serão discutidos na metodologia.

O objetivo deste trabalho foi promover um estudo quantitativo dos níveis de diversos metabólitos fosforilados (ATP, ADP, Pi, PCr, PME), do pH intracelular e da concentração de magnésio livre no músculo da panturrilha de voluntários em repouso e pós-exercício para criação de um banco de dados de indivíduos saudáveis. Adicionalmente,

são sugeridos diferentes ajustes matemáticos para modelar o comportamento da recuperação metabólica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os exames foram realizados em um equipamento de Ressonância Magnética de 1.5 T, *Magneton Vision, Siemens*, instalado no HC da FMRP-USP (Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo), utilizando uma bobina de superfície transmissora e receptora de dupla sintonia ^1H (63.8 MHz) e ^{31}P (25,7MHz). Sete voluntários (4M, 3F), entre 19 e 49 anos com diversos condicionamentos físicos, foram submetidos a uma sessão de exercícios físicos de flexão plantar até a exaustão.

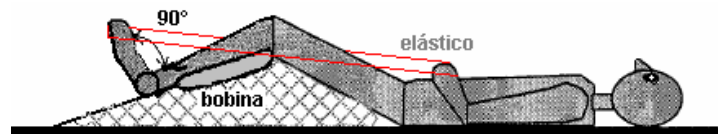


Figura 1: Esquema do posicionamento dos indivíduos durante o exercício de flexão plantar.

Os indivíduos foram posicionados em decúbito dorsal, com a panturrilha posicionada no centro da bobina (Figura 1). Uma imagem localizadora, *Gradient Recall Echo* (GRE), Tempo de repetição (TR) = 15ms, Tempo de eco (TE) = 6ms, *flip angle* de 30°, foi adquirida para posicionar o volume de interesse (30x30x30 mm) numa região entre os músculos *Soleus* e *Gastrocnemius medial*. Foi realizada uma seqüência de espectroscopia de aquisição simples e de volume único com um TR=300ms, onde cada medida representa a média de 16 aquisições simples do sinal de indução livre, com um tempo de aquisição de 1024 ms e 1024 pontos.

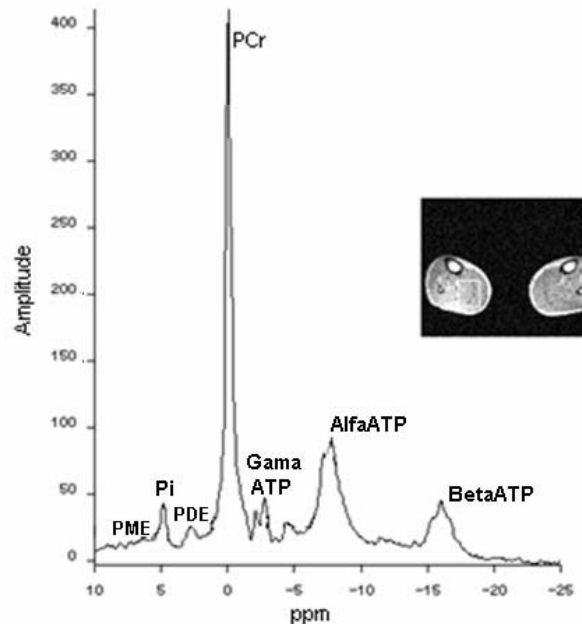


Figura 2: Exemplo de espectro de músculo utilizando a frequência do ^{31}P (25,7MHz), obtido de um voluntário sadio, em repouso, no HC da FMRP-USP. É indicada também a localização do volume de interesse num corte axial.

Primeiramente, foi estudada a estabilidade das razões metabólicas a partir dos espectros de um voluntário em repouso, ante algumas variações nas condições experimentais. As mudanças nas condições experimentais foram: variação no tempo de repetição e variação no número de aquisições. Esta etapa foi necessária para a definição do protocolo de aquisição mais conveniente no estudo longitudinal.

