

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

FLÁVIA MAYUMI ODAHARA DE ABREU

**Avaliação do efeito dos protocolos de aquisição de imagens por Ressonância Magnética para
determinação da extensão de lesão em modelos animais de hemorragia cerebral**

São Carlos
2019

FLÁVIA MAYUMI ODAHARA DE ABREU

Avaliação do efeito dos protocolos de aquisição de imagens por Ressonância Magnética para determinação da extensão de lesão em modelos animais de hemorragia cerebral

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Programa de Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Bacharel em Física Biomolecular.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Fernandes Paiva

São Carlos - SP
2019

RESUMO

O método de imagens por Ressonância Magnética apresenta alta eficiência clínica na detecção, diagnóstico e avaliação de diferentes patologias. O mesmo ocorre em sistemas pré-clínicos, para avaliação de patologias em modelos animais. Nesse caso, entretanto, a qualidade dessa avaliação depende, entre outras coisas, da otimização dos protocolos de aquisição e processamento das imagens, uma vez que diferentes modelos resultam em danos distintos nos tecidos de interesse. Assim, o presente projeto prevê a avaliação de diferentes protocolos de aquisição de imagens por Ressonância Magnética para determinação da extensão de lesões em modelos animais de hemorragia cerebral. Nesse estudo retrospectivo, foram avaliadas imagens do cérebro de ratos obtidas em um sistema de 2T dedicado ao estudo de pequenos animais. O protocolo de imagens incluiu três aquisições 3D ponderadas por T1, T2 e T2*, respectivamente. As imagens foram salvas em formato NIFTI e avaliadas utilizando os softwares MIPAV e MRICro. As lesões foram delimitadas pela aluna, após treinamento, e os respectivos volumes, em mm^3 , foram calculados multiplicando o número de voxels contido na lesão pela resolução espacial volumétrica da imagem. A diferença entre os protocolos analisados foram acessadas estatisticamente. A lesão induzida foi caracterizada como sólida e pôde ser melhor analisada pelas aquisições ponderadas por T1, visto que apresentou limites mais definidos e maior diferença de contraste. Os volumes médios obtidos são, em ordem decrescente, relativos às sequências obtidas por T1 ($3,3 \pm 1,5$) mm^3 , T2* ($2,2 \pm 1,3$) mm^3 e T2 ($1,1 \pm 0,7$) mm^3 , com diferenças significativas. As extensões das lesões estão bem distribuídas ao longo da média. Como imagens ponderadas por T2* são mais propensas a distorções, foi concluído que, para o modelo de hemorragia cerebral, é recomendada a realização das análises por T1 ou por uma combinação de T1 e T2, os quais são menos suscetíveis a deformações de imagem.

Palavras-chave: Ressonância Magnética; Imagens; Volumetria

1. INTRODUÇÃO

A tecnologia de imageamento por Ressonância Magnética (IRM, ou MRI na sigla em inglês: Magnetic Resonance Imaging) permite a análise e o diagnóstico de diversas condições de saúde, mostrando com definição estruturas anatômicas e indicando fluxo sanguíneo. O método tem as vantagens de apresentar imagens nítidas, sem expor pacientes a radiação ionizante como nas obtidas por tomografia computadorizada e exames de raios-X, bem como capacidade de produzir imagens em mais planos para a reconstrução de estruturas em três dimensões. Além disso, também pode revelar regiões de inchaço e inflamação e os agentes de contraste utilizados na técnica apresentam menor risco de reação alérgica.

O funcionamento da IRM baseia-se nos princípios de ressonância magnética nuclear (RMN) aplicada aos átomos de hidrogênio que compõem os tecidos (figura 1). Quando sob um campo magnético constante, a aplicação de um pulso de radiofrequência (RF, campo magnético de curta duração) provoca uma redução na magnetização longitudinal do tecido, estabelecendo uma magnetização transversal e, em seguida, o retorno ao estado de equilíbrio através de diferentes mecanismos de relaxação por trocas de energia entre os spins (do átomo de hidrogênio) e entre os spins e sua vizinhança (interação spin-spin - T2 - e spin-rede - T1, respectivamente), gerando, assim, um sinal utilizado para a configuração das imagens^[1,2].

Estas podem apresentar contraste e características diferentes para uma mesma amostra, dependendo de sua ponderação (T1, T2 ou T2*) e dos parâmetros da sequência utilizada (tempos de repetição e tempo ao eco)^[3] - dessa forma, a natureza de uma lesão específica pode ser mais evidente em um tipo de imagem, podendo afetar a identificação e a delimitação do ferimento.

Chama-se hemorragia intracerebral o sangramento de um vaso sanguíneo no tecido cerebral que pode ocorrer devido a aneurismas, casos de malformação arteriovenosa, traumatismo, tumores cerebrais, entre outros, e tem como fatores de risco a hipertensão, diabetes, colesterol alto, obesidade, tabagismo, alcoolismo, estresse e idade avançada^[4]. A condição pode ser tratada por medidas de suporte básico, controle da pressão arterial e drenagem cirúrgica (dependendo do tipo de hemorragia)^[5]. É imprescindível o diagnóstico por exame de imagem em alta definição.

