



Universidade de Coimbra
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Departamento de Física

**Detecção das Alterações Estruturais e
Funcionais para a doença de Alzheimer**

Ana Margarida Matos

Coimbra

2013

Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

This copy of the thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgement.

Universidade de Coimbra
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Departamento de Física

**Detecção das Alterações Estruturais e
Funcionais para a doença de Alzheimer**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em Engenharia Biomédica, sob a orientação científica do doutor Miguel Patrício e da doutora Paula Faria.

Ana Margarida Almeida de Matos

margaridamatos18@gmail.com

Coimbra

2013

There is nothing worse than a sharp image of a fuzzy concept.
Ansel Adams (1902-1984)

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus orientadores, Dr. Miguel Patrício e à Prof.^a Paula Faria por me orientarem durante este ano, pela disponibilidade que sempre tiveram e por partilharem comigo os seus conhecimentos. Agradeço também ao IBILI/ICNAS por fornecerem as condições de trabalho necessárias à realização desta dissertação. À Dr^a Isabel Santana e ao seu grupo pelo trabalho que tem realizado a identificação e acompanhamento quer de voluntários saudáveis, quer de doentes de Alzheimer. Agradeço também a todos os que ajudaram na obtenção dos dados PET utilizados nesta dissertação, em particular ao Prof. Miguel Castelo Branco, Prof. Antero Abrunhosa, Prof. Francisco Alves, Prof. Nuno Chichorro e Ricardo Faustino. Dos professores, que me acompanharam ao longo deste seis anos em Coimbra, gostaria de agradecer ao Prof. Miguel Morgado pelo bom trabalho que faz em prol dos alunos do DF e dos alunos de Engenharia Biomédica.

Destes 6 anos em Coimbra, muitas coisas ficam na memória: muitos amigos, muitas vivências, muitas aprendizagens... Agradeço especialmente aos amigos de Coimbra: à Patrícia, à Margarida, à Sara, ao João Carlos, ao Marco, à Susete, à Ana, ao Rui, ao Vítor, ao José, ao João Pedro, à Adriana, à Catarina. Ao David, Daniel e Gonçalo, um obrigada por todas aquelas Quartas-feiras e por tudo o que aprendi com elas!

Aos amigos do “fim-de-semana”, um especial Obrigada por me lembrarem como é bom voltar a casa!

À família, porque para além de todas as dificuldades estiveram sempre lá para me apoiar, dar carinho e ajudar. Obrigada pais!

Finalmente, obrigada Pedro! Por teres estado sempre lá no último ano, por teres ouvido os desabafos, por teres sempre aquela palavra e acima de tudo por dares sempre aquele abraço quando é preciso. Obrigada!

Abstract

Alzheimer's Disease (AD) is a neurodegenerative disease recognized as one of the most important medical problems affecting the elderly. It is characterized by an irreversible and progressive loss of neurons which is mostly pronounced in the grey matter and specifically in the hippocampus.

Dynamic Positron Emission Tomography (PET) is a functional imaging technique that measures the local concentration of a tracer molecule in a target tissue. As a particular application to study AD, which presents the presence of β -amyloid plaques and neurofibrillary tangles a neuropathological hallmark, the PET imaging agent Pittsburgh Compound B (PiB) allows the in vivo imaging of A β deposition. To allow intersubject comparisons and longitudinal studies on the same patient, PiB-PET studies need to be quantitative. Several models have been proposed in the literature to quantify PET images. For this work, three different quantification models have been implemented and applied: the Simplified Reference Tissue Model (SRTM), the Receptor Parametric Mapping (RPM) and the Logan Graphical Analysis. Both the methods and corresponding results are discussed here.

Voxel-based Morphometry (VBM) is a widely used statistical-based technique which has been shown to present very plausible biological results and which allows the identification of structural or functional differences between brains of healthy subjects and AD patients. By implementing VBM, we can identify alterations in grey matter in MRI images of AD patients, when compared to those of healthy volunteers. Significant grey matter alterations were detected in the hippocampal region. The same technique may be applied to PET images.

This thesis discusses the methodological issues and choices associated to VBM studies, both for MRI and PET data. All the steps for such studies have been implemented and will be available for future VBM analyses.

Key-words: Alzheimer's disease, AD, Voxel-Based Morphometry, VBM, Quantification Models, PiB, Positron emission tomography, PET, Magnetic resonance imaging, MRI

Resumo

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa, reconhecida como uma das doenças que mais afecta a população idosa. É caracterizada por uma perda progressiva e irreversível dos neurónios, de forma mais acentuada na matéria cinzenta, mais especificamente na zona do hipocampo.

A tomografia por emissão de positrões (PET) é uma técnica imagiológica funcional que mede concentrações locais de uma molécula radioactivamente marcada injectada no paciente. No estudo da DA, que se caracteriza por apresentar placas β -amilóide e emaranhados neurofibrilares, o agente imagiológico *Pittsburgh Compound B* (PiB) permite que se identifique a deposição de $A\beta$ *in vivo*. Para permitir comparações entre sujeitos e estudos longitudinais, as imagens obtidas com PiB-PET precisam de ser quantificadas. Vários métodos foram propostos na literatura para quantificar imagens PET. Neste trabalho, implementaram-se três destes métodos, que foram posteriormente aplicados a imagens PET. Tanto os métodos como os resultados correspondentes são discutidos. A morfometria *voxel-a-voxel* (VBM) é uma técnica estatística que tem vindo a demonstrar resultados biológicos bastante plausíveis e que permite a identificação de diferenças estruturais ou funcionais entre cérebros de sujeitos saudáveis e sujeitos com DA. Com a implementação do VBM pretende-se identificar as alterações na matéria cinzenta de imagens de ressonância magnética de sujeitos com DA quando comparados com sujeitos saudáveis, onde se verifica que as alterações mais evidentes ocorrem na matéria cinzenta, mais especificamente na zona do hipocampo. A mesma técnica pode ser aplicada a imagens PET.

Esta tese discute os aspectos metodológicos e possíveis escolhas associadas a estudos VBM, aplicáveis tanto a dados MRI como dados PET. Todos os passos para estes estudos foram implementados e são disponibilizados para futuras análises VBM.

Palavra-Chave: Doença de Alzheimer, DA, Morfometria *Voxel-a-Voxel*, VBM, Modelos de Quantificação, PiB, Tomografia por emissão de positrões, PET, Ressonância magnética, MRI

Índice

Agradecimentos	i
Abstract	iii
Resumo	v
Índice	vii
Lista de figuras	x
Lista de tabelas	xiii
Lista de Acrónimos	xiv
1. Introdução	2
1.1. Motivação e Objectivos.....	2
1.2. Estrutura da dissertação.....	3
1.3. Publicação	3
2. Doença de Alzheimer	6
2.1. Mecanismos Moleculares da Doença de Alzheimer	7
2.2. Caracterização da Doença de Alzheimer.....	9
2.3. Avaliação diagnóstica	10
2.3.1. Avaliação do Estado Mental.....	10
2.3.2. Técnicas de imagiologia na doença de Alzheimer: Imagens de ressonância magnética e tomografia por emissão de positrões.....	11
2.4. Diagnóstico precoce da Doença de Alzheimer e a importância dos biomarcadores ...	13
2.4.1. Biomarcadores de deposição de placas A β	13
2.4.2. Biomarcadores de neurodegenerescência.....	13
3. Técnicas de Imagiologia	16
3.1. Tomografia por emissão de positrões (PET).....	16
3.1.1. Princípios físicos da PET	17
3.1.2. Tipos de eventos.....	19
3.1.3. Detecção em PET	20
(A) Detectores de Radiação	21

(B)	Tempo de Voo.....	22
(C)	Aquisição 2D e 3D.....	22
(D)	Correcção de dados.....	22
(E)	Reconstrução de imagem.....	23
3.2.	Imagens de Ressonância Magnética (MRI).....	24
3.2.1.	Princípios da MRI.....	24
3.2.2.	Imagens em MR.....	25
3.2.2.1.	Seleccção de <i>slices</i>	26
4.	Quantificação de imagens PET.....	30
4.1.	Modelos cinéticos com função de entrada arterial.....	30
4.1.1.	Modelo Compartimental com um compartimento.....	33
4.1.2.	Modelo Compartimental de dois tecidos.....	34
4.2.	Modelos cinéticos com a região de referência.....	35
4.3.	Determinação de parâmetros cinéticos.....	38
4.3.1.	SRTM.....	38
4.3.2.	RPM.....	40
4.3.3.	Método gráfico de <i>Logan</i>	41
4.4.	Resultados.....	43
4.4.1.	Ponderação dos parâmetros escolhidos.....	43
4.4.1.1.	SRTM.....	44
4.4.1.2.	RPM.....	44
4.4.1.3.	Logan Plot.....	45
4.4.2.	Comparação dos métodos apresentados.....	46
4.5.	Conclusão.....	48
5.	Morfometria <i>voxel-a-voxel</i>.....	52
5.1.	Introdução.....	52
5.2.	Métodos.....	53
5.2.1.	Participantes e aquisição de dados.....	53
5.2.2.	Pré-processamento.....	55
(A)	Registo e Normalização.....	56
(B)	Segmentação.....	57
(C)	Suavização.....	58
(D)	Análise Estatística.....	59

5.3.	Resultados	60
5.3.1.	Avaliação de alterações ocorridas ao fim de 12 meses de diagnóstico	60
5.3.2.	Relação entre os scores cognitivos e os estágios da demência.....	63
5.3.3.	Avaliação das alterações ocorridas num período de 12 meses em cada sujeito ..	65
5.4.	Conclusão.....	69
6.	Conclusão	72
6.1.	Trabalho Futuro.....	73
	Bibliografia	76
	Anexos	77

Lista de figuras

- Figura 2.1: Número de pessoas com demência em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Adaptado de [1]. 6
- Figura 2.2: Alterações que ocorrem na doença de Alzheimer a nível morfológico, bioquímico e fisiológico. Adaptado de [5]. 7
- Figura 2.3: Hipótese da cascata amilóide. Adaptado de [7]. 8
- Figura 2.4: Diferenças observadas nas imagens MR e PET entre um sujeito saudável e um paciente com DA. Na primeira linha estão apresentadas duas imagens de MR de um sujeito controlo e um sujeito com DA, respectivamente. Na segunda linha, estão apresentadas as imagens PET obtidas com PiB de um sujeito controlo e um sujeito com DA, respectivamente. Enquanto na última linha estão apresentadas as imagens PET obtidas com FDG de um sujeito controlo e um sujeito com DA, respectivamente. Adaptado de [27]. 12
- Figura 3.1: *Scanner* PET com o respectivo evento de aniquilação. À esquerda podemos visualizar a formação e aniquilação do positrão (e^+) com a conseqüente emissão de dois fótons gama de 511keV em direcções opostas ($\theta \sim 180^\circ$). Adaptado de [24], [32], [33]. 17
- Figura 3.2: Os eventos que ocorrem em PET estão representados num sistema PET de anel conforme se pode ver na figura. A amarelo está indicado o local da aniquilação. A aniquilação marcada com 1, apresenta um evento verdadeiro, em que os dois fótons são emitidos em direcções opostas e detectados simultaneamente pelo detector. O evento assinalado pelo número 2 é um evento de *Scatter*: neste tipo de eventos, o efeito de *Compton* faz com que a energia dos fótons seja diminuída, com uma conseqüente alteração da sua direcção, levando a que os fótons sejam detectados em pontos diferentes (a tracejado encontra-se a LR). Uma coincidência aleatória encontra-se representada pela aniquilação 3. Neste tipo de aniquilação dois positrões são aniquilados sendo emitidos quatro fótons: dois são perdidos e dois detectados como sendo da mesma aniquilação (a LR está marcada a tracejado). Finalmente, na aniquilação 4 podemos visualizar um evento múltiplo. Aqui, acontecem também duas aniquilações, mas são detectados 3 eventos, existindo assim ambigüidade na escolha de qual o par de eventos que provém da mesma aniquilação sendo por isso o evento ignorado. Adaptado de [24]. 20
- Figura 3.3: (A) Imagem PET sem reconstrução. (B) Imagem PET com reconstrução. Adaptado de [24]. 23
- Figura 3.4: Na ausência de um campo magnético externo, os prótons apresentam os seus *spins* orientados de forma aleatória. Adaptado de [23]. 24
- Figura 3.5: Curvas de Relaxação T1 e T2, respectivamente. Em cada curva podemos observar a magnetização dos prótons a diferentes frequências. Adaptado de [23]. 25

Figura 3.6: Imagens de MR, obtidas com o mesmo protocolo, de um sujeito com doença de Alzheimer (A) e de um sujeito controlo (B). Imagens obtidas no âmbito do trabalho desenvolvido nesta dissertação com o auxílio da base de dados ADNI. Ambas as imagens estão apresentadas numa vista sagital.....	27
Figura 4.1: Esquema ilustrativo da utilidade dos modelos de quantificação. Adaptado de [40].	32
Figura 4.2: Modelos compartimentais mais usados para quantificar imagens PET. (A) Modelo com um compartimento (zero tecidos); (B) Modelo com dois compartimentos (um tecido); (C) modelo com três compartimentos (dois tecidos). Adaptado de [40]. ..	32
Figura 4.3: Modelo compartimental com apenas um compartimento, utilizado para descrever a cinética de marcadores de perfusão. Aqui, C_A representa a concentração do marcador no sangue e C_T representa a concentração no tecido; K_1 e k_2 são as constantes de influxo e efluxo, respectivamente. Adaptado de [40].....	33
Figura 4.4: Modelo compartimental com dois tecidos, usado para estudos com receptores. Aqui, C_P , C_{ND} , e C_S representam a concentração do radioligando no plasma arterial e nos compartimentos correspondente ao radiofármaco não ligado ao alvo específico e ao ligado a esse alvo, respectivamente. Já K_1 até k_4 representam as constantes que caracterizam o transporte entre os compartimentos, sendo V_B o volume sanguíneo em cada <i>voxel</i>	35
Figura 4.5: Modelo compartimental de 3 tecidos, ou 4 compartimentos. Aqui, encontra-se representado o plasma arterial, as concentrações nos compartimentos de referência, livre e de ligação específica. As constantes K_1 até k_4 , bem como K_1' e k_2' , caracterizam o transporte entre os compartimentos.....	36
Figura 4.6: Exemplo de uma regressão linear com um conjunto de pontos aleatório.....	39
Figura 4.7: Representação de R_1 , k_2 e BP, respectivamente, para dados PiB com quantificação SRTM. A barra de cores da última imagem é representativa para todas as imagens.	39
Figura 4.8: Representação de R_1 , k_2 e BP, respectivamente, para dados PiB com quantificação RPM. A barra de cores da última imagem é representativa para todas as imagens.	41
Figura 4.9: Modelo compartimental proposto por <i>Jean Logan</i> . Adaptado de [57]......	41
Figura 4.10: Representação de BP para dados PiB com quantificação <i>Logan</i>	43
Figura 4.11: Representação de BP para os 3 métodos implementados.	43
Figura 4.12: Variação dos valores de θ_3 para a obtenção do parâmetro final θ_3 . Os valores finais de θ_3 são os indicados na legenda de cada gráfico. A estrela a vermelho indica o valor de θ_3	45
Figura 4.13: Representação da equação (4-32). O declive da recta representa o DVR.....	46
Figura 4.14: Comparação entre os métodos RPM e SRTM.	47
Figura 4.15: Comparação entre os métodos RPM e <i>Logan Analysis</i>	47
Figura 4.16: Comparação entre os métodos <i>Logan Analysis</i> e SRTM.....	48
Figura 5.1: Esquema temporal da obtenção das imagens de MR para o grupo de doentes com DA, segundo o protocolo usado na ADNI [38].	54

Figura 5.2: Passos de pré-processamento de dados utilizados no VBM.	55
Figura 5.3: <i>Template</i> MNI usado para registrar as imagens de MR neste estudo.	56
Figura 5.4: (A) Imagem de MR antes do registo; (B) Imagem de MR após o registo. Ambas as imagens são do mesmo sujeito. A imagem original (A) foi registada com o <i>template</i> MNI representado na Figura 5.3, obtendo-se a imagem em (B).	57
Figura 5.5: Imagens de MR com as respectivas segmentações: (A) Imagem original; (B) Imagem de matéria cinzenta; (C) Imagem de matéria branca; (D) Imagem de CSF e outros.	58
Figura 5.6: Imagens de MR: (A) Imagem Original; (B) Imagem de matéria cinzenta; (C) Imagem de matéria cinzenta suavizada. Todas as imagens correspondem ao mesmo sujeito (doente de Alzheimer) e foram obtidas no âmbito do trabalho desta dissertação.	59
Figura 5.7: (A) Glass Brain, representação das alterações que ocorrem no cérebro a nível quantitativo. (B) Color Map, mapa de cores da localização das alterações que ocorrem, bem como a quantidade de alterações que ocorrem. A seta vermelha em (A) aponta para a comissura anterior.	61
Figura 5.8: Glass Brain (A) e Color Map (B), comparando doentes de Alzheimer com score MMSE < 25 com sujeitos saudáveis. A seta vermelha (A) aponta para a comissura anterior.	64
Figura 5.9: (A) <i>Color Map</i> de um estudo realizado com imagens obtidas 12 meses após o diagnóstico (correspondente ao estudo apresentado na Figura 5.8). (B) <i>Color Map</i> de um estudo realizado aos mesmo sujeitos que em (A), mas com imagens obtidas 12 meses depois, isto é, imagens obtidas 24 meses após o diagnóstico.	66
Figura 5.10: Variações do MMSE nos sujeitos com a doença de Alzheimer ao longo do tempo. A linha verde corresponde ao mês zero (o início do estudo), a linha azul corresponde ao mês 12 e a linha vermelha corresponde ao mês 24. Os sujeitos estão indicados como AD1, ..., AD30.	67
Figura 5.11: (A) Glass Brain, representação das alterações que ocorrem no cérebro a nível quantitativo. (B) Color Map, mapa de cores da localização das alterações que ocorrem, bem como a quantidade de alterações que ocorrem nos sujeitos num período de 12 meses. Todos os sujeitos apresentavam MMSE < 25 e correspondem aos dados demográficos apresentados na Tabela 5.5. A seta vermelha representada em (A), bem como o centro do eixo azul em (B) apontam para a comissura anterior.	68