Para o cálculo dos parâmetros indiretos, verificamos algumas metodologias a fim de encontrarmos as mais estáveis para a aplicação em nossos estudos. Os níveis de pH foram determinados de duas maneiras a partir do desvio químico do fosfato inorgânico (δ_{Pi}). A relação obtida por Iotti *et al.*[3] :

$$pH = x_1 + x_2[Mg^{2+}] + \log\left(\frac{\delta_{Pi} - x_3}{x_4 - \delta_{Pi}}\right)$$

Valores otimizados pelo autor :

$$x_1 = 6.706$$

$$x_2 = -0.0307mM^{-1}$$

$$x_3 = 3.245 ppm$$

$$x_4 = 5.778 ppm$$

E a equação sugerida por Petroff *et al.* [4], otimizada nas nossas condições experimentais:

$$pH = \frac{x_1 + \log(\delta_{Pi} - x_2)}{x_3 - \delta_{Pi}}$$

$$x_1 = 6.75$$

$$x_2 = 3.27$$

$$x_3 = 5.89$$

Para o cálculo da $[Mg^{2+}]$, foram utilizados os desvios químicos do α e β -ATP (δ_α , δ_β) e a [PCr] de acordo com as equações de Iotti *et al.* [3]:

$$-\log[Mg^{2+}] = y_0 + \frac{c_1}{c_2 - \exp\left(\frac{\delta_\beta - \delta_0}{d}\right)} + a_1(\delta_\beta - \delta_0) + a_2(\delta_\beta - \delta_0)^2 + b([PCr] - 27)$$

Onde os parâmetros otimizados por ele são:

$$d = D_1 + D_2(pH - 7)^2$$

$$y_0 = 10.43$$

$$c_1 = -25.66$$

$$c_2 = 3.728$$

$$\delta_0 = -15.695 ppm$$

$$a_2 = 0.128 ppm^{-2}$$

$$a_1 = A_1 + A_2(pH - 7)$$

$$b = -0.0050mM^{-1}$$

$$D_1 = 0.105 ppm^{-1}$$

$$D_2 = 0.22 ppm^{-1}$$

$$A_1 = -0.200 ppm^{-1}$$

$$A_2 = -0.26 ppm^{-1}$$

E a de Jung *et al.* [7]:

$$[Mg^{2+}] = K_D^{MgATP} \cdot \left[\left(\frac{\delta_{\alpha\beta} - \delta_{\alpha\beta}^{MgATP}}{\delta_{\alpha\beta}^{ATP} - \delta_{\alpha\beta}^{MgATP}} \right)^{-1} - 1 \right]$$

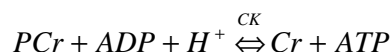
Onde :

$$K_D^{MgATP} = 53 \mu M \text{ (constante de dissociação do MgATP)}$$

$$\delta_{\alpha\beta}^{MgATP} = 8.251 ppm$$

$$\delta_{\alpha\beta}^{ATP} = 10.796 ppm$$

A concentração de ADP foi calculada pela mesma metodologia utilizada por Larson-Meyer *et al.*[5], partindo da equação de equilíbrio da reação de creatina-quinase (CK):



Neste caso a constante de equilíbrio (K_{eq}) pode ser expressa como:

$$K_{eq} = \frac{[ATP] \cdot [Cr]}{[PCr] \cdot [ADP] \cdot [H^+]} \quad \text{Supondo que:} \quad [Cr] + [PCr] = cte \quad \text{e no repouso:} \quad \frac{[Cr]}{[Cr] + [PCr]} = 0.15$$

Obtendo-se:

$$[ADP] = \frac{[ATP]}{K_{eq} \cdot [H^+]} \left(\frac{1}{\frac{PCr}{PCr_0} \cdot 0.85} - 1 \right) \quad \text{Onde:}$$

$$[ATP] = 8mM$$

$$K_{eq} = 1.66 \cdot 10^9 M^{-1}$$

$$[H^+] = 10^{-pH} M$$

No que se refere ao processamento e à quantificação dos dados dos espectros tanto no repouso quanto no pós-exercício, utilizamos o software livre *Java Magnetic Resonance User Interface* (jMRUI v3.0) [8] através do método AMARES [9]. A partir da quantificação foram determinadas as amplitudes dos metabólitos: PCr, Pi, fosfomonoéster (PME), fosfodiéster (PDE), α -ATP, β -ATP e γ -ATP. Determinamos também os parâmetros indiretos: pH intracelular, $[Mg^{2+}]$ e $[ADP]$. Para avaliar a estabilidade foi utilizado o coeficiente de variação (CV) definido como o desvio padrão dividido pelo valor médio expressado em porcentagem.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das quantificações do primeiro voluntário, para definir o protocolo de aquisições, apresentaram as mesmas relações metabólicas, em média. Foi verificada a estabilidade das razões metabólicas do espectro do músculo da panturrilha pela ^{31}P -MRS com as mudanças no tempo de repetição e no número de aquisições como mostra a Tabela 1.