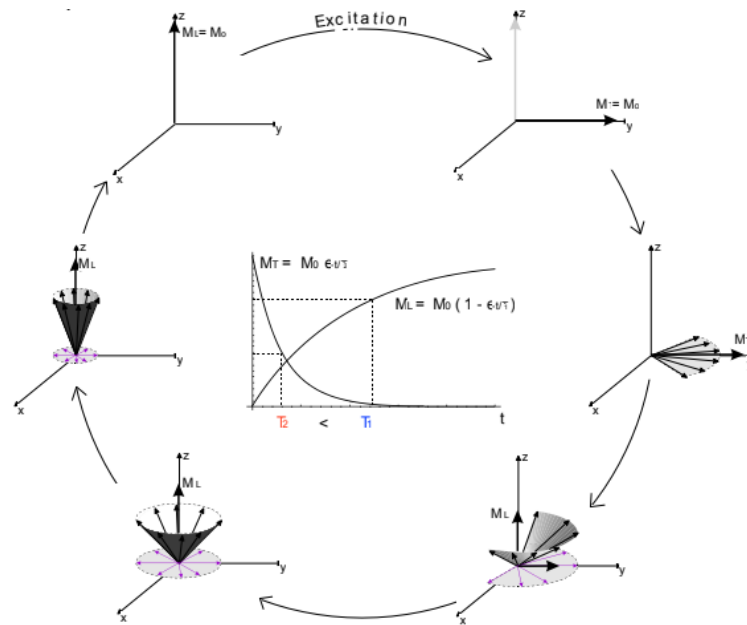


Figura 1 - Física da RMN: comportamento dos momentos magnéticos dos núcleos no processo de relaxação, associado às magnetizações longitudinal (M_L) e transversal (M_T), após um pulso de excitação (90°). Adaptado de [2].

A hemorragia cerebral pode ser estudada em modelos animais através da indução por colagenase^[6,7]. Nesse caso, a injeção da substância também provoca dano mecânico no tecido e, portanto, para a identificação da lesão de interesse e determinação correta de sua extensão, é necessária a otimização da aquisição e do processamento das imagens.

Desse modo, este projeto propõe um estudo comparativo entre diferentes tipos de aquisição por MRI (ponderações por T1, T2 e T2*) usadas na identificação e caracterização de lesões de hemorragia intracerebral em modelo animal (ratos).

2. METODOLOGIA

2.1. Indução da lesão

Os 27 ratos foram submetidos a um modelo de indução espontânea de hemorragia intracerebral utilizando colagenase^[6,7]. A lesão foi induzida através da injeção local de colagenase de bactéria na região do corpo estriado esquerdo (3 mm lateral à linha média, 0.2 mm posterior ao bregma, 6 mm abaixo da superfície do crânio). No dia 22 após a indução de hemorragia, os animais foram perfundidos e suas cabeças mantidas até a aquisição das imagens.

2.2. MRI

Para a obtenção das imagens de RM, foi utilizado um magneto supercondutor horizontal com campo de 2T da Oxford Instruments, modelo 8510HR, que opera em conjunto com um espectrômetro Bruker Avance III (Bruker-BioSpin, Inc., Billerica, MA, EUA). Para a aquisição das imagens, utilizou-se uma bobina tipo solenóide desenvolvida localmente para transmissão e recepção. Imagens ponderadas por T1, T2 e T2* foram adquiridas utilizando sequências 3D com os mesmos parâmetros geométricos: FOV = 32 x 32 x 32 mm com uma matriz de 128 x 128 x 128, resultando em uma resolução espacial isotrópica de 250 μ m. Imagens ponderadas por T1 foram adquiridas com uma sequência gradiente eco (GRE) com os seguintes parâmetros: TE / TR = 15 / 3.5ms, ângulo de flip = 30 graus, largura de banda = 15kHz. Imagens ponderadas por T2 foram adquiridas com uma sequência PSIF com os seguintes parâmetros: TR / TE: 24 / 7 ms, ângulo de flip = 60 graus e largura de banda = 15kHz. Finalmente, as imagens ponderadas por T2* foram adquiridas com uma sequência gradiente eco (GRE) com os seguintes parâmetros: TE / TR = 20 / 10.5ms, ângulo de flip = 5 graus e largura de banda = 15kHz.

2.3. Análise

O volume da lesão foi calculado utilizando o software Medical Image Processing, Analysis, and Visualization application (MIPAV 8.0.2; National Institute of Health) utilizando regiões de interesse (ROIs) definidas corte a corte: a seleção das ROIs permite a determinação do número de voxels (NV) de uma lesão. O volume da mesma pode ser calculado como o produto de NV com a resolução espacial volumétrica de uma imagem.

Nas imagens onde não foi detectada lesão induzida pela colagenase, considerou-se o volume igual a zero. Nos casos em que a lesão encontrava-se difusa ou em que não foi possível sua delimitação, o dado foi desconsiderado nas próximas etapas.

Os volumes obtidos nos diferentes conjuntos de dados (T1, T2 e T2*) foram submetidos a testes T pareados (sendo descartados, para isso, os conjuntos que continham algum volume indeterminado). Também calcularam-se os valores médios e desvios-padrão (desconsiderando-se os dados de volume zero e os indeterminados), e as diferenças entre os volumes das lesões de cada animal por diferentes métodos foram dispostas em gráficos de barras.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 2 abaixo mostra um corte do cérebro de um animal mapeado pelos 3 diferentes protocolos de aquisição. Em seguida, na imagem 3, é possível observar a lesão pelas diferentes ponderações para um mesmo corte, e a figura 4 apresenta as ROIs utilizadas na delimitação das lesões para as diferentes aquisições. Nas três imagens, os cortes são mostrados em T1, T2 e T2*, respectivamente. Notam-se as diferenças de contraste entre as imagens, dependentes do tipo de sequência utilizada; T1 vem da interação spin-rede, e T2, de spin-spin, enquanto T2* considera inhomogeneidades no campo, podendo, assim, apresentar distorções mais acentuadas, como aparece na figura 2 abaixo.