Lista de tabelas

Tabela 3.1: Radionuclídeos mais usados em PET com os respectivos tempos de semivida ($t_{1/2}$) e a energia máxima emitida (E_{max}). Adaptado de [33], [38].	18
Tabela 3.2: Propriedades físicas dos cintiladores mais utilizados em PET. A resolução de energia foi medida a 511 keV. Adaptado de [33].	21
Tabela 5.1: Informação demográfica dos pacientes em estudo.	55
Tabela 5.2: Áreas mais afectadas nos pacientes avaliados 12 meses após o diagnóstico, com as respectivas coordenadas MNI.	62
Tabela 5.3: Informação demográfica dos pacientes com MMSE < 25.	63
Tabela 5.4: Áreas mais afectadas com as respectivas coordenadas MNI nos pacientes avaliados ao mês 12 e com MMSE < 25.	65
Tabela 5.5: Informação demográfica dos pacientes com MMSE < 25 em duas fases: 12 meses após o diagnóstico e 24 meses após o diagnóstico.	66
Tabela 5.6: Áreas mais afectadas com as respectivas coordenadas MNI nos pacientes durante um período de 12 meses (do mês 12 ao mês 24).	69

Lista de Acrónimos

2D	Duas dimensões
3D	Três dimensões
ADNI	<i>Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative</i>
AIF	Função de entrada arterial
APP	Proteína precursora da amilóide
BP	Potencial de Ligação
CDR	<i>Clinical dementia rating scale</i>
CHUC	Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra
CSF	Líquido Cefalorraquidiano
CT	Tomografia Computacional
DA	Doença de Alzheimer
DVR	Rácio do volume de distribuição
E	Fracção de extracção
EUA	Estados Unidos da América
F	Fluxo Sanguíneo de perfusão
FBP	<i>Filtered back-projection</i>
FWHM	Largura a meia altura
GLM	Modelo Linear Geral
IBILI	Instituto Biomédico de Investigação de Luz e Imagem
ICNAS	Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde
IDIF	Imagens derivadas da função de entrada
keV	Quilo electrão-Volt
LR	Linha de Resposta
MB	Matéria Branca
MC	Matéria Cinzenta
MCI	Défice cognitivo ligeiro
MeV	Mega electrão-Volt
MMSE	<i>Mini Mental State Examination</i>
MNI	<i>Montreal Neurological Institute</i>
MoCA	<i>Montreal Cognitive Assesment</i>
MR	Ressonância Magnética
MRI	Imagens de Ressonância Magnética
OSEM	<i>Ordered subset expectation maximization</i>
PET	Tomografia por emissão de positrões
PiB	<i>Pittsburgh Compound-B</i>
PS	Área do produto permeável
RAMLA	<i>Row action maximum likelihood</i>
RF	Radio frequência
ROI	Região de interesse
RPM	<i>Reference parametric mapping</i>
SPECT	Tomografia por emissão de um único positrão
SRTM	Modelo de Referência no Tecido
SVM	Máquinas de vector de suporte
TOF	Tempo de voo
VBM	Morfometria <i>Voxel-a-Voxel</i>

Capítulo 1

Introdução

1. Introdução

1.1. Motivação e Objectivos

Com o envelhecimento da população mundial, as demências começam a registar-se cada vez em maior número. Actualmente estima-se que cerca de 24,3 milhões de pessoas apresentem sinais de demência e que este número cresça cerca de 4,6 milhões de pessoas por ano [1]. Destes, 60% a 70% são casos de doença de Alzheimer (DA). Esta é uma doença neurodegenerativa causada pela perda progressiva e irreversível dos neurónios, o que provoca incapacidades motoras e mentais. Em Portugal, das 153 mil pessoas que apresentam algum tipo de demência, 90 mil têm a doença de Alzheimer.

A doença de Alzheimer afecta maioritariamente a zona cerebral do hipocampo e não tem cura, pelo que o seu diagnóstico precoce permite um maior controlo dos seus sintomas e conseqüentemente uma melhoria da qualidade de vida dos indivíduos que padecem desta doença. Apesar do diagnóstico definitivo da DA ser apenas possível *post mortem*, existem algumas técnicas imagiológicas que permitem o seu diagnóstico *in vivo*. Destas destacam-se, a tomografia por emissão de positrões (PET, do inglês *Positron emission tomography*), que nos fornece uma medida da concentração do radiofármaco nos tecidos, bem como, a imagem de ressonância magnética (MRI, do inglês *Magnetic resonance imaging*) que permite a visualização de imagens morfológicas e funcionais do cérebro de forma não invasiva. A combinação destas duas técnicas é uma mais-valia, pois permite, não só, avaliar a estrutura, a função e a anatomia do cérebro, bem como, avaliar as funções dos tecidos cerebrais.

Tendo em conta que as imagens obtidas com a PET nos fornecem uma medida da concentração de determinado radiofármaco nos tecidos, para avaliar as suas diferentes concentrações é necessário recorrer a modelos de quantificação que as transformam em valores quantitativos que permitam a caracterização da função de cada tecido em estudo. Existem diversos modelos de quantificação disponíveis. A escolha do modelo adequado, bem como, a análise dos resultados obtidos, constitui a base da modelação cinética em PET.

Por outro lado, as imagens de MR permitem avaliar as alterações estruturais ou funcionais do cérebro. A caracterização destas imagens permite-nos distinguir grupos de indivíduos com determinada patologia de, por exemplo, pessoas saudáveis. Esta comparação pode ser realizada através de métodos estatísticos de análise de imagem como é o caso da morfometria *voxel-a-voxel* (VBM) que detecta diferenças morfológicas em diferentes grupos de *voxels*. A aplicação deste método permite a obtenção de imagens do cérebro onde são identificados os *voxels* que apresentam diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos de sujeitos em análise.

As avaliações de imagens de PET e MR permitem, actualmente, um diagnóstico credível da doença de Alzheimer, um controlo precoce dos seus sintomas e assim, melhoria da qualidade de vida destes doentes, bem como, das suas famílias. O melhoramento destas técnicas de diagnóstico e a introdução de técnicas híbridas torna a imagiologia uma ferramenta essencial a ser considerada na avaliação desta doença.

1.2. Estrutura da dissertação

A presente dissertação está dividida em 6 capítulos: Introdução, Métodos e Resultados, Conclusão e Trabalho Futuro.

No Capítulo 1 é apresentada uma pequena introdução ao tema e um pequeno resumo dos conteúdos dos restantes capítulos. Faz-se ainda referência à publicação que resultou deste trabalho.

O Capítulo 2 apresenta uma introdução à doença de Alzheimer, quais as suas principais características e qual a sua prevalência na população. Caracterizam-se ainda os tipos de diagnóstico desta doença

As técnicas de imagiologia utilizadas nesta dissertação são descritas no Capítulo 3. Neste capítulo, faz-se uma introdução à PET e MRI e apresentam-se os seus fundamentos teóricos. As imagens de PET, obtidas no âmbito de um projecto a decorrer no ICNAS/IBILI composto por 13 sujeitos com provável DA e 14 sujeitos saudáveis, são avaliadas no Capítulo 4. Aqui focamo-nos em métodos de quantificação destas imagens e na comparação de três destes métodos, identificando os que apresentam melhores resultados, tendo em conta também, a sua rapidez computacional.

No capítulo 5 apresenta-se um estudo realizado com imagens de MR da base de dados *ADNI*. Esta avaliação é realizada recorrendo à morfometria *voxel-a-voxel* (VBM). Aqui são comparadas imagens de controlos e de sujeitos diagnosticados com a doença de Alzheimer. O objectivo consiste na identificação e localização das alterações na anatomia cerebral, nomeadamente na zona do hipocampo, dos dois grupos em estudo.

No Capítulo 6, apresenta-se uma pequena conclusão sobre o trabalho desenvolvido nesta dissertação e o trabalho futuro que se poderá realizar.

1.3. Publicação

O trabalho desenvolvido no decorrer desta dissertação resultou num artigo (A. M. Matos, P. Faria, and M. Patrício, “Voxel-based morphometry analyses in Alzheimer’s disease,” *2013 IEEE 3rd Portuguese Meeting in Bioengineering (ENBENG)*, pp. 1–4, 2013), bem como na sua apresentação oral na respectiva conferência: *IEEE 3rd Portuguese Bioengineering Meeting* em Braga.

O artigo submetido e aceite para publicação encontra-se em anexo e está disponível em <http://ieeexplore.ieee.org/xpl/mostRecentIssue.jsp?punumber=6516763>.

Capítulo 2

Doença de Alzheimer

2. Doença de Alzheimer

As doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (DA), Parkinson ou Huntington são caracterizadas por uma perda progressiva e irreversível dos neurónios em áreas cerebrais estratégicas. A vulnerabilidade selectiva destas regiões nas diversas doenças, explica o seu quadro clínico diferenciado. A doença de Alzheimer é a doença neurodegenerativa mais frequente, e é responsável por cerca de 60% a 70% de todas as demências [1].

Em 2005, um estudo conduzido pela *Alzheimer Europe* e financiado pela Comissão Europeia, resultado do projecto *European Collaboration on Dementia* estimou que cerca de 24,3 milhões de pessoas apresentavam sinais de demência, e a cada ano, surgem cerca de 4,6 milhões de novos casos, o que equivale a um novo caso a cada 7 segundos [1]. O mesmo estudo revela ainda que até 2040, o número de pessoas com demência irá duplicar a cada 20 anos para 81,1 milhões.

Na Europa, 7,3 milhões de pessoas sofrem de algum tipo de demência e prevê-se que com o envelhecimento da população estes valores dupliquem até ao ano de 2040. Em Portugal, 153 mil pessoas apresentam algum tipo de demência e destas, a grande maioria, estimada em cerca de 90 000, têm a DA [1].

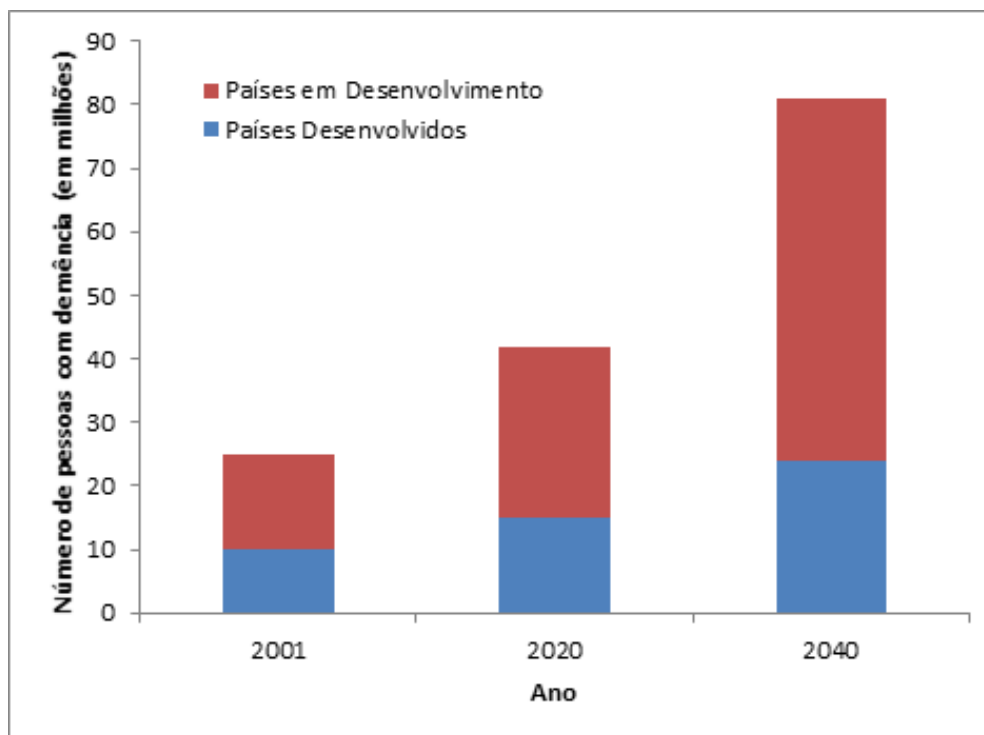


Figura 2.1: Número de pessoas com demência em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Adaptado de [1].

Esta doença afecta principalmente pessoas idosas, tendo uma prevalência de aproximadamente 35% aos 90 anos. Porém, o número de pessoas mais jovens com a doença não pode ser negligenciado. Por exemplo, nos EUA, onde cerca de 5,2 milhões de pessoas sofrem de DA, cerca de 200 000 destas pessoas têm menos de 65 anos [2].

2.1.Mecanismos Moleculares da Doença de Alzheimer

Em sujeitos com a DA, regiões cerebrais envolvidas em processos como a aprendizagem, a atenção ou a memória estão particularmente afectadas pela morte neuronal e degenerescência sináptica decorrente [3]. Porém, estes sintomas são prevalentes noutros tipos de demência fazendo assim com que o diagnóstico definitivo da DA seja ainda possível apenas pela identificação dos marcadores histológicos identificados pela primeira vez por *Alois Alzheimer*: as placas senis (que têm na sua constituição a proteína β -Amilóide) e as tranças neurofibrilares [4].

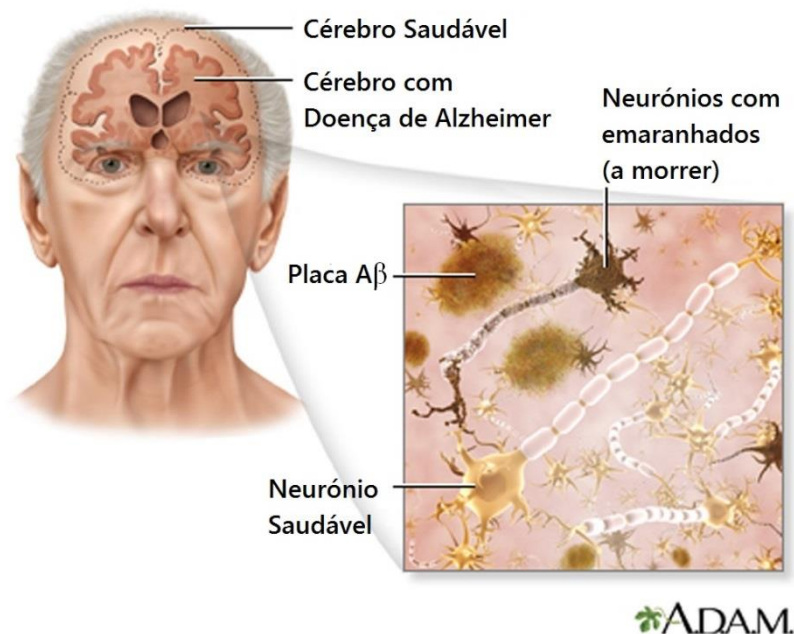


Figura 2.2: Alterações que ocorrem na doença de Alzheimer a nível morfológico, bioquímico e fisiológico. Adaptado de [5].

Na Figura 2.2, podemos ver uma representação das alterações que ocorrem no cérebro de um indivíduo que sofre da DA. Na parte esquerda da figura podemos ver as alterações macroscópicas, enquanto na parte direita estão representadas as alterações microscópicas. As características histopatológicas mais evidentes desta doença são as tranças neurofibrilares e as placas β -Amilóide que se encontram em grande parte na zona do hipocampo, o que macroscopicamente leva a uma atrofia dessa zona e que se traduz num aumento do espaço de líquido cefalorraquidiano adjacente [6]. Podemos verificar, pela parte esquerda da Figura 2.2, que os sujeitos com DA sofrem um processo de atrofia, com redução acentuada do volume do seu cérebro.

Actualmente, é conhecido que os péptidos A β resultam da proteína precursora da amilóide (APP) que desempenha um importante papel no desenvolvimento neuronal e na aderência dos neurónios à matriz extracelular. É através dos axónios que a APP é transportada até aos terminais sinápticos, onde se acumula em elevadas concentrações. Durante este transporte, a APP sofre diversas clivagens proteolíticas originando os péptidos A β que normalmente são removidos fisiologicamente do parênquima cerebral. Na DA, os péptidos A β não são removidos devido a diversas mutações ou mesmo a algumas falhas nos mecanismos de depuração o que faz com que ocorra uma acumulação deste péptido em pequenos depósitos de proteínas. A neurotoxicidade destes depósitos leva à formação das placas amilóide que por sua vez irão originar modificações na plasticidade sináptica e na integridade neuronal. Esta cascata de eventos culmina em processos de neurodegenerescência que poderão levar à adúlteração de outras proteínas, como é o caso da proteína τ , responsável pela estabilização dos microtúbulos.