Tabela 1: Razões dos principais metabólitos em relação ao fosfato inorgânico (Pi), e seus respectivos coeficientes de variação (CV), detectáveis por ^{31}P -MRS no músculo da panturrilha de um voluntário sadio em repouso.

Metabólitos	Razão	CV (%)
Alfa-ATP / Pi	4,86 ± 0,08	1,65
Beta-ATP / Pi	2,55 ± 0,08	3,14
Gama-ATP / Pi	2,36 ± 0,04	1,69
PCr / Pi	7,87 ± 0,10	1,27

As estimativas dos parâmetros indiretos com as diferentes metodologias testadas são citadas na Tabela 2.

O valor médio do pH determinado pela formulação de Iotti *et al.* e pela mais simples (Petroff *et al.*), usando os coeficientes aqui estimados, foram ambos 6,96. Porém, o coeficiente de variação por Iotti *et al.* (CV=0,33%) foi menor, podendo considerar suas medidas mais estáveis. Referente à $[Mg^{2+}]$, ambos os métodos apresentaram valores estatisticamente diferentes ($p=5,52 \cdot 10^{-4}$), todavia, as medidas por Jung *et al.* (0,148±0,011mM) foram ligeiramente mais estáveis que por Iotti *et al.* (0,188±0,024mM). A $[ADP]$ por Larson-Meyer *et al.* foi calculada utilizando primeiramente o pH através de Iotti *et al.* e, em seguida, o pH por Petroff *et al.* As duas formas apresentaram valores médios aceitáveis (7,81 e 9,70 μ M), de acordo com a literatura (8,8 μ M) [5]. Porém, a utilização da medida por Petroff *et al.* é totalmente inadequada devido ao seu elevado coeficiente de variação (CV=68,37%).

Tabela 2: Valores dos parâmetros indiretos quantificáveis, em diversas metodologias, pela ^{31}P -MRS no músculo da panturrilha dos 7 voluntários sadios em repouso.

Parâmetros indiretos	Voluntários							Média	CV(%)
	1	2	3	4	5	6	7		
pH (Iotti et al.)	7,01	6,97	6,96	6,94	6,95	6,97	6,94	6,96	0,33
pH (Petroff et al.)	6,94	7,42	6,95	7,00	6,66	6,53	7,21	6,96	4,24
[Mg ²⁺] (mM) (Iotti et al.)	0,179	0,150	0,199	0,229	0,190	0,187	0,179	0,188	12,692
[Mg ²⁺] (mM) (Jung et al.)	0,136	0,142	0,153	0,170	0,151	0,143	0,143	0,148	7,383
[ADP] (µM) (Larson-Meyer et al.) c/ pH de Iotti et al.	8,61	7,92	7,83	7,35	7,65	7,94	7,41	7,81	5,38
[ADP] (µM) (Larson-Meyer et al.) c/ pH de Petroff et al.	7,54	22,40	7,82	9,04	4,03	3,10	13,98	9,70	68,37

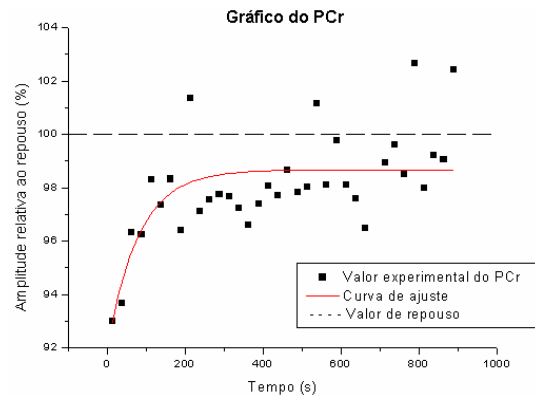
A avaliação da estabilidade metabólica, quantificada neste trabalho, em condições de repouso é mostrada na Tabela 3.