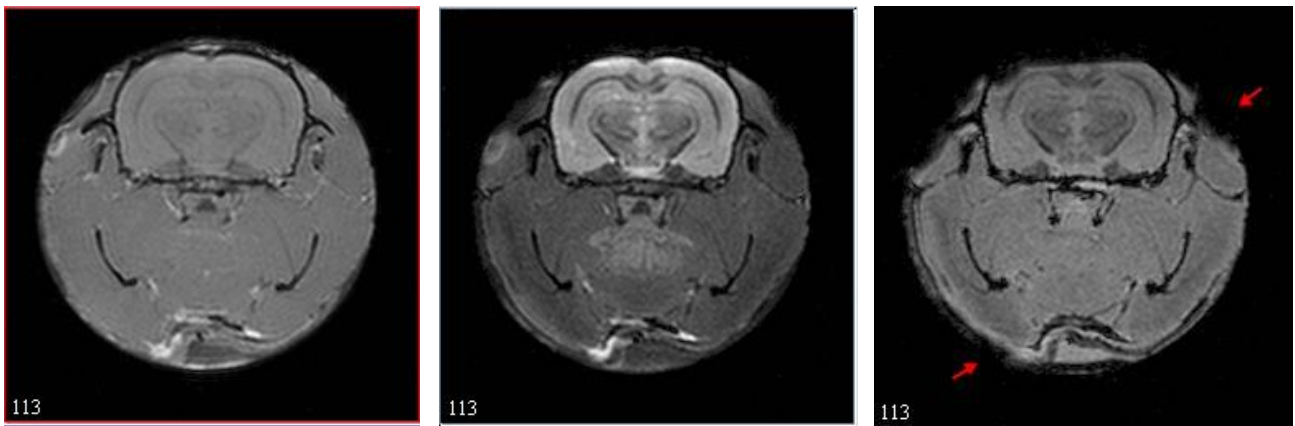


Figura 2 - Comparação do corte 113 do animal 1, obtido por T1, T2 e T2*. Em T2*, as setas indicam distorções devidas às inhomogeneidades do campo. Fonte: elaborado pela autora.



Figura 3 - Comparação do corte 123 do animal 1, evidenciando a lesão induzida, obtido por T1, T2 e T2*. Fonte: elaborado pela autora.

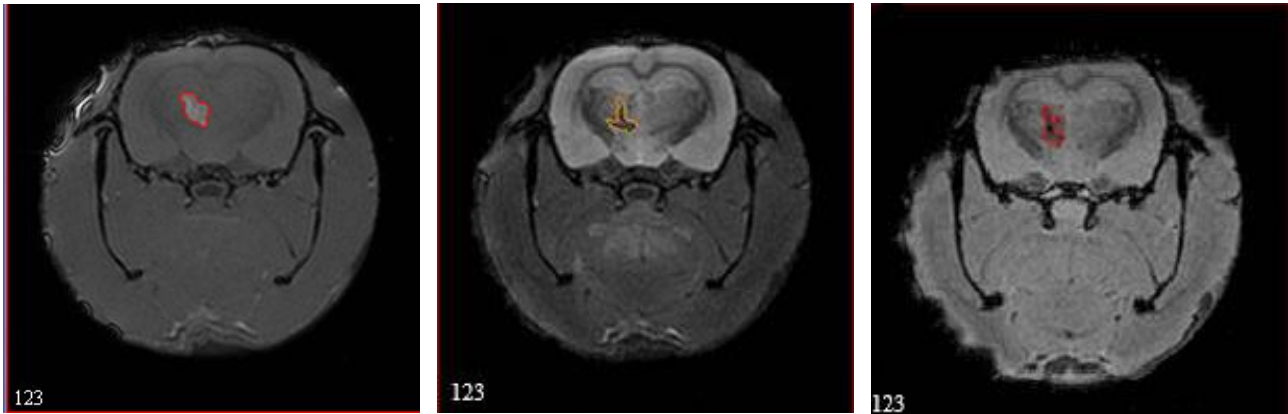


Figura 4 - Comparação do corte 123 do animal 1, obtido por T1, T2 e T2*, com as ROIs utilizadas para delimitar a lesão induzida. Fonte: elaborado pela autora.

Dos 27 animais considerados, não foram detectadas lesões nas imagens T1 para os ratos 11 e 14, tendo estas, portanto, volume $V = 0 \text{ mm}^3$. Em T2, o volume foi identificado como zero para os animais 5, 6 e 19 e em T2*, para 5 e 11.

Para as aquisições por T1, todas as lesões foram delimitadas. No entanto, não foi possível determinar as extensões das lesões em 2, 13, 18, 20 e 26 (T2); 6, 13 e 23 (T2*). Conforme mostrado na figura 5, nesses casos, os limites das lesões devidas à collagenase confundem-se com os danos da agulha no tecido ou estão mal definidos e com pouca diferença de contraste. Assim, esses dados foram desconsiderados posteriormente na realização do teste t.