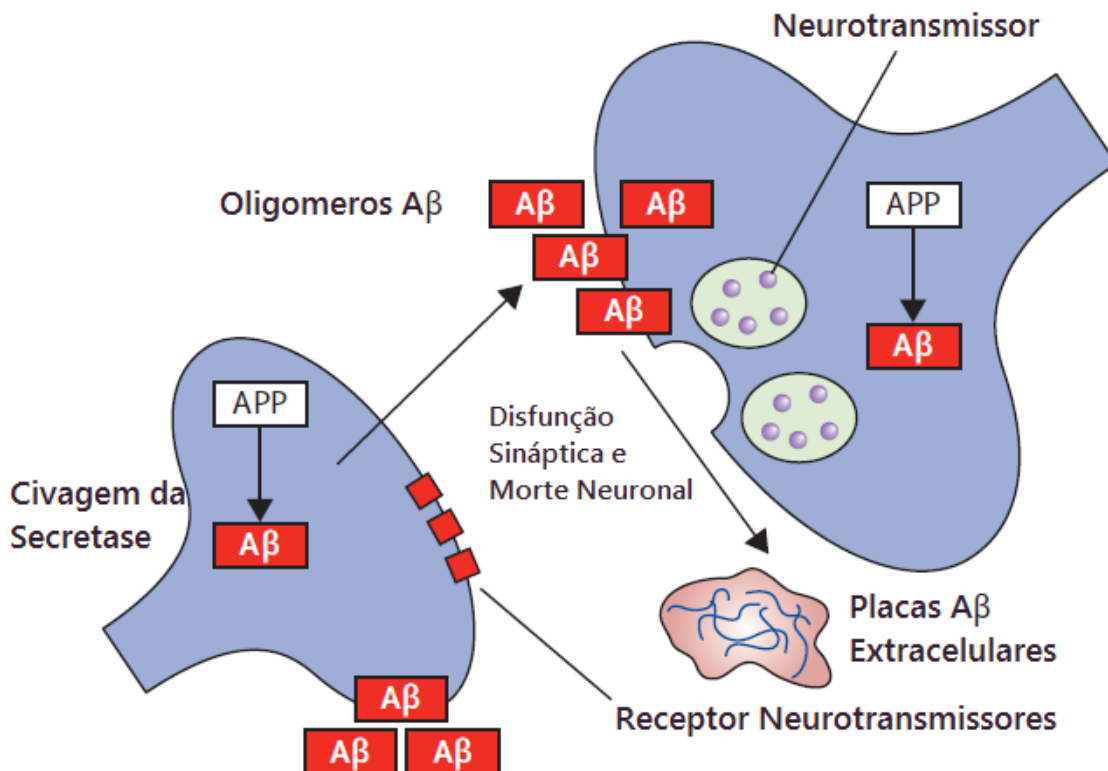


Figura 2.3: Hipótese da cascata amilóide. Adaptado de [7].

As alterações produzidas durante a cascata amilóide (ver Figura 2.3) levam à formação de acumulados de proteínas τ denominados de tranças neurofibrilares que levam a uma posterior destruição neuronal. Apesar dos mecanismos que desencadeiam estas reacções não serem totalmente conhecidos, existem algumas evidências que apontam para que a deposição dos oligómeros A β levam à adúlteração da actividade de algumas cinases que promovem a fosforilação anormal da proteína τ e indicam assim a presença da doença no sujeito em estudo [7].

2.2. Caracterização da Doença de Alzheimer

Apesar da doença de Alzheimer não ser diagnosticada de forma inequívoca durante a vida do paciente, o diagnóstico pode ser realizado de forma multidisciplinar através de testes neuropsicológicos, testes de sangue, análises do líquido céfalo-raquídeo, electroencefalograma ou técnicas de diagnóstico que irão excluir outras demências com sintomas e sinais semelhantes [8]. Nas demências, o sintoma mais evidente é a perda de memória e a perda de funções, assim para distinguir a DA de outro tipo de demências torna-se fundamental a realização dos testes anteriormente mencionados [9].

A DA apresenta alguns marcadores que podem ser observados através da realização dos testes anteriormente mencionados, de onde podemos destacar as alterações estruturais visíveis nas imagens de ressonância magnética com alterações no lobo temporal medial, alterações moleculares observáveis em PET e alterações nos biomarcadores de líquido cérebrospinal. Diversas pesquisas pretendem caracterizar os estágios iniciais da DA. A DA pré-clínica caracteriza-se pelo período assintomático entre as primeiras lesões cerebrais e o aparecimento dos primeiros sintomas, já a DA *prodrómica* é um estado sintomático, pré-demência que normalmente se pode incluir na categoria de défice cognitivo ligeiro, que se caracteriza por sintomas pouco severos não se enquadrando ainda nos critérios de diagnóstico de DA. A demência de DA é a fase da doença em que os sintomas são suficientemente severos para se considerar demência e para que os critérios desta sejam cumpridos [10].

O défice cognitivo ligeiro (MCI, do inglês *Mild Cognitive Impairment*) é uma síndrome entre o estado normal e a demência, sendo que os sujeitos com esta síndrome apresentam défices cognitivos superiores àqueles que se espera que surjam naturalmente com a idade [11]. Estes sujeitos ainda não se enquadram nos critérios de diagnóstico para a DA, porque apresentam um défice cognitivo ligeiro/isolado (usualmente defeito de memória) e mantêm a sua autonomia funcional. Alguns estudos demonstram que os sujeitos com MCI apresentam um elevado risco de desenvolver DA, que se estima corresponder a 15% ao ano, e cerca de 80% aos 6 anos [12].

Consideram-se como factores de risco para desenvolver a DA, a idade avançada, o género feminino, traumatismos cranianos história familiar de DA, riscos genéticos (portadores de mutações patogénicas ou de polimorfismo de risco¹) [7], [13].

A perda de memória é o sintoma mais precoce e mais grave da DA [14], [15]. Com o evoluir da doença, os sintomas vão-se agravando e tornando-se mais óbvios e evidentes, interferindo com a capacidade dos sujeitos tomarem conta deles próprios e fazendo com que dependam de terceiros [9]. No entanto, os sintomas da doença podem ser incompreendidos inicialmente, pois os défices cognitivos dos sujeitos são avaliados de formas diferentes em diferentes estudos [15]. Além disso, a doença manifesta-se também por sintomas comportamentais ou psiquiátricos. De acordo com *Burns et al.* [14] que realizaram um estudo no Reino Unido com 178 sujeitos que sofriam de DA, os sintomas comportamentais e mentais mais evidentes eram delírios, alucinações, depressão, obsessão, agitação/agressão, apatia, desinibição sexual, psicose, agitação (agressiva ou não agressiva), resistência aos cuidados, perturbações nas actividades diárias, perturbações de sono. Note-se que os sintomas diferem entre sujeitos e modificam-se ao longo das diferentes fases desta doença.

¹ Os genes que conferem maior risco são o APOE, GSK3 β , DYRK1A, Tau, TOMMA40, CLU e PICALM [7].

2.3. Avaliação diagnóstica

O diagnóstico da demência é um processo que requer uma história clínica completa, para além das análises imagiológicas e funcionais. A avaliação clínica destes sujeitos deve incluir informações acerca das suas características demográficas, dos seus antecedentes pessoais de doenças neurológicas ou psiquiátricas da história familiar de demência e a avaliação farmacológica. A avaliação neuropsicológica é essencial para caracterizar qualitativamente e quantitativamente o défice cognitivo. Esta avaliação permite confirmar se os critérios de diagnóstico para doença provável são cumpridos (nomeadamente o NINCDS-ADRDA [8]). De entre os testes neuropsicológicos, podemos destacar o MMSE e o MoCA. A avaliação psicológica consiste em detectar possíveis alterações psicopatológicas nos sujeitos, tais como alterações do afecto e humor, alterações da personalidade prévia, delírio, alucinações alterações do sono, do comportamento alimentar e sexual ou do comportamento motor.

Para além destes testes, deverão ainda ser realizados outros como os exames laboratoriais (que incluam estudos de primeira linha, que poderão ser efectuados por rotina em todos os doentes com demência), o electroencefalograma ou estudos de imagem, como a TAC, a MRI, a PET e SPECT e os estudos genéticos.

2.3.1. Avaliação do Estado Mental

A avaliação do estado mental dos sujeitos é efectuada através de um conjunto de testes cognitivos. Existem diversos testes para realizar esta avaliação, entre os quais se destacam: o *Mini Mental State Examination (MMSE)*, o *Montreal Cognitive Assesment (MoCA)* e a *Clinical Dementia Rating Scale (CDR)*.

O MMSE é um teste simples que contém algumas perguntas sobre funções cognitivas básicas [16]. A pontuação máxima é 30 pontos e para Portugal, foram definidas pontuações de corte para a demência, estabelecidas com base em dados normativos para a escolaridade. Assim, considera-se o valor de corte do MMSE em 22 se os sujeitos tiverem 0 a 2 anos de escolaridade, 24 se os sujeitos tiverem de 3 a 6 anos de escolaridade e 27 se os sujeitos tiverem 7 ou mais anos de escolaridade [17], [18].

Para colmatar algumas das falhas que existem no MMSE (devido ao grau de simplicidade das questões deste teste [18]) foi introduzido um teste cognitivo que apresenta vantagens relativamente a este: o MoCA. Este teste tem a capacidade de avaliar um maior número de áreas cognitivas, apresentando tarefas mais complexas quando comparado com o MMSE [19]. O facto de ser um teste mais sensível a alguns parâmetros, permite que seja mais eficaz a detectar o MCI, por exemplo. Neste teste a pontuação máxima adquirida é de 30 pontos e avalia 8 domínios cognitivos: memória de longo prazo, aptidões visuo-espaciais, funções de execução, atenção, concentração e memória de trabalho, linguagem e orientação espaço-temporal [20], [21]. Existem dados normativos por idade/escolaridade para Portugal: uma pontuação inferior a 26 significa que o sujeito apresenta demência e para sujeitos com escolaridade inferior a 12 anos é atribuído um ponto.

A CDR é uma escala de avaliação global desenvolvido para identificar presença de algum tipo de demência no sujeito em estudo bem como a sua severidade [22]. O protocolo para a realização deste teste passa por realizar entrevistas aos sujeitos e seus acompanhantes de forma a obter a informação necessária para a classificação cognitiva do sujeito em seis diferentes domínios: memória, orientação, juízo e resolução de problemas, competência social, casa e passatempos e cuidados pessoais [22]. O resultado da CDR é uma classificação qualitativa que varia entre 0 (sem défice cognitivo), 0.5 (sujeito com demência questionável), 1 (sujeito com demência ligeira), 2 (sujeito com demência moderada) e 3 (sujeito com demência grave) [22].

2.3.2. Técnicas de imagiologia na doença de Alzheimer: Imagens de ressonância magnética e tomografia por emissão de positrões

As técnicas de neuroimagem, como é o caso da Tomografia Computacional (CT, do inglês *Computational Tomography*), e as imagens de ressonância magnética (MRI, do inglês *Magnetic Resonance Imaging*) são normalmente utilizadas em estudos com sujeitos em que se suspeite algum tipo de demência, de forma a excluir outras possíveis patologias. A medicina nuclear é uma técnica que utiliza radioisótopos para o diagnóstico, tratamento e estudo de algumas doenças, sendo uma das áreas mais emergentes da Imagiologia Nuclear que permite a visualização, caracterização e quantificação de sistemas *in vivo* [23], [24]. A natureza não invasiva destas técnicas tem-se revelado uma mais-valia, pois permite a obtenção de imagens do corpo humano bastante favoráveis. Das técnicas de neuroimagem mais utilizadas, destacam-se a PET (do inglês *Positron Emission Tomography*) e a MRI, que nos permitem avaliar a fisiologia e estrutura dos sujeitos em estudo.

A MRI permite visualizar imagens *in vivo* da morfologia, da estrutura e da dinâmica do corpo humano com elevado contraste e resolução. Nesta técnica, são usados campos magnéticos e energia electromagnética para gerar sinais que possam ser transformados em imagens [23]. O resultado são imagens com características morfológicas que ao serem avaliadas podem indicar alterações ou deformações. No caso especial da demências, as imagens iniciais do cérebro aparentam estar normais, enquanto que em fases avançadas uma imagem de ressonância apresenta alterações em algumas áreas do cérebro que podem ser identificadas visualmente por um profissional experiente. Apesar das imagens não permitirem estabelecer um diagnóstico definitivo da DA, permitem excluir outros tipos de demência como os acidentes vascular cerebral ou tumores [23].

A tomografia por emissão de positrões (PET) permite medir processos bioquímicos e fisiológicos *in vivo*. Nesta técnica, o paciente é injectado com biomoléculas marcadas com radioisótopos [24]. O radioisótopo a injectar depende da molécula que pretendemos observar. O radioisótopo mais utilizado em estudo de DA é o [¹⁸F]FDG (Fluorodeoxiglicose, um composto marcado com Flúor-18) que permite a identificação de zonas de hipometabolismo da glicose cerebral [25]. No entanto, o desenvolvimento de novos radiotraçadores específicos para os depósitos de A β , como é o caso do [¹¹C]PiB (*Pittsburgh Compound-B*, uma biomolécula marcada com Carbono-11), permite um diagnóstico mais preciso através da avaliação da correlação entre o *uptake* e a presença das placas A β [26]. Os exames PET resultam num conjunto de dados que ao serem reconstruídos permitem obter a distribuição da concentração do radiofármaco num determinado tecido.

Para o diagnóstico da DA utiliza-se maioritariamente imagens de PET e MR quer combinadas quer isoladas. As imagens MR e PET ao serem utilizadas em conjunto apresentam mais vantagens do que a análise isolada, uma vez que podemos analisar não só a morfologia (MRI) como também os processos bioquímicos e fisiológicos (PET) da área em estudo. Na Figura 2.4 estão apresentadas imagens de um sujeito controlo e um sujeito com a doença de Alzheimer obtidas pelos dois métodos: na primeira linha as imagens MR e na segunda e terceira linha as imagens PET obtidas com PiB e FDG, respectivamente.

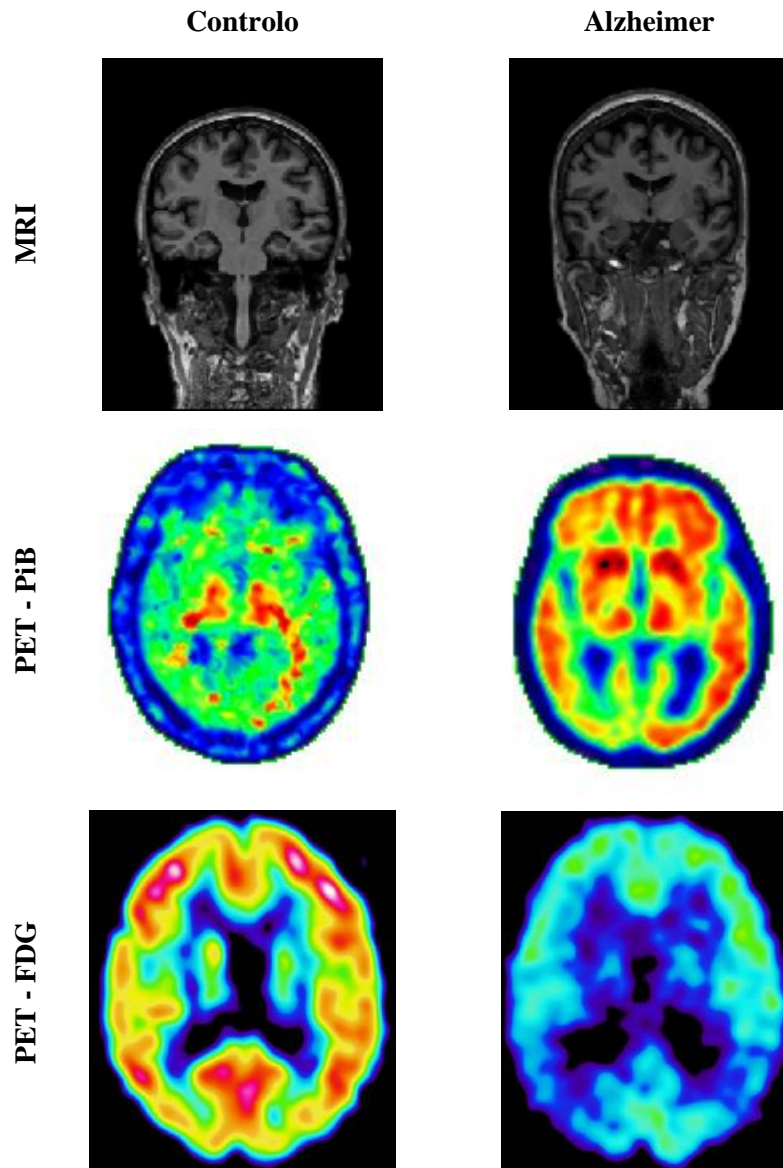


Figura 2.4: Diferenças observadas nas imagens MR e PET entre um sujeito saudável e um paciente com DA. Na primeira linha estão apresentadas duas imagens de MR de um sujeito controlo e um sujeito com DA, respectivamente. Na segunda linha, estão apresentadas as imagens PET obtidas com PiB de um sujeito controlo e um sujeito com DA, respectivamente. Enquanto na última linha estão apresentadas as imagens PET obtidas com FDG de um sujeito controlo e um sujeito com DA, respectivamente. Adaptado de [27].

2.4. Diagnóstico precoce da Doença de Alzheimer e a importância dos biomarcadores

Os sujeitos com DA podem apresentar alterações patológicas associadas à demência ou apresentarem-se cognitivamente normais. Tanto a degradação patológica como o declínio cognitivo ocorrem gradualmente, mas as alterações patológicas observáveis em sujeitos com demência tendem a desenvolver-se algumas décadas antes de os primeiros sintomas ocorrerem.