Tabela 3: Amplitudes do PCr e do Pi com seus respectivos coeficientes de variação (CV) expressos em porcentagem após a quantificação dos espectros da panturrilha dos voluntários sadios em repouso através da ^{31}P -MRS

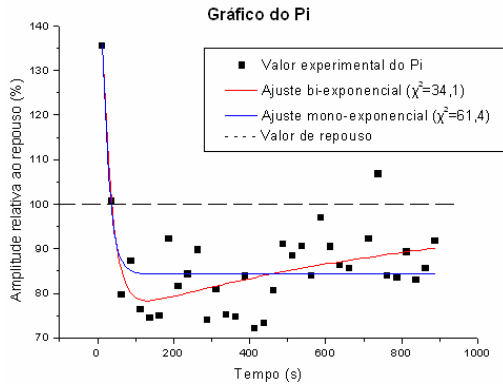
Voluntário (Idade)	PCr	CV PCr	Pi	CV Pi
1(24)	244,22	0,30	29,84	5,29
2(49)	314,44	1,58	53,71	7,61
3(30)	259,26	1,57	29,12	6,38
4 (19)	177,54	1,77	*	*
5 (21)	240,12	0,82	30,8	5,03
6(27)	284,84	2,78	37,10	4,45
7(28)	220,45	1,01	20,09	3,22

*O valor do Pi do voluntário 4 esteve abaixo da sensibilidade do método de quantificação e assim seu erro foi muito elevado.

Os gráficos seguintes (Figuras 3 e 4) representam o comportamento dinâmico de recuperação pós-exercício de quatro dos diferentes parâmetros avaliados num dos controles a modo de exemplo, sendo indicado na Figura 3 o tipo de função matemática mais adequada para a descrição do processo. Na Tabela 4 são apresentadas as constantes de tempo que caracterizam estas recuperações.



$$PCr(t) = PCr_i \cdot e^{-t/\tau_1} + PCr_0(1 - e^{-t/\tau_1})$$



$$Pi(t) = Pi_i - Pi_1(1 - e^{-t/\tau_2}) + Pi_2(1 - e^{-t/\tau_3}) \quad Pi_0 = Pi_i - Pi_1 + Pi_2$$

Figura 3: Curvas de recuperação, pós-exercício, do PCr e do Pi na panturrilha de um voluntário sadio (Voluntário 2), através da ^{31}P -MRS. As curvas contínuas representam o ajuste às funções descritas abaixo do gráfico.

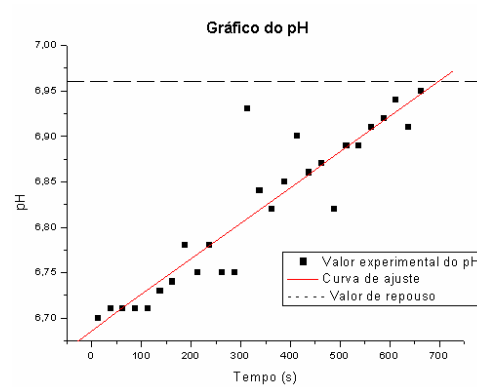
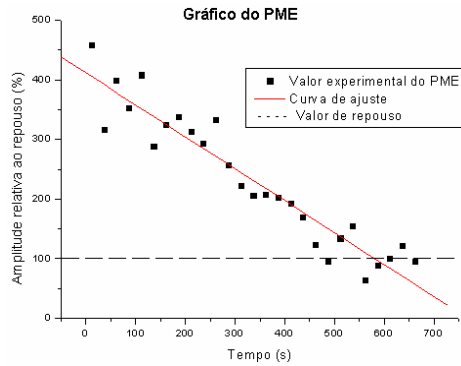


Figura 4: Curvas de recuperação, pós-exercício, dos níveis de PME e do pH na panturrilha de um voluntário sadio (Voluntário 3), através da ^{31}P -MRS. As linhas contínuas representam os ajustes a comportamentos lineares.

Tabela 4: Constantes de tempo do PCr (τ_1) e do Pi (τ_2 e τ_3), PME e pH após a quantificação e ajustes dos dados aos comportamentos matemáticos esperados da panturrilha de voluntários sadios no pós-exercício através da ^{31}P -MRS.

Voluntário (Idade)	τ_1 (s)	τ_2 (s)	τ_3 (s)	$\Delta PME/\Delta t$	$\Delta pH/\Delta t$
1(24)	73,23	144,08	500	-0,024	2,18E-05
2(49)	80,03	26,18	900	-0,024	2,71E-05
3(30)	41,19	35,17	2000	-0,535	3,93E-04
6(27)	94,37	21,21	750	-0,179	2,06E-04
7(28)	98,00	16,25	1300	-0,045	—

*Nos dois voluntários (4 e 5) estudados, mas não mostrados na tabela, foi detectava uma baixa carga de exercício.