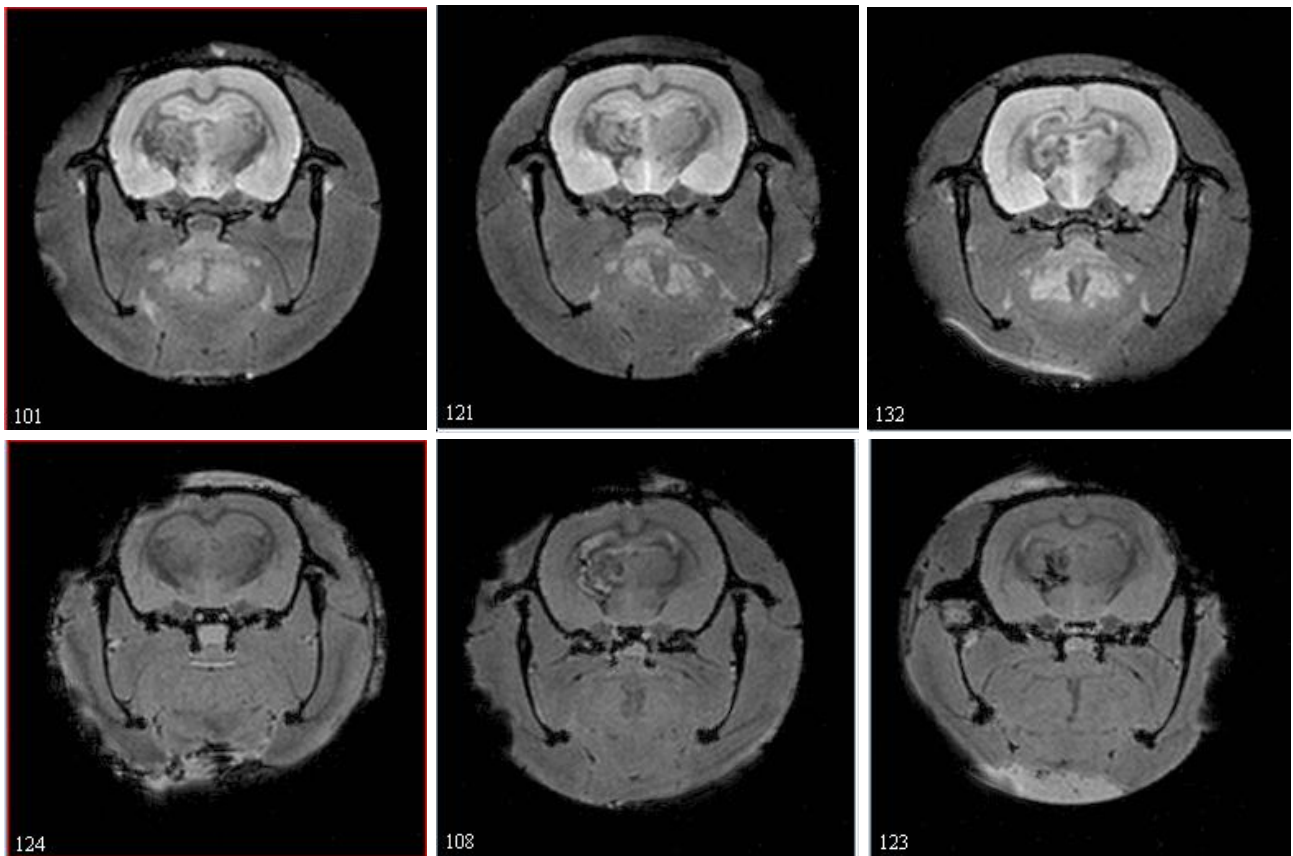


Figura 5 - Exemplos de lesões não delimitadas; na primeira linha, imagens em T2 e, na segunda, em T2*, para diferentes animais. Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 1 - Tempos de relaxação T1 e T2 aproximados para alguns tecidos do corpo humano a 1,5 T. Adaptado de [1].

Tecido	T1 (ms)	T2 (ms)
Substância branca	790	90
Substância cinzenta	920	100
Líquido céfalo-raquidiano (líquor)	4000	2000
Sangue (arterial)	1200	50
Parênquima hepático	490	40
Miocárdio	870	60
Músculo	870	50
Lipídios (gordura)	260	80

Para substâncias e tipos de tecido distintos, os tempos de relaxação T1 e T2 têm uma diferença notável, o que, em combinação com os diferentes parâmetros utilizados na aquisição das imagens, gera contraste entre diferentes tipos de tecidos e entre tecidos normais e patológicos. A tabela 1 mostra os tempos de relaxação para alguns tecidos humanos.

Em imagens ponderadas por T1, quanto maior o T1 de uma substância, menor é o sinal; para T1 curto, ele é maior - assim, meios com maior quantidade de água (que têm T1 mais longo), como

o líquido, mostram-se mais escuros, enquanto massas sólidas aparecem mais brilhantes. No caso de T2 e T2* (com a diferença de que este último considera inomogeneidades do campo que causam defasagem dos momentos magnéticos), para tempo de relaxação curto, o sinal obtido é mais baixo e, para tempo longo, é maior; desse modo, ao contrário de imagens T1, estas são menos brilhantes para massas sólidas, gordura ou sangue, por exemplo, e mais brilhantes para meios mais aquosos^[1,2].