Os biomarcadores, tanto bioquímicos como imagiológicos, são indicadores das alterações específicas que ocorrem na DA *in vivo*. Estes são variáveis (fisiológicas, bioquímicas ou anatómicas) que podem ser medidas *in vivo* e que indicam características específicas de alterações patológicas específicas de cada doença. Para a DA, existem 5 importantes biomarcadores que têm sido apresentados na literatura: diminuição da $A\beta_{42}$ no CSF, aumento da tau no CSF, diminuição do *uptake* de FDG em estudos FDG-PET, imagiologia da amilóide com PET, medidas da atrofia cerebral em estudos de MRI estrutural [28]. Cada um destes marcadores foi validado de forma a ser usado de forma correcta em ensaios clínicos [28].

Os biomarcadores referidos podem ser divididos em duas categorias, os biomarcadores de deposição de placas $A\beta$ (CSF $A\beta_{1-42}$, imagem PET $A\beta$) e os de neurodegenerescência (CSF tau, FDG-PET, MRI estrutural).

2.4.1. Biomarcadores de deposição de placas $A\beta$

Quase todos os sujeitos que apresentam um diagnóstico clínico de DA apresentam estudos positivos de imagem amilóide. Verificou-se que existe uma correspondência entre a ligação do composto PiB à deposição de $A\beta$ no cérebro. Também as baixas concentrações de $A\beta_{42}$ no CSF se relacionam com o diagnóstico da DA e a neuropatologia da $A\beta$ na autópsia. Os sujeitos que foram submetidos aos dois testes apresentavam baixas concentrações de $A\beta_{42}$ no CSF e testes PiB positivos, o que prova que ambos são marcadores válidos para a deposição de placas $A\beta$ no cérebro [28].

2.4.2. Biomarcadores de neurodegenerescência

Os níveis de proteína tau no CSF é um indicador das alterações patológicas que ocorrem na tau e dos danos neuronais associados. Na DA, as concentrações de tau tendem a aumentar e apesar de este não ser um biomarcador específico para a DA, está clinicamente associado à severidade da doença, sendo que elevadas concentrações de tau sugerem elevados danos cognitivos. Nos sujeitos com DA, o aumento da tau no CSF resulta da acumulação da tau nos neurónios, particularmente nos axónios [28].

A FDG-PET é usada para medir o metabolismo cerebral, que apesar de incluir muitas funções neuronais e gliais, maioritariamente indica actividade sináptica. Na DA, uma diminuição do *uptake* da FDG-PET é um indicador de disfunção sináptica [28].

O MRI estrutural pode fornecer medidas da atrofia cerebral que é o resultado da perda de neurónios, sinapses e redução dendrítica. Medidas da atrofia cerebral quer volumétricas quer

baseadas nos *voxels* mostram uma elevada correlação entre a severidade da atrofia e a severidade dos danos cognitivos nos sujeitos com DA [28].

Normalmente, as alterações dos biomarcadores de deposição de placas A β precedem aquelas verificadas pelos biomarcadores de neurodegenerescência, sendo que normalmente, as alterações verificadas acontecem pela seguinte ordem: deposição de A β (identificada pelo CSF A β_{42} ou imagens de PET amilóide), tau (CSF tau ou FDG-PET), estrutura cerebral (MRI), memória, função cognitiva. Não obstante, os biomarcadores de neurodegenerescência estão ordenados temporalmente, isto é, dados já observados sugerem que as alterações observáveis com FDG-PET precedem as alterações observáveis com MRI [28].

Capítulo 3

Técnicas de Imagiología

3. Técnicas de Imagiologia

As técnicas de imagiologia, sendo não invasivas, são actualmente bastante utilizadas no meio clínico pois permitem uma visualização com grande detalhe das estruturas anatómicas e funcionais do corpo humano, sem causar dor ou desconforto e sem haver a necessidade de se observar directamente a estrutura em análise. Este tipo de avaliação permite não só o diagnóstico, como o planeamento de uma determinada situação clínica. Os métodos imagiológicos mais utilizados actualmente, são a CT, o raio-X, a PET e a MRI. Cada modalidade é complementar e apresenta as suas vantagens e desvantagens, sendo assim necessário em alguns casos recorrer a imagens híbridas (imagens onde se faz o co-registo de imagens obtidas com várias técnicas diferentes).

3.1. Tomografia por emissão de positrões (PET)

A tomografia por emissão de positrões (PET, do inglês *Positron Emission Tomography*) é uma técnica imagiológica não invasiva. Nos últimos anos esta técnica da medicina nuclear tem-se revelado bastante proeminente por ser a mais fiável na fase de diagnóstico de determinadas doenças, como por exemplo doenças cardíacas, cerebrais (como é o caso da Doença de Alzheimer) ou mesmo doenças oncológicas.

As imagens PET são obtidas recorrendo ao uso de radionuclídeos que emitem positrões. A reacção que dá origem aos radionuclídeos ocorre em laboratório e sob condições bastante específicas, sendo estes últimos utilizados para marcar biomoléculas² que serão introduzidas no organismo do sujeito em estudo. As imagens obtidas por este método quantificam a biodistribuição e a cinética do positrão emitido no decaimento radioactivo e apresentam uma qualidade excelente quando comparadas com os outros métodos imagiológicos (como é o caso do raio-X por exemplo), revelando informação sobre os órgãos e as funções celulares dos mesmos.

A pesquisa desenvolvida nesta área permitiu aumentar o número de radionuclídeos e biomoléculas usadas, que são escolhidas consoante o objectivo do estudo. O facto de existir um elevado número de biomoléculas com diferentes fins fortaleceu a utilização das imagens PET.

² Uma biomolécula é uma molécula marcada com um radionuclídeo, o que permite que o caminho que percorre seja observado durante um exame PET.

3.1.1. Princípios físicos da PET

A estabilidade de um núcleo depende dos neutrões e protões que constituem o próprio núcleo. Assim, núcleos instáveis (radionuclídeos) podem decair, libertando energia na forma de radiação. Um núcleo estável é obtido, após se atingir uma combinação específica de neutrões e protões. Isto acontece através de sucessivas reacções.

Na reacção da equação (3-1), podemos ver o decaimento de um núcleo, através da conversão de um protão (p) num neutrão (n), emitindo um positrão (β^+) e um neutrino (ν)



Nesta reacção pode ocorrer a formação de um positrónio, através da combinação de um electrão com o positrão emitido, no entanto, para que este processo ocorra, o positrão terá que perder a maioria da sua energia viajando uma curta distância através do tecido [29]. Esta distância, a par com a energia cinética que o positrão emitido perde, e a densidade do tecido envolvente constituem alguns dos factores que influenciam a resolução da imagem [30], [31]. No processo de aniquilação, isto é, quando o electrão é transformado, a massa do positrão bem como a do electrão são convertidas em energia. Esta energia encontra-se sob a forma de um par de fótons de raios gama de 511 keV que são emitidos em direcções diametralmente opostas (ver Figura 3.1) [24].

Nos tomógrafos actuais (um *scanner* PET), os detectores, que têm a função de detectar os raios gama emitidos estão localizados num anel circular. Os detectores deverão detectar dois raios gama para que a aniquilação seja considerada válida (ver secção 3.1.2), isto é, devem ser detectados um par de fótons nos detectores dispostos no anel circular. O anel de detecção é composto por cristais de cintilação, e o seu material depende do tipo do tomógrafo (ver secção 3.1.3 - (A)) [24], [32]. Os tomógrafos com geometria de anel (como o representado na Figura 3.1), em conjunto com detectores de radiação mais eficazes, como é o caso dos detectores de cintilação, apresentam melhor eficiência na detecção para raios gama na ordem dos 511 keV.

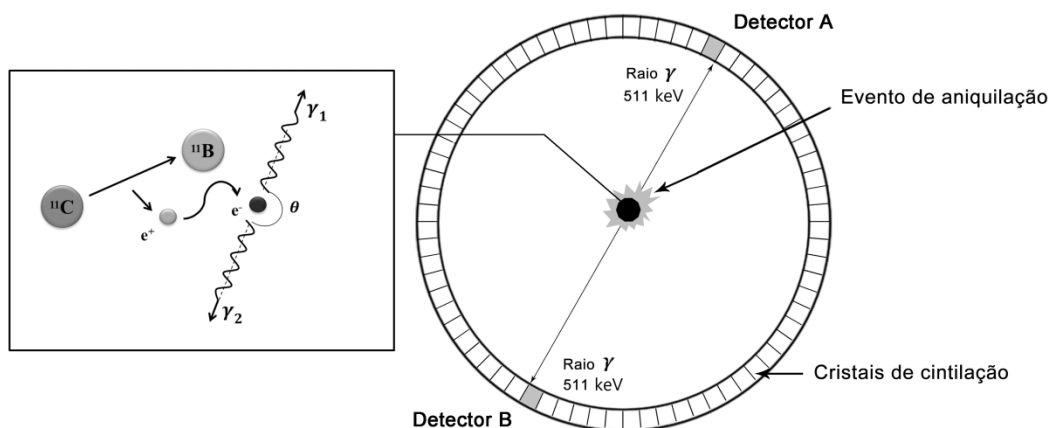


Figura 3.1: *Scanner* PET com o respectivo evento de aniquilação. À esquerda podemos visualizar a formação e aniquilação do positrão (e^+) com a consequente emissão de dois fótons gama de 511 keV em direcções opostas ($\theta \sim 180^\circ$). Adaptado de [24], [32], [33].

A Figura 3.1 mostra um processo de aniquilação com Carbono-11 que apresenta como resultado a formação de um núcleo de Boro-11 [36]. Podemos ver que os raios gama (γ_1 e γ_2) ao serem emitidos, têm entre si um raio (θ) de aproximadamente 180° [30]. A detecção ocorre em lados opostos no detector, designados na figura por Detector A e Detector B.

Para além deste radionuclídeo (o Carbono-11), existem outros com funções distintas que também são utilizados em PET. A Tabela 3.1 lista os radionuclídeos mais utilizados donde se destacam os quatro primeiros, sendo o Carbono-11 o que pode marcar um maior número de moléculas biológicas [32], [34]. O Carbono-11, alvo de estudo nesta dissertação (ver Capítulo 4), apesar de ter um tempo de semivida bastante reduzido, o que torna a sua produção e distribuição bastante difícil, é bastante vantajoso na perspectiva do paciente, uma vez que a sua exposição à radioactividade é bastante menor quando comparada com a de outros radionuclídeos [32], [34].

Tabela 3.1: Radionuclídeos mais usados em PET com os respectivos tempos de semivida ($t_{1/2}$) e a energia máxima emitida (E_{max}). Adaptado de [24], [32].

Núcleo	$t_{1/2}$ (min)	E_{max} (MeV)
^{11}C	20,4	0,959
^{13}N	9,96	1,197
^{15}O	2,03	1,738
^{18}F	109,8	0,633
^{68}Ga	68,3	1,898
^{82}Rb	1,25	3,40
^{94m}Tc	52	2,44
^{124}I	$6,0 \times 10^3$	2,13

$t_{1/2}$ – Tempo de meia vida; E_{max} – Energia Máxima.

Já o Fluor-18 é o radionuclídeo mais importante que se pode utilizar em PET [32]. Este apresenta uma energia máxima bastante reduzida o que permite a aquisição de imagens de alta resolução. Por outro lado apresenta um tempo de semivida curto o suficiente para não causar riscos ao paciente, mas suficientemente longo para se poder quantificar a sua distribuição durante um exame [34].

O Oxigénio-15 apresenta um tempo de semivida bastante curto, e inicialmente pensou-se que este poderia não ser benéfico em estudos biológicos, no entanto, alguns estudos demonstraram que este radionuclídeo apresenta grande potencial para estudos in vivo [35]. O Oxigénio-15 tem sido utilizado para medir o fluxo sanguíneo cerebral, a concentração sanguínea e o metabolismo do oxigénio [35]. O seu curto tempo de semivida apresenta-se como uma mais-valia, pois desta forma o sujeito está exposto a radiação num intervalo de tempo mais curto.

Os restantes radionuclídeos apresentados na tabela são menos utilizados uma vez que a sua produção é mais complexa. Os quatro primeiros, bem como o ^{124}I podem ser produzidos em ciclotrão o que apresenta uma vantagem para os centros de diagnóstico que possuam este equipamento [32]. A Universidade de Coimbra possui uma unidade orgânica equipada com um ciclotrão, o ICNAS (Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde). Neste ciclotrão, actualmente produz-se Carbono-11 ($[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ e $[^{11}\text{C}]\text{Raclopride}$, utilizados para o diagnóstico da doença de Alzheimer e Parkinson, respectivamente) e Fluor-18 ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$, utilizado para determinar o metabolismo da glicose cerebral ou para diagnóstico de alguns carcinomas).

3.1.2. Tipos de eventos

A detecção de eventos em PET assenta na colimação electrónica, isto é, uma câmara PET regista eventos quando detecta os fótons resultantes da aniquilação dos positrões num intervalo de tempo curto [32]. Um evento é considerado válido se [24]:

- (i) dois fótons forem detectados dentro de uma janela temporal predefinida – janela de coincidência;
- (ii) a linha de resposta (LR) formada entre os dois fótons estiver dentro do ângulo aceitável para o tomógrafo;
- (iii) a energia depositada no cristal pelos dois fótons estiver dentro da janela de energia definida.

No entanto, alguns destes eventos podem ter sido registados (mesmo respondendo aos três critérios anteriores) e tratarem-se apenas de eventos indesejados, isto é, eventos em que a detecção é acidental. Os tipos de eventos acidentais que podem ocorrer em PET são [24]:

- (i) **evento único**, acontece quando apenas um fóton é detectado pelo detector. Tipicamente 1 a 10% destes eventos são convertidos em verdadeiros eventos, isto é, eventos em que dois fótons são detectados simultaneamente;
- (ii) **verdadeira coincidência** é um evento que resulta da aniquilação de um único par positrão-electrão. Os dois fótons da aniquilação chegam ao detector em lados opostos, sem interagirem significativamente com os átomos à volta, sendo gravados na mesma janela de tempo;
- (iii) **eventos de Scatter** acontecem quando um ou ambos os fótons de uma única aniquilação sofrem o efeito de *Compton*. O efeito de *Compton* causa uma diminuição de energia nos fótons e altera a sua direcção. Contar um efeito deste tipo causa inconsistências nos dados, e leva a contrastes diminuídos e quantificações inexactas nas imagens finais;
- (iv) **coincidência aleatória** ou acidental ocorre quando dois núcleos decaem, aproximadamente, ao mesmo tempo. Depois da aniquilação dos dois positrões, quatro fótons são emitidos: dois são perdidos e outros dois (de diferentes aniquilações) são contados e considerados como provenientes do mesmo positrão. Apesar de serem considerados como válidos, estes eventos não estão correlacionados espacialmente com a distribuição do radiotraçador³;
- (v) **eventos múltiplos** são semelhantes aos eventos aleatórios, no entanto, aqui três eventos de duas aniquilações diferentes são detectados na janela de coincidência. Como existe ambiguidade na decisão sobre qual o par de eventos que provém da mesma aniquilação, o evento é ignorado.

³ Um radiotraçador é uma biomolécula marcada com um radionuclídeo. Esta molécula é administrada ao sujeito sob estudo e durante o exame segue-se o seu percurso no organismo.

Na Figura 3.2, podemos ver um detector de anel circular com os tipos de eventos acima descritos.

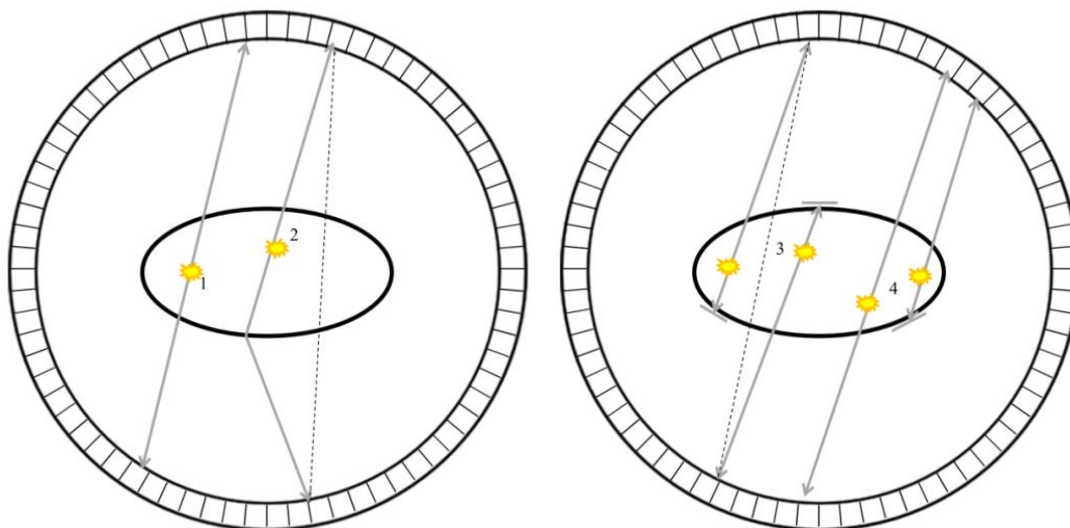


Figura 3.2: Os eventos que ocorrem em PET estão representados num sistema PET de anel conforme se pode ver na figura. A amarelo está indicado o local da aniquilação. A aniquilação marcada com 1, apresenta um evento verdadeiro, em que os dois fótons são emitidos em direcções opostas e detectados simultaneamente pelo detector. O evento assinalado pelo número 2 é um evento de *Scatter*: neste tipo de eventos, o efeito de *Compton* faz com que a energia dos fótons seja diminuída, com uma consequente alteração da sua direcção, levando a que os fótons sejam detectados em pontos diferentes (a tracejado encontra-se a LR). Uma coincidência aleatória encontra-se representada pela aniquilação 3. Neste tipo de aniquilação dois positrões são aniquilados sendo emitidos quatro fótons: dois são perdidos e dois detectados como sendo da mesma aniquilação (a LR está marcada a tracejado). Finalmente, na aniquilação 4 podemos visualizar um evento múltiplo. Aqui, acontecem também duas aniquilações, mas são detectados 3 eventos, existindo assim ambiguidade na escolha de qual o par de eventos que provém da mesma aniquilação sendo por isso o evento ignorado. Adaptado de [24].