O nível de ATP foi constante nos três picos durante o pós-exercício, diferindo no máximo 10 % em relação ao valor de repouso. O PCr foi o metabólito mais estável ($CV < 3\%$), em repouso, e no pós-exercício houve uma redução inicial e uma posterior recuperação na forma de uma exponencial. Embora a estimativa da amplitude do PME tenha demonstrado uma maior dificuldade ($CV < 25\%$), foi observado um comportamento aproximadamente linear ainda a ser

explicado. Não foi observada uma variação significativa do pH entre os voluntários em repouso ($\text{pH}=6,97\pm 0,02$), mas foi detectada uma recuperação linear pós-exercício. Acreditamos que a $[\text{Mg}^{2+}]$ em repouso possa ter uma relação inversamente proporcional com a idade, mas não foi possível detectar um comportamento temporal pós-exercício definido.

O menor tempo de recuperação do PCr (τ_1) coincidiu com o voluntário com melhor condicionamento físico, sugerindo seu uso como bom indicador da funcionalidade mitocondrial [2]. Foi detectado um comportamento bi-exponencial do Pi sugerindo duas fases de recuperação, na primeira existe um forte e rápido consumo de Pi (τ_2) e posteriormente uma lenta recuperação (τ_3).

4. CONCLUSÃO

No que diz respeito ao pH, a metodologia de Iotti *et al.* foi mais estável. O pH por Petroff *et al.*, apesar de ter o mesmo valor em média que Iotti *et al.*, apresentou uma instabilidade que causou um erro elevado na estimativa da [ADP]. Ambas as metodologias utilizadas por Iotti *et al.* e Jung *et al.* para calcular a $[\text{Mg}^{2+}]$ se apresentaram estáveis, porém com valores estatisticamente diferentes. A equação proposta por Larson-Meyer *et al.* para o cálculo da concentração de ADP foi válida apenas utilizando os valores de pH calculados através de Iotti *et al.*, onde é considerada a concentração de magnésio livre. Foi reproduzido com êxito o comportamento esperado para o PCr, Pi e pH, no pós-exercício, porém a $[\text{Mg}^{2+}]$ não apresentou uma variação significativa. A dinâmica pós-exercício dos metabólitos apresentou diferentes comportamentos matemáticos com diversas constantes de tempo na fase pós-exercício. Foi detectada uma variação linear no PME, não reportada na literatura consultada. A constante de recuperação do PCr (τ_1) está aparentemente relacionada com o condicionamento físico do indivíduo.

5. AGRADECIMENTOS

À Tec. Luciana Mijoler Cunha pelo apoio técnico na realização dos exames de MRS. C.E.G. Salmon agradece ao programa PAIRD da Universidade Federal de Sergipe (UFS) pelo auxílio financeiro parcial de materiais para a elaboração deste trabalho.

-
1. PROMPERS, J. J. *et al.*, Dynamic MRS and MRI of skeletal muscle function and biomechanics, *NMR Biomed.* 19:927-953 (2006).
 2. PIPINOS, I.I. *et al.* Phosphorus 31 nuclear magnetic resonance spectroscopy suggests a mitochondrial defect in claudicating skeletal muscle. *J Vasc Surg.* 31:944-952 (2000).
 3. IOTTI, S. *et al.*, In vivo ^{31}P -MRS assessment of cytosolic $[\text{Mg}^{2+}]$ in the human skeletal muscle in different metabolic conditions. *Magn. Reson. Imag.* 18:607-614 (2000).
 4. PETROFF, O. A.; PRICHARD, J. W.; BEHAR, K. L.; ALGER, J. R.; den HOLLANDER, J. A.; SHULMAN R. G. Cerebral intracellular pH by ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Neurology.* 35:781-788 (1985).
 5. LARSON-MEYER, D. E. *et al.*, ^{31}P MRS measurement of mitochondrial function in skeletal muscle: reliability, force-level sensitivity and relation to whole body maximal oxygen uptake. *NMR Biomed.* 13:14-27 (2000).
 6. SCHOCKE, M. F. H. *et al.*, High-energy phosphate metabolism during incremental calf exercise in humans measured by 31 phosphorus magnetic resonance spectroscopy (31P MRS). *Magn. Reson. Imag.* 22:109-115 (2004).
 7. JUNG, W. *et al.*, Phosphorous J Coupling Constants of ATP in Human Myocardium and Calf Muscle. *J. Magn. Reson. Series B*, 110:39-46 (1996).
 8. Disponível em: <http://www.jmru.uab.es/>
 9. VANHAMME, L; van den BOOGAART, A; van HUFFEL, S. Improved method for accurate and efficient quantification of MRS data with use of prior knowledge. *J. Magn. Reson.* 129:35-43 (1997).