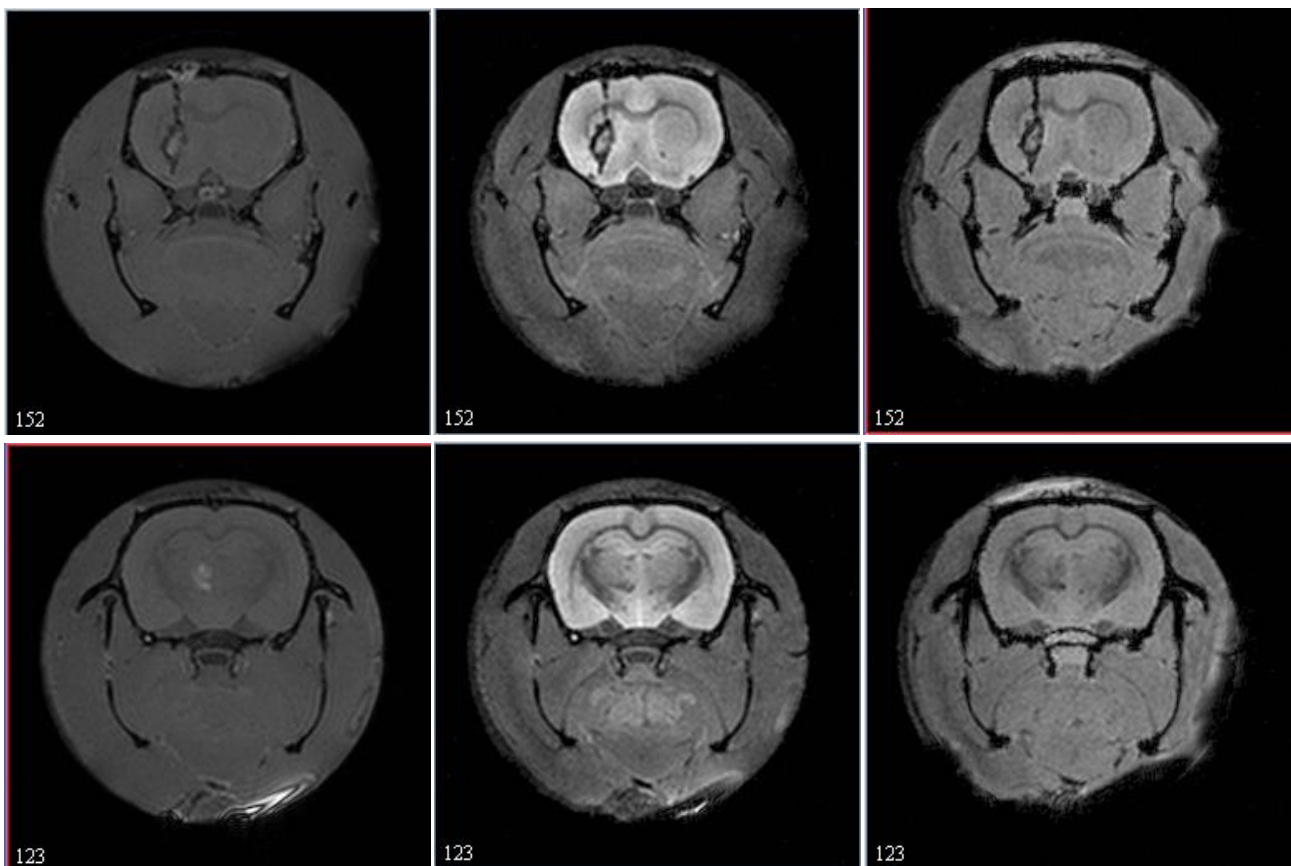


Figura 6 - Lesão mecânica no corte 152 do animal 3 (primeira linha), em comparação com a lesão induzida por collagenase no corte 123 do mesmo animal (segunda linha). Da esquerda para a direita, as imagens são ponderadas por T1, T2 e T2*. Fonte: elaborado pela autora.

Diferente da lesão mecânica (figura 6), criada pela injeção de collagenase por uma agulha, induzindo uma degeneração do tecido e aparecendo com menor sinal (mais escura) em todas as imagens, o dano induzido não aparece hipointenso em todas as sequências - em T1, as lesões em todos os animais aparecem mais brilhantes do que o tecido saudável ao redor, enquanto para os protocolos T2 e T2*, aparecem mais escuras. Portanto, o dano induzido pela collagenase pode ser caracterizado: as aquisições indicam que a lesão induzida não se trata de degeneração do tecido, é sólida e, em geral, não há sinais de acúmulo de líquido em seu entorno para os animais.

Em geral, as imagens ponderadas por T1 permitiram melhor visualização e delimitação da extensão das lesões - diferentemente dos outros conjuntos de aquisições, em T1 estão mais definidas, menos difusas, e com maior contraste -, seguidas pelas imagens em T2* e, por fim, as obtidas por T2 foram as que mais apresentaram-se difusas, dificultando a identificação dos limites dos ferimentos.

O volume médio medido para T1 é $3,3 \text{ mm}^3$, com intervalo $(0,5 - 6,1) \text{ mm}^3$ e desvio padrão de $1,5 \text{ mm}^3$. As imagens por T2* têm média $2,2 (0,3 - 5,7) \text{ mm}^3$ e desvio padrão de $1,3 \text{ mm}^3$. Para T2, a média é $1,1 (0,3 - 2,7) \text{ mm}^3$, com desvio igual a $0,7 \text{ mm}^3$.

Os histogramas das figuras 7, 8 e 9 relacionam-se aos valores obtidos de desvio padrão, que são altos porque os volumes estão espalhados em um intervalo grande, com variações de até mais de 6 mm^3 . Assim, o valor dos desvios não é um problema, uma vez que, apesar de induzidas do mesmo modo, as lesões têm extensão determinada pela fisiologia do animal. No entanto, faz-se o cálculo das diferenças entre os volumes obtidos por diferentes ponderações.

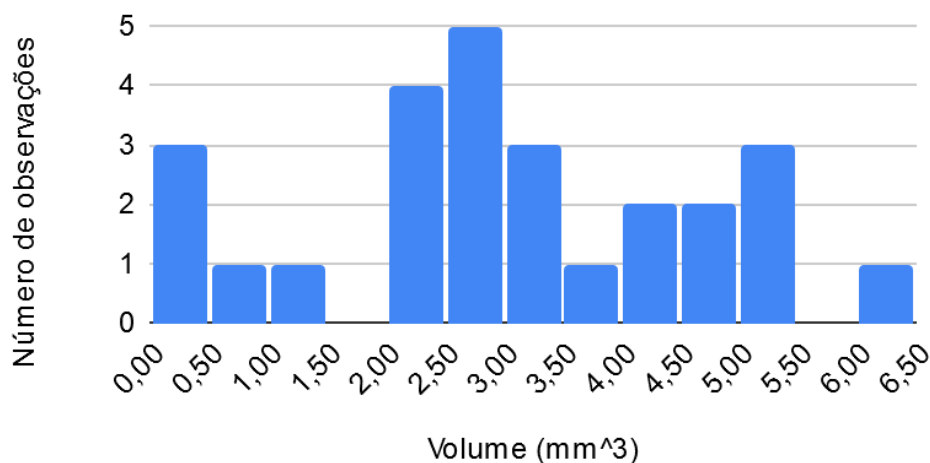


Figura 7 - Histograma dos volumes observados em T1. Fonte: elaborado pela autora.