Todos os eventos incorrectos que possam ser detectados, não contribuem de forma construtiva para a representação da imagem e devem ser corrigidos. Esta correcção não só aumenta o contraste das imagens, como ajuda a extrair informação quantitativa mais precisa das imagens PET.

3.1.3. Detecção em PET

A interacção da radiação ionizante com a matéria constitui a base através da qual os detectores de radiação são desenvolvidos. Estes detectores medem a energia total perdida ou depositada pela radiação aquando da sua passagem pelo detector [32]. Os primeiros tomógrafos, apresentavam dois detectores de cristais NaI(Tl) colocados em posições opostas na câmara, no entanto este *design* apresentava algumas limitações, como uma baixa sensibilidade e uma baixa capacidade de travar algumas gamas de energia, pois não conseguiam detectar com precisão os fótons de 511 keV [24].

(A) Detectores de Radiação

Os detectores de radiação podem ser divididos em três categorias: câmaras proporcionais, detectores de semi-condução e detectores de cintilação.

Os detectores de **câmaras proporcionais** funcionam através da detecção da ionização produzida que passa por uma câmara de gás. Estes detectores apresentam algumas desvantagens pelo que não são muito utilizados. Entre as desvantagens salienta-se a baixa densidade do gás, o que leva a uma reduzida eficiência para fotões de 511 keV e a fraca resolução em energia [24].

Nos detectores de **semi-condução** ou de estado sólido, a radiação incidente causa a excitação dos electrões da camada de valência (que têm uma forte ligação entre si), permitindo-os libertarem-se e migrarem para o cristal (a banda condutora). Estes detectores apresentam uma excelente resolução em energia apesar da sua eficiência para fotões de 511 keV ser considerada baixa [24].

Os detectores de **cintilação** são os mais interessantes e mais utilizados. Estes detectores são constituídos por um cristal inorgânico (cintilador) que emite fotões de luz visível (cintilação) após a interacção dos fotões no detector. O número de fotões cintilantes é detectado e medido através de um foto-detector e este número é normalmente proporcional à energia depositada no cristal. Estes detectores apresentam uma melhor eficiência de paragem⁴ para fotões de 511 keV, bem como, uma boa resolução em energia, pelo que são os mais utilizados em PET [24]. A atenuação, isto é, a interacção sofrida, de um detector de cintilação depende da densidade (ρ) e do número atómico efectivo (Z_{eff}) do material pelo qual o cintilador é composto. Quanto mais elevados forem estes dois valores, mais baixa será a distância que o fotão precisa de percorrer até depositar o total da sua energia no detector. As constantes de decaimento afectam as características temporais do *scanner*: um tempo de decaimento (τ) baixo facilita a contagem de cada pulso individualmente em contagens elevadas, bem como ajuda a reduzir o número de eventos aleatórios que possam ocorrer [24]. Na Tabela 3.2 podemos ver as propriedades dos cintiladores com aplicações em PET.

Tabela 3.2: Propriedades físicas dos cintiladores mais utilizados em PET. A resolução de energia foi medida a 511 keV. Adaptado de [24].

Cintilador	Z_{eff}	ρ (g/cm ³)	τ (ns)	Saída de luz (fotões/keV)	Saída de luz relativa (%)
NaI(Tl)	50,6	3,67	230	38	100
BGO	74,2	7,13	300	6	15
LSO	65,5	7,4	40	29	75
YSO	34,2	4,53	70	46	118
GSO	58,6	6,71	60	10	25
BaF ₂	52,2	4,89	0,6	2	5

Z_{eff} – número atómico efectivo do material; ρ – densidade (g/cm³); τ – tempo de decaimento (nanossegundos).

⁴ Eficiência de paragem é a média de energia perdida por unidade de comprimento do percurso do electrão. Esta variável descreve a perda de energia dos electrões enquanto se deslocam através da matéria.

Apesar dos detectores de NaI(Tl) serem cintiladores com uma boa saída de luz e resolução de energia, apresentam uma eficiência de paragem baixa o que criou a necessidade de se recorrer a outros materiais, como os listados na Tabela 3.2 [24]. A introdução destes cintiladores com um tempo de decaimento bastante reduzido permitiu o uso da informação do *tempo de voo* (TOF, do inglês *time-of-flight*) o que permitiu melhorar a relação contraste-ruído, bem como a qualidade geral da imagem, em relação às dos sistemas não-TOF [36].

(B) Tempo de Voo

A introdução de detectores de cintilação com eficiência de paragem para fótons de 511 keV, permitiu melhorar a PET, nomeadamente no uso de informação TOF. O princípio do TOF é usar a diferença de tempos na detecção de aniquilação de cada fóton de forma a estimar a localização exacta onde a aniquilação aconteceu [24], [37]. Se tivéssemos detectores suficientemente rápidos, (com resoluções temporais na ordem dos picosegundos), como existe na teoria, o TOF seria capaz de localizar os eventos de aniquilação num único *voxel*, permitindo a medida de actividade directamente num *voxel* sem a necessidade de reconstrução [37].

(C) Aquisição 2D e 3D

A aquisição de linhas de resposta (LR) oblíquas num *scanner* com configuração de anéis múltiplos, aumenta significativamente a sensibilidade. Para além da sensibilidade, também o número de eventos aleatórios e a dispersão detectada aumentam significativamente. Com um anel simples, qualquer fóton fora do plano do detector é disperso, reduzindo a fracção de dispersão detectada. A solução deste problema passa pela introdução de um septo absorvente de tungsténio entre as placas de cristal. Nos *scanners* que possuem este septo a aquisição é feita em modo 2D [24], [32].

Alternativamente pode ser usada a aquisição 3D, onde os septos não são usados e qualquer diferença entre anéis é possível. Esta aquisição baseia-se no *software* para compensar de forma exacta a elevada dispersão e eventos aleatórios que possam existir nos dados. Este tipo de aquisição requer mais memória no *scanner* de aquisição [24], [32].

(D) Correção de dados

Para que se possa extrair a correcta informação dos dados, é necessário que as imagens sejam reconstruídas e para isso aplicam-se diversas técnicas de correcção. Entre elas destacam-se a [24]:

- (i) normalização: tem em conta as variações de eficiência do detector e a electrónica associada;
- (ii) correcção para o tempo morto: esta correcção compensa os tempos mortos de contagem, particularmente em contagens elevadas (como é o caso da PET 3D);
- (iii) correcção para o decaimento: tem em conta o decaimento radioactivo durante o exame;

- (iv) correcção da atenuação: corrige dados não uniformes, provenientes de diferentes graus de atenuação (estes diferentes graus de atenuação devem-se às diferenças entre os tecidos que os fótons atravessam);
- (v) correcção de *Scatter*: tem em conta a perda de contraste e resolução de uma imagem, resultado dos eventos de *scatter* (como explicado em 3.1.2);
- (vi) correcção para efeitos aleatórios: a minimização do efeito é conseguida através da subtracção de uma aproximação da contribuição deste efeito na imagem.

A correcção dos dados adquiridos é bastante importante. Depois da correcção, o valor de cada *voxel* representa a concentração de radioactividade num determinado local. Desta forma, é possível aplicar métodos de quantificação de dados [24]. Na Figura 3.3 estão representadas duas imagens PET: em (A) a imagem não apresenta qualquer tipo de reconstrução, enquanto em (B), a imagem encontra-se reconstruída.

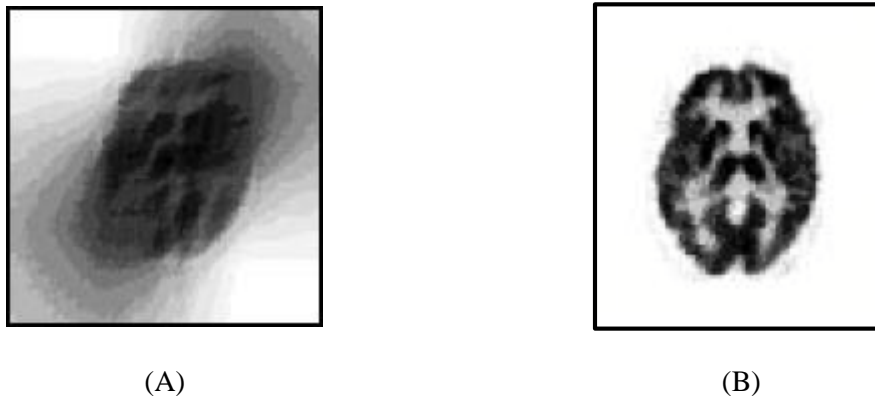


Figura 3.3: (A) Imagem PET sem reconstrução. (B) Imagem PET com reconstrução. Adaptado de [24].

(E) Reconstrução de imagem

Tal como na aquisição, a reconstrução dos dados pode ser dividida em reconstrução de dados 2D e reconstrução de dados 3D. Na reconstrução a 2D, cada plano dos dados é avaliado independentemente e cada plano trans-axial reconstruído individualmente. Os métodos mais usados são o algoritmo FBP e os algoritmos iterativos de OSEM e RAMLA [24]. O algoritmo FBP (filtro de projecção anterior – em inglês, *filtered back-projection*) utiliza a informação projectada para obter a reconstrução das imagens. É um método simples e rápido, mas pode aplicar algum ruído às imagens, pois amplifica as altas frequências. O algoritmo OSEM (do inglês, *ordered subset expectation maximization*) é um método estatístico baseado no algoritmo FBP bastante utilizado em algoritmos de reconstrução de imagem em PET. Finalmente, o algoritmo RAMLA (do inglês, *row action maximum likelihood*) estima a máxima probabilidade de uma distribuição de *Poisson* e está relacionado com o algoritmo OSEM.

Já na reconstrução a 3D, o volume de dados é usado na sua totalidade para reconstruir a imagem, sendo também consideradas todas as interacções entre planos. A reconstrução 2D é bastante mais rápida do que a 3D, pelo que é o método mais utilizado [32].

3.2. Imagens de Ressonância Magnética (MRI)

As imagens de ressonância magnética (MRI, do inglês, *Magnetic Resonance Imaging*) são também obtidas utilizando métodos não invasivos. Este tipo de imagens permite a visualização *in vivo* da morfologia, estrutura e dinâmica do corpo humano com elevado contraste e resolução. A utilização de campos magnéticos permite gerar sinais dos núcleos atômicos (normalmente do hidrogénio) que se encontram na zona que se pretende estudar, que podem ser transformados em imagens. Estas imagens apresentam características morfológicas bastante mais detalhadas do que é possível obter com as imagens de raio X.

3.2.1. Princípios da MRI

Considerando um volume arbitrário de tecido contendo átomos de hidrogénio⁵, cada protão caracteriza-se por um vector de *spin* de igual magnitude, no entanto, os vectores de *spin* de todos os protões presentes no núcleo são orientados aleatoriamente em qualquer direcção, como exemplificado na Figura 3.4. Se somarmos todos esses vectores, obtemos uma soma nula, isto é, a rede de magnetização do tecido não existe [23].

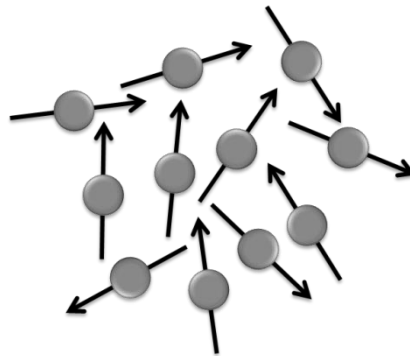


Figura 3.4: Na ausência de um campo magnético externo, os protões apresentam os seus *spins* orientados de forma aleatória. Adaptado de [23].

Da mesma forma, se colocarmos o tecido num campo magnético B_0 , os protões individuais começam a rodar perpendicularmente ao campo magnético, sendo também ligeiramente inclinados para fora do eixo do campo magnético. Apesar disto, o eixo de rotação mantém-se paralelo a B_0 . Todo este processo ocorre a uma taxa constante e devido à interacção do campo magnético com o *spin* positivo do núcleo. A taxa ou frequência, designada por *precess* é proporcional à força do campo magnético e pode ser expressa pela equação de *Larmor* [23]:

$$\omega_0 = \gamma B_0 / 2\pi \quad (3-2)$$

onde ω_0 é a frequência de *Larmor*, B_0 é a força do campo magnético e γ é a razão giromagnética.

⁵ Apesar dos conceitos de absorção e relaxação em ressonância poderem ser aplicados a qualquer núcleo com *spin*, o corpo humano é bastante rico em água e desta forma também em hidrogénio. Assim, a maioria das experiências de MR permitem a visualização de núcleos de hidrogénio.

A soma de todos os momentos magnéticos do volume de prótons é dada pelo vector magnetização \vec{M} , que está alinhado com B_0 . Este vector tem uma elevada componente na direcção B_0 : a *magnetização longitudinal* M_z , enquanto que o momento do *spin* magnético também tem uma componente transversal a B_0 : a *magnetização transversal* M_{xy} . Como os prótons não estão em fase, a componente transversal de momento do *spin* magnético a B_0 está aleatoriamente distribuída e M_{xy} é aproximadamente zero [23].

A transmissão de fótons com frequência de *Larmor* (pulsos de radio frequência – RF) pode perturbar este estado. Ao ser absorvido pelo fóton, o *spin* do próton transita para um nível de energia superior, o que o irá forçar a rodar em fase. Esta rotação irá aumentar a magnetização transversal M_{xy} . Quando o pulso RF pára, a magnetização do vector \vec{M} volta gradualmente ao estado de equilíbrio, perdendo a sua componente transversal. A este efeito dá-se o nome de relaxação [23].

A relaxação pode ser induzida por dois processos independentes: interacção *spin-lattice* ou relaxação longitudinal (relaxação T1) e interacção *spin-spin* ou relaxação transversal (relaxação T2). A relaxação T1 é o mecanismo que resulta na recuperação de M_z após a aplicação do pulso RF, já a relaxação T2 resulta numa diminuição de M_{xy} após a aplicação do pulso RF. Uma diferença bastante importante entre a relaxação T1 e T2 prende-se com a influência de B_0 . Enquanto T1 é bastante sensível a este campo magnético, T2 não o é, e só quando este último é bastante baixo, é que ocorrerão diferenças em T2.

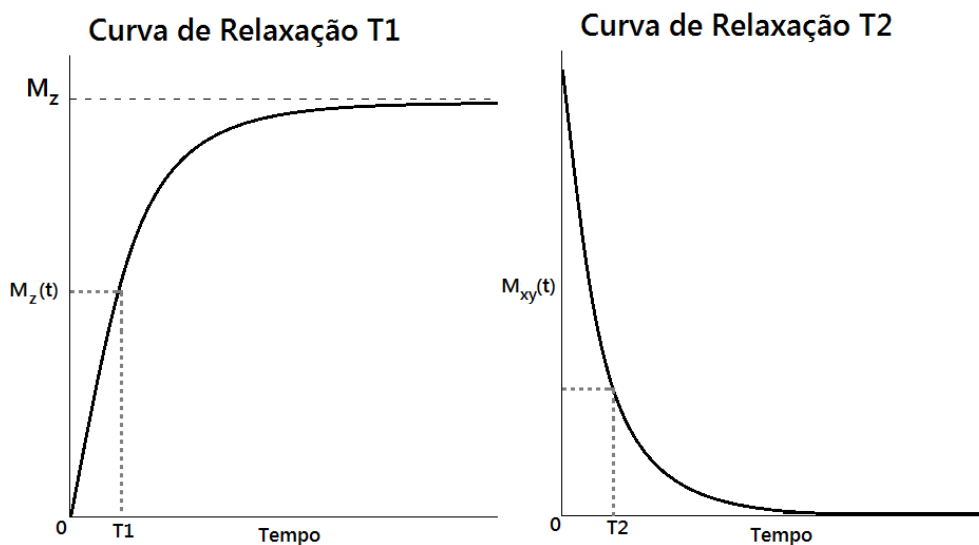


Figura 3.5: Curvas de Relaxação T1 e T2, respectivamente. Em cada curva podemos observar a magnetização dos prótons a diferentes frequências. Adaptado de [23].

3.2.2. Imagens em MR

Na Ressonância Magnética (MR, do inglês *Magnetic Resonance*) são usados três gradientes físicos, um em cada direcção: x , y e z . Cada um destes é atribuído a um gradiente lógico ou funcional necessário para a obtenção da imagem: a selecção das *slices*, a codificação das frequências e a codificação de fase. O emparelhamento destes gradientes lógicos é arbitrário, no entanto depende de alguns parâmetros como a aquisição ou posição do paciente

durante o exame, entre outros parâmetros escolhidos pelo fabricante do equipamento [23]. A combinação dos gradientes de pulso, os pulsos RF, o período de amostragem dos dados e o intervalo entre cada aquisição, utilizados para adquirir uma dada imagem, é denominada por sequência de pulsos.

A equação de *Larmor* diz-nos que a frequência particular absorvida é proporcional ao campo magnético B_0 , e a presença de um gradiente de campo magnético requer a expansão desta equação para a forma:

$$\omega_i = \gamma(B_0 + G \cdot r_i) \quad (3-3)$$

onde ω_i é a frequência do próton numa determinada posição r_i e G é o vector que representa a amplitude total e direcção do gradiente. A equação (3-3) indica que na presença de um campo magnético cada próton irá ressoar a uma frequência única que dependerá da posição exacta do próton no campo magnético.

As imagens de MR são mapas de fases e frequência dos prótons, gerados pelos campos magnéticos em cada ponto da imagem. A imagem final apresentada consiste num conjunto de elementos digitais (*pixels*) que representam elementos de volume no tecido (*voxels*). A intensidade de cada *pixel* é proporcional ao número de prótons contido em cada *voxel*, influenciado pelos tempos de relaxação $T1$ e $T2$ para cada tecido dentro do *voxel*.

3.2.2.1. Selecção de *slices*

O primeiro passo na MR é a localização da excitação do pulso RF. Este passo é conseguido através do uso de excitações de frequências definidas em conjunto com um determinado gradiente, o gradiente de selecção de *slice* (G_{SS}). A direcção do gradiente determina a orientação da *slice*, enquanto a amplitude do gradiente em conjunto com as características do pulso RF determinam a espessura e a posição da *slice*.

Um pulso RF com frequências determinadas tem duas partes: uma frequência central e uma largura de banda de frequências. As diferentes posições das *slices* são adquiridas com a alteração da frequência central enquanto a espessura da *slice* é determinada pelo G_{SS} e pela largura de banda de frequências. Normalmente, a largura de banda é fixada num determinado valor para que alterações na amplitude de G_{SS} contribuam para alterações na espessura da *slice*. Assim, quanto maior for o G_{SS} , menor será a espessura da *slice*.

Na Figura 3.6 podemos ver duas imagens obtidas com um *scanner* MRI de 1,5 Tesla, com um protocolo T1. As imagens foram obtidas segundo o protocolo descrito em [38] e retiradas da base de dados ADNI.

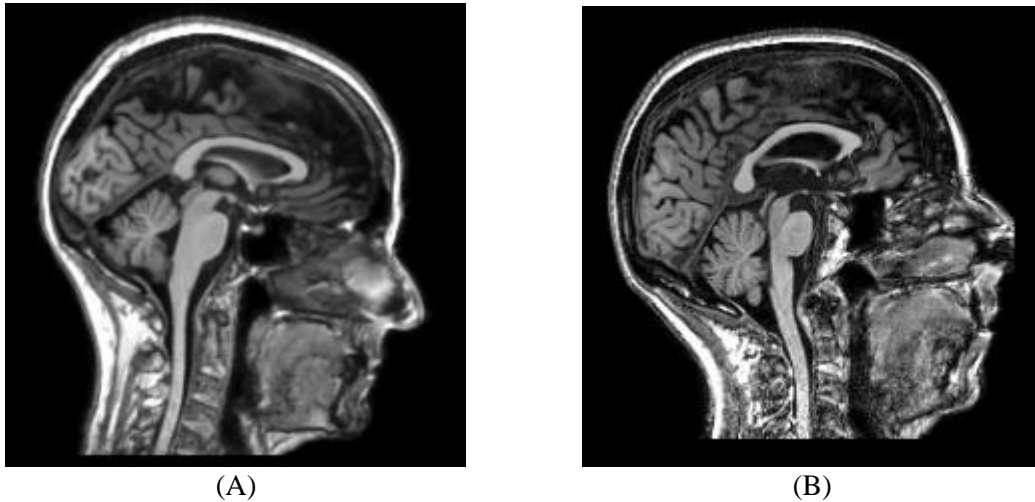


Figura 3.6: Imagens de MR, obtidas com o mesmo protocolo, de um sujeito com doença de Alzheimer (A) e de um sujeito controlo (B). Imagens obtidas no âmbito do trabalho desenvolvido nesta dissertação com o auxílio da base de dados ADNI. Ambas as imagens estão apresentadas numa vista sagital.

Na Figura 3.6 (A) podemos ver uma imagem de MR de um sujeito com doença de Alzheimer. Aqui nota-se que existe uma alteração na zona do córtex cerebral, enquanto a Figura 3.6 (B) mostra um sujeito controlo (sem qualquer patologia diagnosticada). Estas imagens foram alvo de estudo nesta dissertação e os resultados apresentados no Capítulo 5.

Capítulo 4

Quantificação de imagens PET

4. Quantificação de imagens PET

Nas últimas décadas, a tomografia por emissão de positrões (PET, do inglês *Positron Emission Tomography*) tem sofrido grandes desenvolvimentos, conferindo aos neurocientistas ferramentas fundamentais para a investigação *in vivo* do cérebro humano [39]. Os estudos cerebrais que recorrem a esta modalidade imagiológica requerem a injeção de um biomarcador, sendo que a escolha deste depende da característica fisiológica que se pretende visualizar. No Capítulo 3 foram apresentados alguns dos biomarcadores mais utilizados.

Os dados obtidos em exames PET fornecem uma medida da concentração do radiofármaco nos tecidos, sendo necessário utilizar técnicas de quantificação que transformem as concentrações obtidas em valores que quantifiquem a ligação específica do radiofármaco ao seu alvo específico [40]. Existem diversos modelos de quantificação de imagens PET, sendo tipicamente modelos biocinéticos, desde os mais simples aos mais complexos [41]. A aplicação de modelos *gold standard* para determinação das constantes cinéticas de interesse requer a obtenção de amostras de sangue arterial (como é o caso de alguns modelos de quantificação de fluxo sanguíneo [42], taxa metabólica cerebral da glicose [43] ou ligação ligando-neuroreceptor [44]). A obtenção destas amostras é um procedimento laborioso, invasivo e desconfortável, que desencoraja pacientes e voluntários a participar nos estudos, para além de implicar riscos acrescidos para os técnicos intervenientes. Existem alternativas à obtenção da função de entrada arterial por canulação, nomeadamente a sua estimação a partir de imagens PET dinâmicas ou o recurso a regiões de referência, contidas nos limites das imagens PET obtidas, onde seja negligenciável a ocorrência de ligação do radiofármaco em causa ao seu alvo específico [39], [45], [46]. Nas secções que se seguem apresentamos tanto modelos *gold standard* como alternativas aos mesmos, apresentando vantagens e desvantagens dos diferentes métodos. Discutimos ainda a aplicação de modelos de quantificação a imagens de [^{11}C]PiB.

4.1. Modelos cinéticos com função de entrada arterial

Os processos típicos de quantificação de imagens PET requerem a obtenção de amostras de sangue arterial, obtendo-se assim a função de entrada arterial (AIF, do inglês *arterial input function*), que exprime a concentração de radiofármaco nas artérias, enquanto função do tempo. Estas amostras são usualmente recolhidas através de um cateter colocado por via percutânea na artéria radial na zona do pulso. Trata-se de um processo doloroso para o paciente ou voluntário, apesar de os riscos de complicações trombóticas ou isquémicas serem bastante reduzidos [47], [48]. Apesar de não ser um processo perigoso, causa bastante desconforto, sendo dissuasor da participação de voluntários em ensaios clínicos [46]. Implica ainda a realização de processos técnicos laboriosos (nomeadamente, para distinguir actividade do radiofármaco injectada de actividade de metabolitos resultantes) e a exposição de pessoal técnico a radiação. Como alternativa à canulação arterial, pode-se estimar a AIF a partir dos dados obtidos no exame PET, expressos por imagens. Estas AIF extraídas da imagem designam-se por IDIF (do inglês *Image*

Derived Input Function). As IDIF são determinadas segmentando na imagem PET zonas de grande fluxo sanguíneo como o coração, os segmentos aórticos ou mesmo as artérias femorais. O tamanho destas estruturas vasculares faz com que os efeitos de volume parcial, que decorrem devido à impossibilidade de isolar a actividade destas estruturas na imagem, sejam quase nulos ou corrigidos facilmente [46]. No entanto, nem todas estas zonas estão sempre no campo de visão de uma imagem PET, o que torna o processo complicado. As IDIF em exames de PET cerebral recorrem geralmente a vasos sanguíneos intracranianos como é o caso das artérias carótidas [46], que pelo seu pequeno tamanho quando comparado com a resolução espacial das câmaras PET implicam que a AIF resultante terá associado algum ruído (o diâmetro da carótida é aproximadamente 5mm e a resolução espacial das câmaras PET usuais ronda os 6 mm). Há três passos fundamentais a considerar na obtenção de uma IDIF [46]:

1. Identificação da Carótida: obtida da análise da imagem PET ou através do corregristo com imagens anatómicas, por exemplo;
2. Correção de efeitos de volume parcial da curva de actividade do radiofármaco no plasma;
3. Correção para a metabolização do radiofármaco, através da obtenção da percentagem de metabolitos no sangue arterial.

O uso das IDIF foi validado em diversas situações apresentando resultados semelhantes aos obtidos com a função arterial obtida através do plasma [46]. No entanto, como referido, o recurso a estes métodos baseados na imagem tem associado diversas complicações e apresenta menor precisão no cálculo das constantes cinéticas devido aos efeitos de volume parcial [46]. Para além disto, há muitas vezes uma grande dificuldade em identificar correctamente as artérias carótidas em imagens PET ruidosas. Para se obter maior precisão, é proposto que se realize o co-registo das imagens PET com imagens estruturais. Tal tem sido tentado, mas os casos de sucesso reportados na literatura são ainda escassos. O uso de *scanners* MR-PET poderá impulsionar a utilização de IDIFs [46], [49], [50].

Como já referido, independentemente da forma como a concentração no sangue arterial seja obtida, por canulação arterial ou estimando-a a partir dos dados PET obtidos, imagens de tomografia por emissão de positrões exprimem apenas a concentração do radiofármaco presente [40], [51]. Para a realização de um estudo PET, é necessário identificar e estudar o alvo que se pretende observar para assim determinar qual o radiofármaco a administrar no sujeito. Após a administração deste, as concentrações obtidas necessitam ser corrigidas para efeitos físicos, como a atenuação e a dispersão, antes que as imagens possam ser quantificadas [24]. Após estas correções, obtêm-se as concentrações de radiofármaco em cada *voxel* [40]. Recorre-se a modelos de quantificação para isolar o sinal de interesse correspondente à ligação ao alvo específico, como representado esquematicamente na Figura 4.1. Nos modelos compartimentais usados para quantificação deste sinal, a possível distribuição do radioligando é dividida num número limitado de compartimentos representando diferentes situações físicas, como a ligação específica do radioligando ao alvo pré-definido, a sua ligação a outros receptores ou enzimas, a presença do mesmo no sangue arterial ou outras situações consideradas relevantes, dependendo do radiofármaco em questão [40], [41].

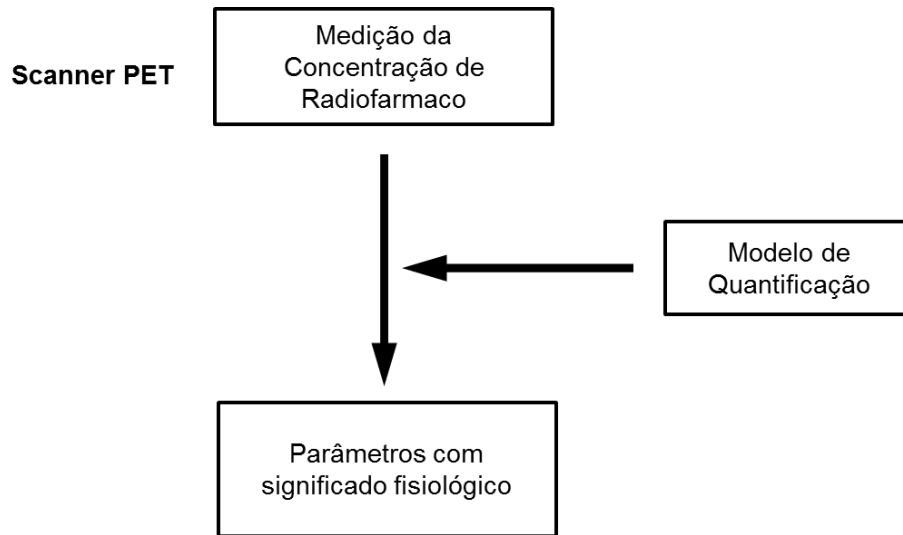


Figura 4.1: Esquema ilustrativo da utilidade dos modelos de quantificação. Adaptado de [40].

Foram propostos na literatura diferentes modelos compartimentais [42]–[44]. Na Figura 4.2 estão representados alguns dos modelos compartimentais mais simples.

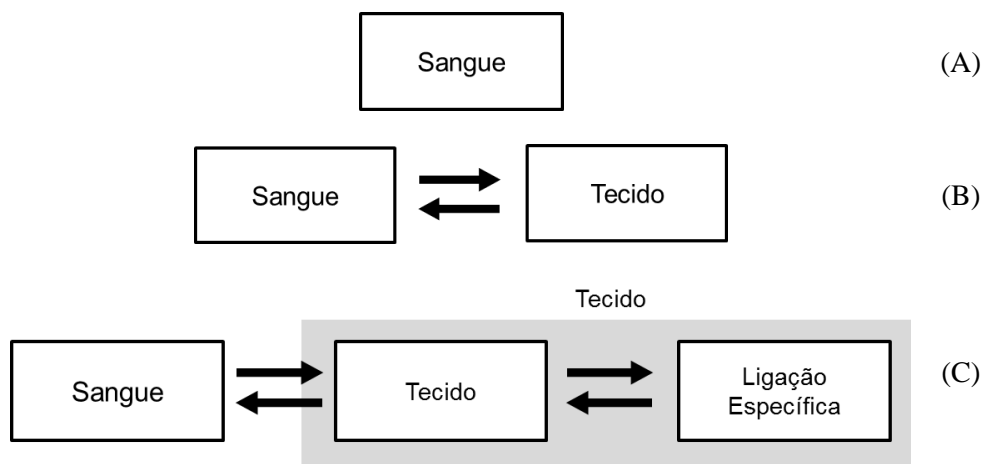


Figura 4.2: Modelos compartimentais mais usados para quantificar imagens PET. (A) Modelo com um compartimento (zero tecidos); (B) Modelo com dois compartimentos (um tecido); (C) modelo com três compartimentos (dois tecidos). Adaptado de [40].

O modelo de zero tecidos (Figura 4.2 (A)) é apropriado para modelar, por exemplo, radiotraçadores que não se deslocam para os tecidos e que permaneçam na corrente sanguínea [42]. O modelo de um tecido (Figura 4.2 (B)) representa um marcador que se desloque até ao tecido (marcador de perfusão), mas depois não se ligue a receptores ou enzimas [52]. Finalmente a Figura 4.2 (C) representa um modelo com três compartimentos. Para além do compartimento que representa o sangue arterial, existem ainda outros dois compartimentos. Este modelo pode ser usado para marcadores de actividade metabólica ou para modelos de ligação ligando-neuroreceptor. Neste último caso, em exames de PET cerebral, o primeiro tecido representa o radiotraçador livre no tecido, após atravessar a barreira hematoencefálica, enquanto o segundo representa a ligação do marcador ao alvo específico.

4.1.1. Modelo Compartimental com um compartimento

O modelo compartimental com apenas um compartimento é usado, por exemplo, para descrever a cinética de um marcador de perfusão. Um exemplo de um marcador deste tipo é o Oxigénio-15 que é livremente difusível na maioria dos organismos e também não apresenta qualquer tipo de interações metabólicas com os tecidos (é metabolicamente inerte). Um modelo compartimental associado a este marcador encontra-se apresentado em [40] e está representado na Figura 4.3.

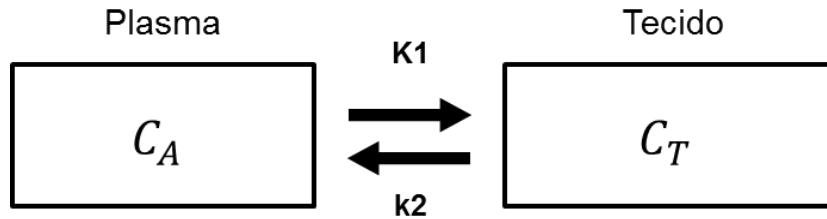


Figura 4.3: Modelo compartimental com apenas um compartimento, utilizado para descrever a cinética de marcadores de perfusão. Aqui, C_A representa a concentração do marcador no sangue e C_T representa a concentração no tecido; K_1 e k_2 são as constantes de influxo e efluxo, respectivamente. Adaptado de [40].