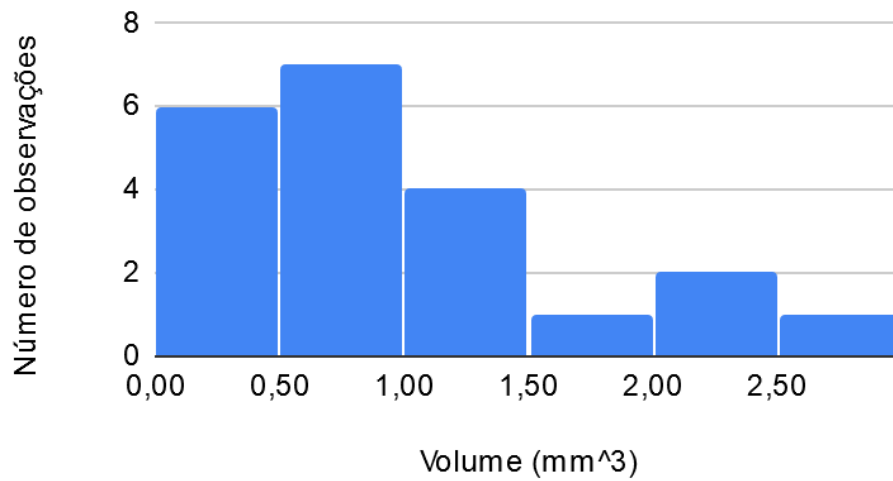


Figura 8 - Histograma dos volumes observados em T2. Fonte: elaborado pela autora.

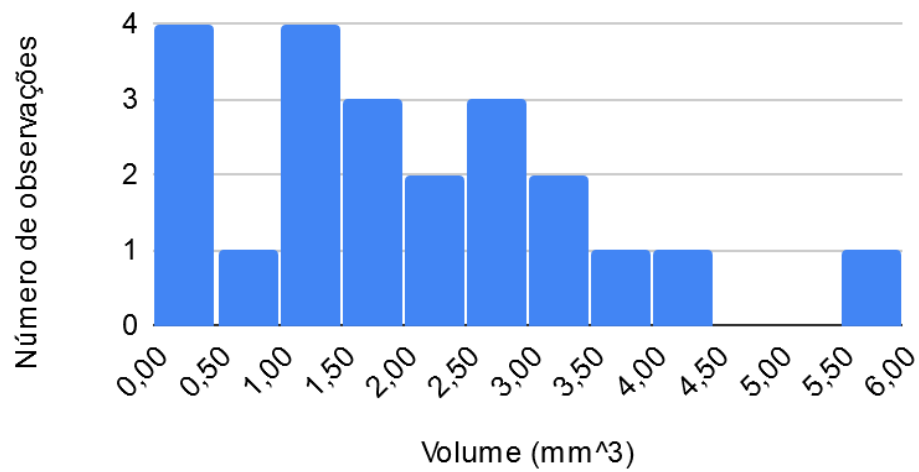


Figura 9 - Histograma dos volumes observados em T2*. Fonte: elaborado pela autora.

Nas figuras 10, 11 e 12 a seguir, estão representadas tais diferenças (T1-T2, T1-T2* e T2*-T2) para os animais, desconsiderando-se os dados de valores indeterminados.

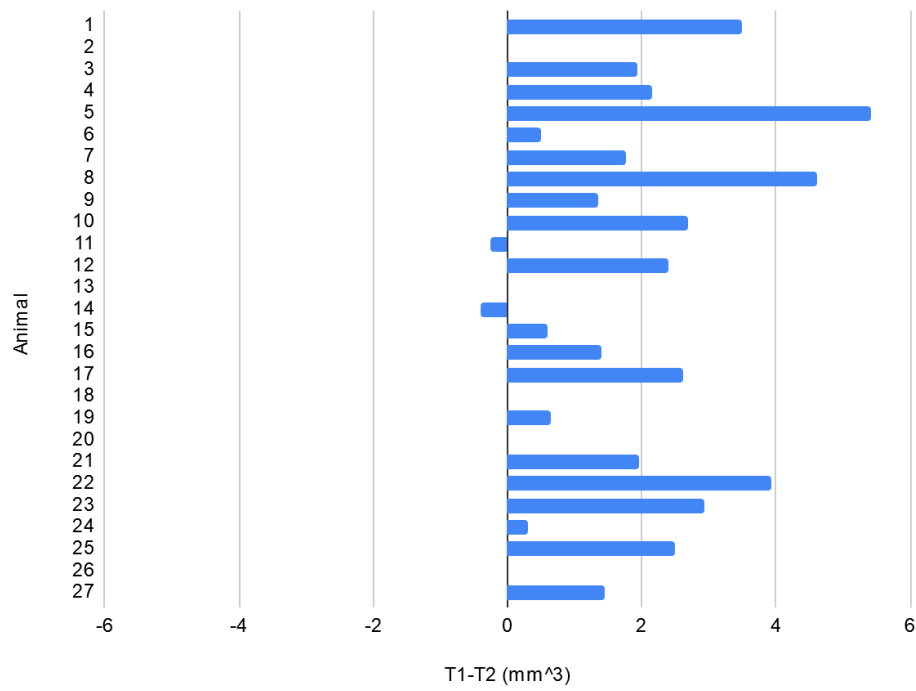


Figura 10 - Diferença entre os volumes por T1 e T2 para as lesões nos diferentes animais. Fonte: elaborado pela autora.