A figura ilustra a equação diferencial que está na base do modelo e relaciona as concentrações nos dois tecidos:

$$\frac{dC_T(t)}{dt} = K_1 C_A(t) - k_2 C_T(t). \quad (4-1)$$

Nesta equação, C_A e C_T são concentrações em função do tempo e K_1 e k_2 representam as constantes de influxo e efluxo para fora do tecido, respectivamente. Como descrito em [40] a constante K_1 é dada por:

$$K_1 = E \cdot F \quad (4-2)$$

onde E representa a fracção de extracção na primeira passagem do marcador e F o fluxo Sanguíneo (de perfusão). Aqui, E depende de F :

$$E = 1 - \exp^{-PS/F} . \quad (4-3)$$

Na equação (4-3), PS representa a área do produto permeável. Um outro importante parâmetro é o volume de distribuição V_T que reflecte o equilíbrio entre a distribuição dos marcadores:

$$V_T = \frac{C_T}{C_A}. \quad (4-4)$$

Na equação (4-4), C_T e C_A representam agora o equilíbrio (independente do tempo). Impondo estas condições de equilíbrio na equação (4-1), ou seja, igualando $dC_T(t)/dt$ a 0, obtemos:

$$V_T = \frac{K_1}{k_2}. \quad (4-5)$$

Para o Oxigénio-15, a fracção de extracção é 100%, então $E = 1$ e conseqüentemente $K_1 = F$. Da equação (4-5), temos que $k_2 = K_1/V_T$ que para o caso da água se reduz a $k_2 = F/V_T$. Assim, a equação diferencial para o modelo compartimental da Figura 4.3 fica:

$$\frac{dC_T(t)}{dt} = FC_A(t) - \frac{F}{V_T} C_T(t) \quad (4-6)$$

que ao ser resolvida apresenta a solução:

$$C_T(t) = FC_A(t) \otimes \exp\left\{-\left(\frac{F}{V_T}\right)t\right\} \quad (4-7)$$

onde \otimes representa o operador de convolução definido por:

$$(f \otimes g)(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(\tau)g(t - \tau)d\tau. \quad (4-8)$$

Na equação (4-7), temos duas variáveis que podem ser medidas e que servem assim de entrada ao modelo: a concentração no tecido C_T e a concentração de sangue C_A . A primeira destas quantidades, C_T , é medida utilizando o scanner PET, enquanto que C_A é medida através de amostras de sangue arterial ou método equivalente.

4.1.2. Modelo Compartimental de dois tecidos

Quando um ligando é introduzido na corrente sanguínea por injeção intravenosa e é transportado para o cérebro através da corrente sanguínea, o sinal captado pelo *scanner* PET traduz a soma das concentrações do ligando livre e das ligações ao alvo específico. Na eventualidade de ocorrerem também ligações não específicas, estas serão também incluídas nessa mesma soma. Esta dinâmica pode ser representada por um modelo compartimental com quatro compartimentos e três tecidos. Muitas vezes, quando a cinética do compartimento de ligação não específica é relativamente rápida pode-se combinar o compartimento associado à ligação específica ao compartimento correspondente ao radiofármaco livre, tal como representado na Figura 4.4.

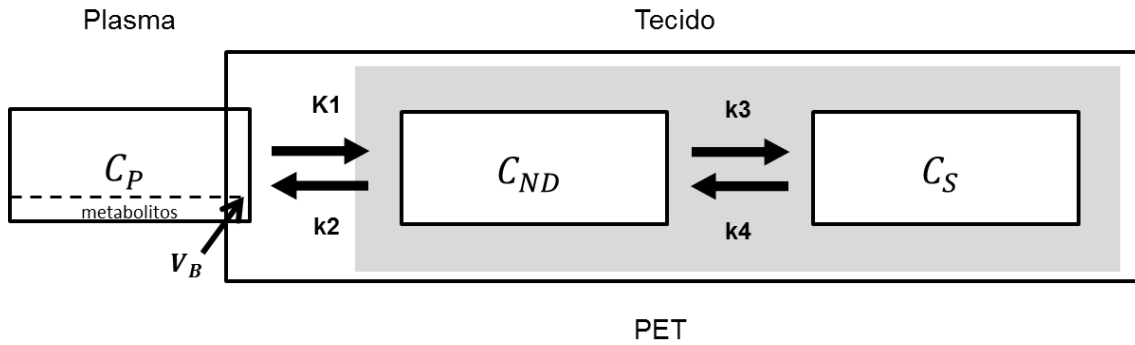


Figura 4.4: Modelo compartimental com dois tecidos, usado para estudos com receptores. Aqui, C_P , C_{ND} , e C_S representam a concentração do radioligando no plasma arterial e nos compartimentos correspondente ao radiofármaco não ligado ao alvo específico e ao ligado a esse alvo, respectivamente. Já K_1 até k_4 representam as constantes que caracterizam o transporte entre os compartimentos, sendo V_B o volume sanguíneo em cada *voxel*.

O modelo representado na Figura 4.4, apresentado em [40], apresenta algumas diferenças assinaláveis em relação ao da Figura 4.3. A primeira grande diferença é que em vez de se considerar a concentração de radiofármaco no sangue arterial (C_A) como entrada, considera-se a concentração do mesmo no plasma após correção para a metabolização, C_P . A razão pela qual esta correção é importante é que um radiofármaco injectado na corrente sanguínea é muitas vezes metabolizado no fígado, gerando outros compostos, os metabolitos. Em alguns casos estes metabolitos circulam no sangue em simultâneo com o radiofármaco originalmente injectado. O *scanner* PET consegue apenas medir radioactividade, não distinguindo entre as fontes da mesma, quando apenas se quer visualizar o percurso do radiofármaco. Outro facto representado na Figura 4.4 é que os dados captados pelo *scanner* PET em cada *voxel* representam concentrações de radioactividade em todos os compartimentos nele contidos. As equações diferenciais que traduzem o modelo representado na Figura 4.4 são dadas por:

$$\frac{dC_{ND}(t)}{dt} = K_1 C_P(t) - k_2 C_{ND}(t) - k_3 C_{ND}(t) + k_4 C_S(t) \quad (4-9)$$

$$\frac{dC_S(t)}{dt} = k_3 C_{ND}(t) - k_4 C_S(t). \quad (4-10)$$

As equações (4-9) e (4-10) podem ser resolvidas, tal como para o modelo de apenas um compartimento, resultando numa equação não linear com duas convoluções. Esta equação linear, ao ser resolvida, dá-nos os valores das quatro constantes bem como de V_B , o volume sanguíneo em cada *voxel* [40].

4.2. Modelos cinéticos com a região de referência

Como referido anteriormente, a obtenção da AIF por canulação arterial é um procedimento complexo que apresenta várias desvantagens. Como alternativa, pode obter-se uma IDIF, mas o uso das mesmas é em muitos casos desaconselhável por não assegurar precisão suficiente. Uma outra alternativa, validada para um grande número de radiofármacos, é dada pela substituição do uso de uma AIF pela estimação da concentração do marcador numa região de referência onde se assume não existir ligação específica, ver Figura 4.5. Neste modelo, proposto em [45], está

representado esquematicamente um modelo de 4 compartimentos (plasma, região de referência, compartimento livre que representa o radiofármaco após passar a barreira hematoencefálica e compartimento de ligação específica, que representa o radiofármaco ligado ao alvo específico). A resolução deste modelo consiste na determinação das constantes cinéticas (K_1 a k_4 e K'_1 e k'_2) nele envolvidas, para o qual basta o conhecimento da concentração na região de referência e em cada *voxel* da imagem. Não é assim necessária a determinação de uma AIF.

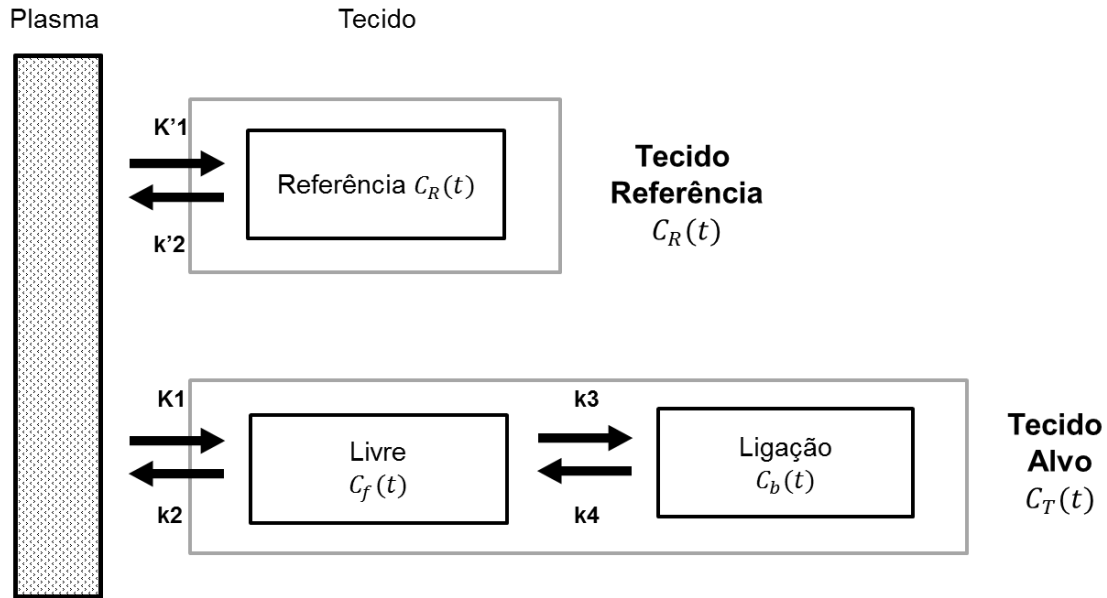


Figura 4.5: Modelo compartimental de 3 tecidos, ou 4 compartimentos. Aqui, encontra-se representado o plasma arterial, as concentrações nos compartimentos de referência, livre e de ligação específica. As constantes K_1 até k_4 , bem como K'_1 e k'_2 , caracterizam o transporte entre os compartimentos.

As equações diferenciais que traduzem o modelo representado na Figura 4.5 são dadas por:

$$\frac{dC_r(t)}{dt} = K'_1 C_p(t) - k'_2 C_r(t) \quad (4-11)$$

$$\frac{dC_f(t)}{dt} = K_1 C_p(t) - k_2 C_f(t) - k_3 C_f(t) + k_4 C_b(t) \quad (4-12)$$

$$\frac{dC_b(t)}{dt} = k_3 C_f(t) - k_4 C_b(t) \quad (4-13)$$

onde, $C_p(t)$ é a concentração do radiofármaco no plasma, $C_r(t)$ é a concentração no tecido de referência, $C_f(t)$ é a concentração no compartimento livre (sem ligação específica) e $C_b(t)$ é a concentração no compartimento com ligação específica. Das constantes representadas, K_1 é a constante de transferência do plasma para o compartimento livre, ($mL \cdot mL^{-1} \cdot min^{-1}$), k_2 é a constante de transferência do compartimento livre para o plasma (min^{-1}), k_3 é a constante de transferência do compartimento livre para o compartimento de ligação específica (min^{-1}), K'_1 é a constante de transferência do plasma para o compartimento de referência ($mL \cdot mL^{-1} \cdot min^{-1}$) e k'_2 é a constante de transferência do compartimento de referência para o compartimento do plasma (min^{-1}). Em todas as equações, t representa o tempo em minutos.

Enquanto a Equação (4-11) representa as trocas que existem entre o plasma e o tecido de referência, já as equações (4-12) e (4-13) referem-se aos compartimentos livre e de ligação específica da região de interesse, respectivamente. No entanto, note-se que $C_f(t)$ e $C_b(t)$ não podem ser medidos separadamente, apenas a concentração total pode ser medida:

$$C_t = C_f + C_b . \quad (4-14)$$

Em [45], foi proposta a simplificação das equações (4-11) a (4-14) assumindo as relações:

$$R_1 = K_1/K'_1 \quad (4-15)$$

$$K'_1/k'_2 = K_1/k_2 \quad (4-16)$$

$$k_4 = k_3/BP . \quad (4-17)$$

Devido às relações assumidas nas Equações (4-15) a (4-17), restam apenas 4 parâmetros para determinar [53]. No entanto, existem situações em que o compartimento livre e os compartimentos específicos são difíceis de distinguir e neste caso, o modelo de referência do tecido deve ser simplificado novamente. Neste caso, a equação (4-11) pode ser substituída por:

$$\frac{dC_t(t)}{dt} = K_1 C_p(t) - k_{2a} C_t(t) \quad (4-18)$$

onde k_{2a} (min^{-1}) é a taxa aparente de transferência do compartimento com ligação específica para o plasma. Como a equação (4-18) apresenta uma boa representação da cinética do marcador [45], então, o correspondente volume de distribuição deverá ser dado por:

$$K_1/k_{2a} = K_1/k_2 \cdot (1 + BP). \quad (4-19)$$

A partir das equações (4-11), (4-16), (4-18) e (4-19), chegamos à expressão simplificada proposta em [45], com apenas três parâmetros, onde BP é o potencial de ligação:

$$C_t(t) = R_1 C_r(t) + k_2 - \frac{R_1 k_2}{1 + BP} C_r(t) \otimes \exp\left(-\frac{k_2 t}{1 + BP}\right) . \quad (4-20)$$

O Potencial de ligação (BP) é um índice do marcador de ligação específica em estudos de receptores de radioligando em PET. Este é um importante parâmetro a avaliar pois dá-nos uma medida combinada de dois parâmetros: a densidade de neuroreceptores livres e a afinidade de um radiofármaco para com o neuroreceptor [54].

4.3. Determinação de parâmetros cinéticos

Como descrito na secção anterior, *Lammertsma et al* [45] propuseram um método para a simplificação das Equações (4-11) a (4-13), reduzindo-as a uma única equação na qual restam apenas 3 parâmetros para determinar, como descrito em (4-20). Esta simplificação pode ser aplicada a ligandos que apresentem taxas de ligação entre o compartimento livre e o compartimento de ligação específica suficientemente rápidos. Neste caso, assume-se que a região de interesse do tecido pode ser aproximada a um único compartimento, como exemplificado na Figura 4.5 Neste trabalho analisam-se três métodos propostos na literatura para modelar a cinética de radiofármacos que sigam esta suposição. Em particular, estudam-se dois modelos cinéticos de tecido de referência, o SRTM (do inglês *Simplified Reference Tissue Model*) e o RPM (do inglês *Receptor Parametric Mapping*), bem como o método de análise gráfica, recorrendo também a uma região de referência, proposto por *Jean Logan*.

Como referido antes, modelos de referência são menos invasivos que o *gold standard* que exige canulação arterial. Foram já validados para um conjunto de radiofármacos, em particular para [¹¹C]PiB [55]. Os métodos são, neste trabalho, aplicados a imagens PET obtidas recorrendo a este radiofármaco num trabalho conjunto entre o Instituto Biomédico de Investigação de Luz e Imagem (IBILI), Instituto de Ciências Nucleares aplicadas à Saúde (ICNAS) e o grupo da Doutora Isabel Santana no Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra (CHUC).

4.3.1. SRTM

O SRTM baseia-se no método dos mínimos quadrados não lineares para resolver a equação (4-20). Na sua versão linear, a ideia deste método matemático pode ser exemplificada considerando o conjunto dos pontos representados a azul na Figura 4.6. Denotem-se estes pontos por (x_i, y_i) , onde i é um número natural que varia entre 1 e n . Usando o método dos mínimos quadrados, é possível encontrar os parâmetros a e b da curva $y = ax + b$ que está mais próxima dos pontos. Tal faz-se minimizando a distância de cada ponto a essa mesma curva. Matematicamente, o objectivo é encontrar os valores dos parâmetros a e b que minimizam a quantidade:

$$\sum_{i=1}^n [y_i - (ax_i + b)]^2 . \quad (4-21)$$

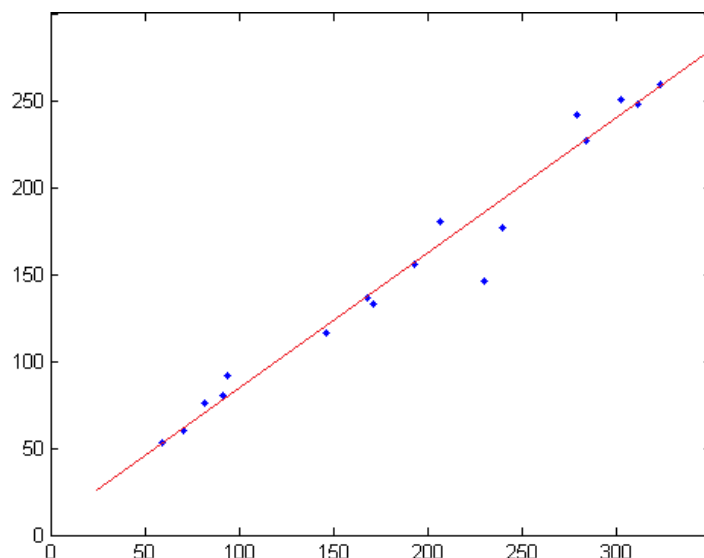


Figura 4.6: Exemplo de uma regressão linear com um conjunto de pontos aleatório.

Na aplicação do SRTM à determinação das constantes cinéticas (R_1 , k_2 e BP) que minimizem (4-20), o objectivo é minimizar

$$\sum_{i=1}^n \left\| C_t(t) - \left[R_1 C_r(t) - k_2 + \frac{R_1 k_2}{1 + BP} C_r(t) \otimes \exp\left(-\frac{k_2 t}{1 + BP}\right) \right] \right\| \quad (4-22)$$

onde n representa o número de *frames* do exame PET e $\|\cdot\|$ representa uma norma, tipicamente a norma euclidiana. Devido à exponencial presente nesta função, não se pode aplicar o método de mínimos quadrados lineares ilustrado na figura anterior. Aplica-se ao invés um método de mínimos quadrados não-lineares. A natureza não linear deste método torna-o bastante lento quando comparado com outros métodos e faz com que as imagens obtidas apresentem algum ruído. Os resultados obtidos através deste método estão apresentados na Figura 4.7 para o exemplo de um sujeito com doença de Alzheimer.