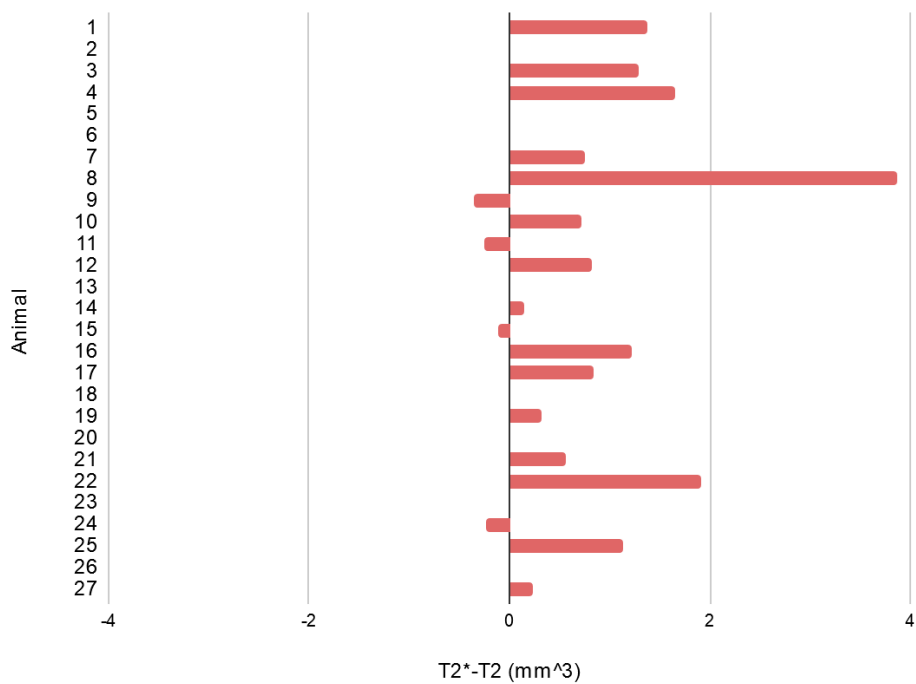


Figura 11 - Diferença entre os volumes por T2* e T2 para as lesões nos diferentes animais. Fonte: elaborado pela autora.

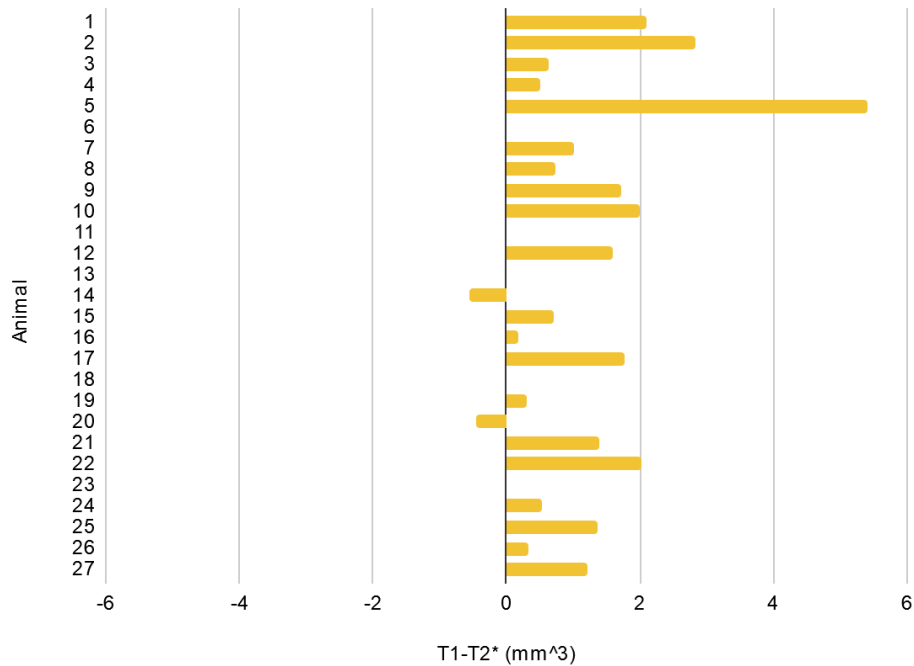


Figura 12 - Diferença entre os volumes por T1 e T2* para as lesões nos diferentes animais. Fonte: elaborado pela autora.

Os gráficos apresentados confirmam que os tamanhos médios das lesões são, de modo geral, maior em T1, médio em T2* menor em T2: em T1-T2, os únicos valores negativos são relativos aos animais 11 e 14, onde o volume (T1) é zero. Portanto, todos os volumes de lesões em T1 mostraram-se maiores que os obtidos por T2. Na diferença T2*-T2, as lesões dos animais 9, 11, 15 e 24 são menores quando vistas em T2*; no restante dos casos, as imagens por T2* apontam que os danos são maiores do que as por T2. Por fim, na análise de T1-T2*, apenas os animais 14 e 20 possuem lesões maiores se observadas por T2*, retornando valores negativos. Desse modo, via de regra, os volumes medidos em T1 são maiores do que os medidos em T2*.

Testes estatísticos são processos que, através dos dados de um experimento, determinam se uma afirmação sobre os parâmetros das amostras (hipótese) é ou não verdadeira. Dentre eles, o teste t é usado quando a estatística de teste segue uma distribuição t de Student, e pode ser feito para comparar duas amostras pareadas, duas amostras independentes ou comparar uma amostra com uma população. Têm-se como resultados o p-valor e a estatística de teste.

Assim, o teste t pareado foi utilizado aqui como forma de avaliar se a distribuição dos volumes obtidos pelos diferentes protocolos de aquisição de imagens é ou não significativamente diferente. O resultado é disposto abaixo, na figura 13.

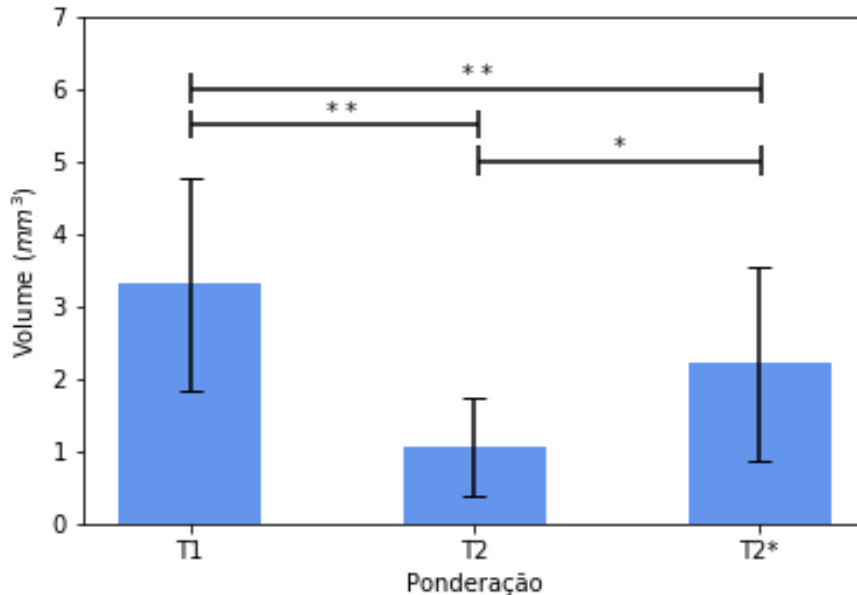


Figura 13 - Valores de volume medido e desvio padrão para cada ponderação. * representa $p < 0,05$; **, $p < 0,001$.
Fonte: elaborado pela autora.

Os volumes medidos nas imagens por T1, $(3,3 \pm 1,5)\text{mm}^3$, foram estatisticamente maiores do que nas medidas feitas usando a ponderação T2 $(1,1 \pm 0,7)\text{mm}^3$, $p < 0,001$. Em comparação a T2*, com $(2,2 \pm 1,3)\text{mm}^3$, os volumes de T1 também têm valores significativamente mais altos ($p < 0,001$). Entre T2 e T2*, as medições são estatisticamente maiores para T2*, $p < 0,05$. Portanto, a diferença entre as médias é significativa para os três casos, sendo possível concluir que a análise da lesão induzida pela collagenase pelos diferentes métodos não é equivalente.

Todas as sequências utilizadas são gradiente eco (GRE), estando, portanto, sujeitas a distorções. Porém, as imagens ponderadas por T1 e por T2 são menos suscetíveis a artefatos que comprometam sua qualidade. Assim, a morfologia das lesões provavelmente está mais preservada em T1 e T2 e os valores medidos por estas sequências são mais confiáveis.

Com base nos dados apresentados e discutidos, a sequência T1 é a melhor para a análise de lesões induzidas por colagenase. Nela, os limites das lesões são mais bem definidos e têm maior diferença de contraste, permitindo medir o volume de maneira mais apropriada.

4. CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que a lesão induzida por colagenase nos animais é sólida e não apresenta edema. Os protocolos de aquisição das imagens mostraram que a sequência T1 foi a melhor para analisar as lesões de interesse, uma vez que apresenta limites mais definidos e maior contraste do que as outras. Os volumes médios obtidos são, em ordem decrescente, relativos às ponderações em T1 ($3,3 \pm 1,5$) mm³, T2* ($2,2 \pm 1,3$) mm³ e T2 ($1,1 \pm 0,7$) mm³ e a estatística aponta que são significativamente diferentes. Os altos valores de desvio padrão mostram que a extensão da lesão não é aproximadamente constante entre os animais, afinal, depende de suas características fisiológicas. Imagens obtidas por T2* são mais suscetíveis a alterações no campo magnético, o que significa que, para este tipo de lesão, é melhor realizar as análises por T1 ou por uma combinação de T1 e T2, uma vez que apresentam menos distorções.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] MAZZOLA, Alessandro A. Ressonância Magnética: Princípios de Formação de Imagem e Aplicações em Imagem Funcional. **Revista Brasileira de Física Médica**, São Paulo, v. 3., n. 1, p. 117-129, mar. 2009.
- [2] POOLEY, Robert A.. Fundamental Physics of MR Imaging. **Radiographics**, [s.l.], v. 25, n. 4, p.1087-1099, jul. 2005. Radiological Society of North America (RSNA). <http://dx.doi.org/10.1148/rg.254055027>.
- [3] PANEPUCCI, Horácio; TANNÚS, Alberto. Magnetic resonance imaging. Tutorial I. 1994. 25p.
- [4] HEMPHILL, J. Claude et al. Guidelines for the Management of Spontaneous Intracerebral Hemorrhage. **Stroke**, [s.l.], v. 46, n. 7, p. 2032-2060, 28 maio 2015. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/str.0000000000000069>.

[5] MERCK, The Manual's Editorial Staff. **Intracerebral Hemorrhage**. Disponível em: <<https://www.merckmanuals.com/home/quick-facts-brain,-spinal-cord,-and-nerve-disorders/stroke-cva/intracerebral-hemorrhage>>. Acesso em: 20 out. 2019.

[6] A ROSENBERG, G et al. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. **Stroke**, [s.l.], v. 21, n. 5, p.801-807, maio 1990. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/01.str.21.5.801>.

[7] MACLELLAN, Crystal L et al. Intracerebral Hemorrhage Models in Rat: Comparing Collagenase to Blood Infusion. **Journal Of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, [s.l.], v. 28, n. 3, p.516-525, 29 ago. 2007. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600548>.