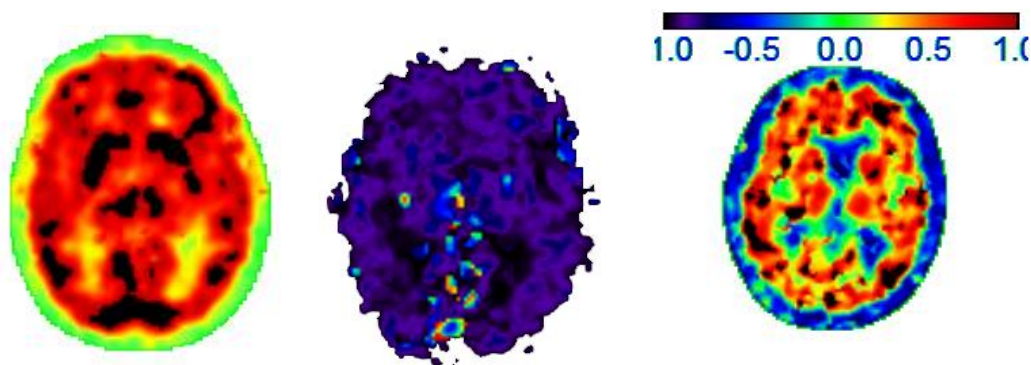


Figura 4.7: Representação de R_1 , k_2 e BP , respectivamente, para dados PiB com quantificação SRTM. A barra de cores da última imagem é representativa para todas as imagens.

4.3.2. RPM

Apesar de o método SRTM [45] ter sido validado e aplicado com sucesso em regiões de interesse, a sua aplicação ao nível de *voxels* usando o método dos mínimos quadrados para a determinação dos parâmetros é demasiado lenta e apresenta resultados com algum ruído, como se pode observar na Figura 4.7. Uma alternativa de resolução sem o recurso a mínimos quadrados foi proposta em [56]. A ideia passa por linearizar a equação (4-20). Note-se que a mesma pode ser reescrita como

$$C_T(t) = \theta_1 C_R(t) + \theta_2 C_R(t) \otimes \exp^{-\theta_3 t} \quad (4-23)$$

em que $\theta_1 = R_1$, $\theta_2 = k_2 - R_1 k_2 / (1 + BP)$ e $\theta_3 = k_2 / (1 + BP) + \lambda$. Na expressão, λ é o tempo de decaimento do radiofármaco em estudo.

A equação (4-23) é linear para θ_1 e θ_2 , para valores fixos de θ_3 . Para cada valor de θ_3 , as constantes θ_1 e θ_2 podem então ser calculadas através do método dos mínimos quadrados lineares. Em [56], é proposto que se faça uma escolha *a priori* de conjunto discreto de possíveis valores que o parâmetro θ_3 poderá tomar. Para cada um destes valores, expressos por θ_{3_i} (é proposto que i varie entre 1 e 100, embora se possa utilizar um maior número de aproximações iniciais) calcula-se a função base correspondente:

$$B_i(t) = C_R(t) \otimes \exp^{-\theta_{3_i} t} . \quad (4-24)$$

Desta forma, a expressão (4-23) pode ser reescrita como:

$$C_T(t) = \theta_1 C_R(t) + \theta_2 B_i(t) . \quad (4-25)$$

A expressão resultante pode ser abordada através do método dos mínimos quadrados lineares, para cada função base. Para cada valor de θ_{3_i} , pode-se então facilmente calcular os termos R_1 , k_2 e BP . Os parâmetros cinéticos finais obtidos recorrendo a este método são os que correspondem ao valor de i que mais minimiza (4-23).

Na Figura seguinte estão representados os mapas de R_1 , k_2 e BP , correspondentes aos da Figura 4.7, obtidos com o método RPM.

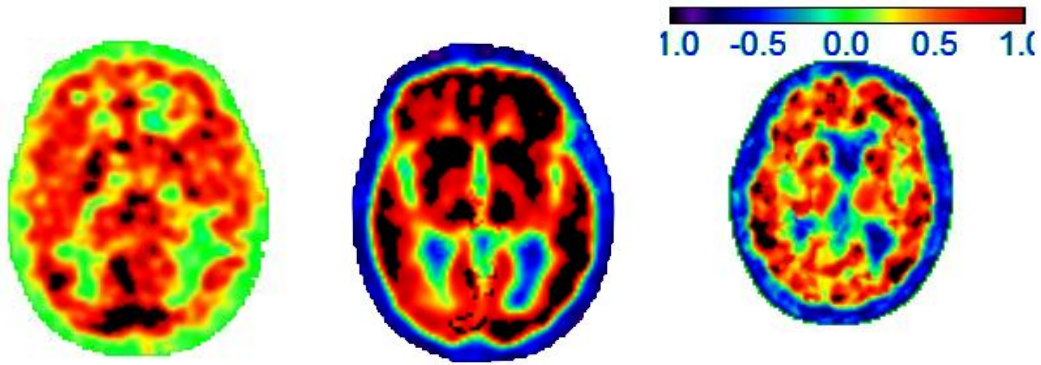


Figura 4.8: Representação de R_1 , k_2 e BP, respectivamente, para dados PiB com quantificação RPM. A barra de cores da última imagem é representativa para todas as imagens.

4.3.3. Método gráfico de Logan

Jean Logan propôs um método gráfico de resolução da equação (4-20) em [57]. Para o descrever, comece-se por analisar o modelo compartimental representado na Figura 4.9:

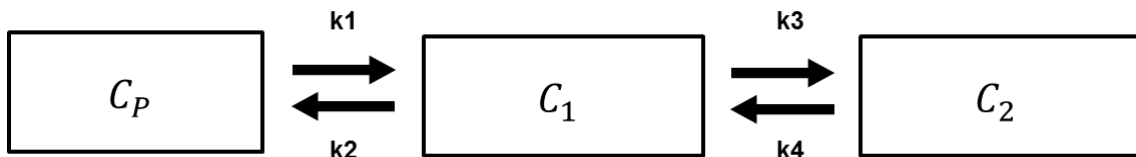


Figura 4.9: Modelo compartimental proposto por *Jean Logan*. Adaptado de [57].

e traduzido pelas equações diferenciais:

$$\frac{dC_1}{dt} = K_1 C_p(t) - (k_2 + k_3)C_1 + k_4 C_2 \quad (4-26)$$

$$\frac{dC_2}{dt} = k_3 C_1 - k_4 C_2 \quad (4-27)$$

onde C_1 e C_2 (nCi/mL) são concentrações para cada compartimento num determinado tempo t . As constantes de transferência k_2 , k_3 e k_4 (min^{-1}) descrevem, respectivamente, o efluxo do tecido para o plasma, a ligação específica do traçador para o receptor, transportador ou enzima e a dissociação da ligação específica. K_1 ($mL min^{-1} mL^{-1}$) descreve a transferência do plasma para o tecido e é uma função do fluxo sanguíneo, da permeabilidade dos capilares e da ligação. C_p é a concentração do plasma (nCi/mL) do traçador não modificado.

Denotando, como em [57], por $ROI(t) = C_1 + C_2 + V_p C_p$ a soma das actividades de todos os compartimentos numa dada região de interesse e ainda a contribuição do volume regional de sangue V_p , podemos deduzir das equações anteriores a relação:

$$\frac{\int_0^t ROI(t') dt'}{ROI(t)} = \left[\frac{K_1}{k_2} \left(1 + \frac{k_3}{k_4} \right) + V_p \right] \frac{\int_0^t C_p(t') dt}{ROI(t)} + int \quad (4-28)$$

que é linear quando o termo int , dado por:

$$-\frac{1}{k_2} \left[1 + \frac{k_3}{k_4} \right] - \frac{C_2(t)}{k_4 [C_1(t) + C_2(t)]}. \quad (4-29)$$

é constante e se negligencia V_p . Define-se o Rácio do Volume de Distribuição (DVR, do inglês *Distribution Volume Ratio*) por:

$$DVR = \frac{\frac{K_1}{k_2} \left(1 + \frac{k_3}{k_4} \right)}{K_1^{ref} / k_2^{ref}} = 1 + \frac{k_3}{k_4} \quad (4-30)$$

assumindo que K_1/k_2 é igual em todo o cérebro. O DVR está então relacionado com o potencial de ligação (BP) pela relação

$$DVR = BP + 1 \quad (4-31)$$

O DVR pode ser calculado aplicando (4-28) e (4-30) tanto em cada *voxel* ou região de interesse quanto numa região de referência.

Ainda em [57], propõe-se a substituição da equação (4-28) pela equação funcional:

$$\frac{\int_0^T ROI(t) dt}{ROI(t)} = DVR \left[\frac{\int_0^T REF(t) dt + \frac{REF(T)}{\bar{k}_2^{ref}}}{ROI(T)} \right] + int' \quad (4-32)$$

onde não entra $C_p(t)$, sendo portanto um modelo de referência para o qual não é necessária a determinação de uma AIF. Assumindo que o termo int' é constante, e negligenciando o termo \bar{k}_2^{ref} quando $(DVR/k_2)REF(T)/ROI(T)$ é pequeno ou razoavelmente constante, o DVR pode ser facilmente determinado usando mínimos quadrados lineares.

Para obter um resultado comparável com os das subsecções anteriores, aplicou-se o método de referência de *Logan* expresso na equação (4-32) ao mesmo sujeito cujo exame PET foi quantificado nas subsecções anteriores. Tendo-se calculado o DVR, usou-se a equação (4-31) para determinar o Potencial de Ligação (BP). Obteve-se assim o mapa representado na Figura 4.10.

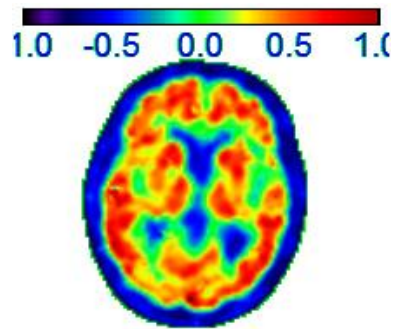


Figura 4.10: Representação de BP para dados PiB com quantificação *Logan*.

4.4. Resultados

A avaliação das constantes cinéticas associadas a um determinado radiofármaco permite quantificar a sua afinidade para com o neuroreceptor. Neste caso, pretendemos avaliar a afinidade do radiofármaco [^{11}C]PiB com a proteína A β . No contexto da doença de Alzheimer, no caso de sujeitos em que exista uma elevada afinidade, está-se perante um possível caso de doença de mas se por outro lado, a afinidade for baixa, então o sujeito apresentará menos probabilidade de ter DA.

4.4.1. Ponderação dos parâmetros escolhidos

A afinidade do radiofármaco pela molécula alvo é medida pelo potencial de ligação – BP. Em termos simplistas, quanto maior o valor de BP, maior será a suspeita de o sujeito em estudo sofrer de DA.

O BP para os métodos apresentados acima foi avaliado separadamente, e seguidamente apresenta-se uma explicação sobre a forma de obtenção. Na Figura 4.11 podemos ver a representação de BP para os três métodos discutidos.

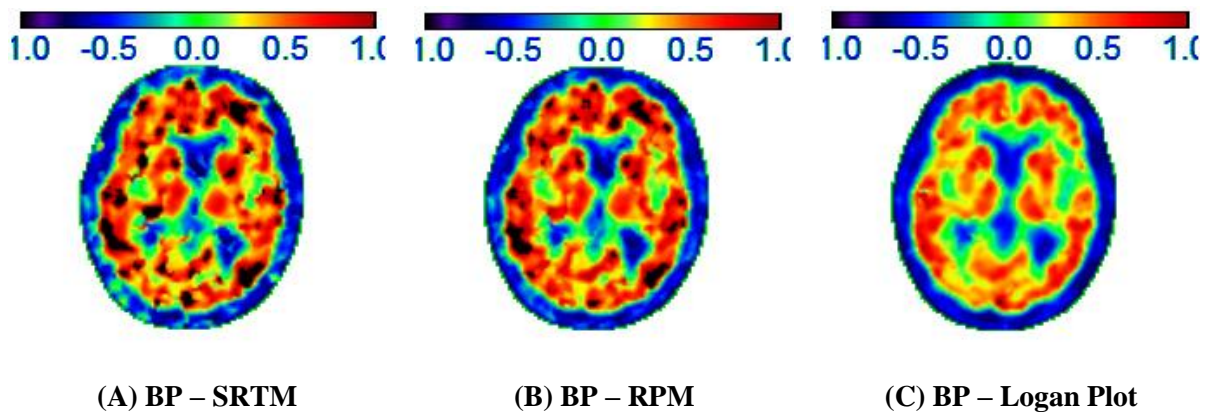


Figura 4.11: Representação de BP para os 3 métodos implementados.

4.4.1.1. SRTM

No caso do método de resolução através dos mínimos quadrados não lineares (ver secção 4.3.1), representado na Figura 4.11 (A) podemos ver que o valor de BP é sobrestimado em relação aos outros métodos. Esta sobrestimação indica-nos a existência de zonas com possível afinidade, que poderão levar erradamente a um possível diagnóstico da doença de Alzheimer. Este método, para além de sobrestimar os dados, é computacionalmente bastante lento.

4.4.1.2. RPM

O método proposto por *Roger Gunn* [56] propõe fixar *a priori* um conjunto de valores para θ_3 e obter para cada um destes uma aproximação dos parâmetros cinéticos, escolhendo-se por fim os que minimizem o erro cometido.

Assim, o valor de θ_3 apenas será fixado, para cada *voxel*, quando a diferença entre calculada curva do modelo e a curva de actividade nesse *voxel* for mínima. Para calcular o valor mínimo, assumiu-se que θ_3 poderia variar entre 6 gamas de valores, incluindo o intervalo de valores proposto em [56]. Na Figura 4.12 estão representados para um *voxel* os valores dos erros obtidos em função dos valores de θ_{3_i} para as gamas de valores que foram atribuídas a θ_3 .

Com a análise dos gráficos da Figura 4.12, para o *voxel* em causa, verificou-se que o valor de θ_3 rondava os 0.0005, como tal, uma gama de valores entre 0.0001 e 0.001 seria suficiente para a análise, fixando-se assim θ_3 a variar entre [0.0001, 0.001]. Verificou-se que esta gama de valores, próxima da proposta em [56], fazia sentido também para os outros *voxels*.

Para o cálculo da função base em (4-24), é necessário não só escolher a janela de valores de θ_3 , como o número de valores de θ_{3_i} a testar. O algoritmo RPM foi testado escolhendo 100, 500, 1000 e 2000 valores de θ_{3_i} , respectivamente. Não se encontrando melhorias de precisão assinaláveis quando se usou um maior número de valores, optou-se por propor sempre apenas 100 valores de θ_{3_i} , como aliás recomenda [56].

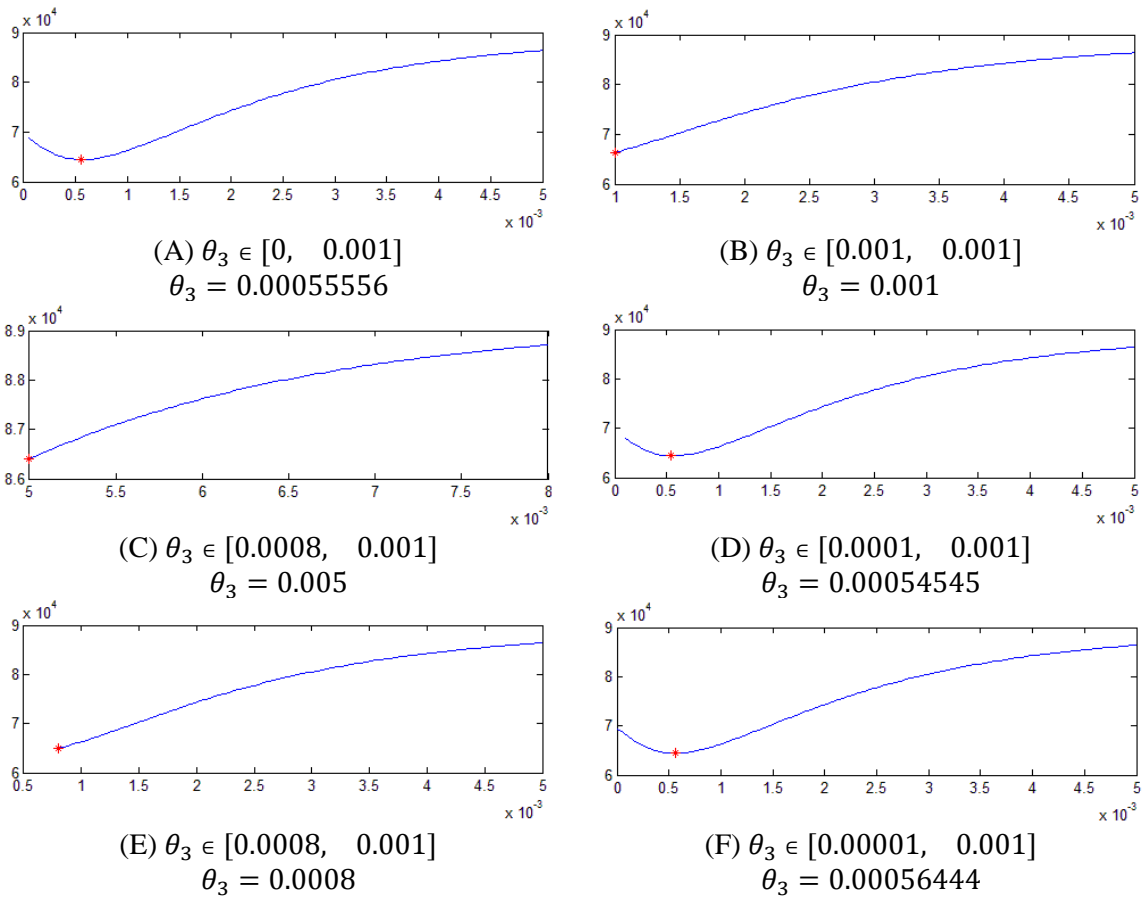


Figura 4.12: Variação dos valores de θ_3 para a obtenção do parâmetro final θ_3 . Os valores finais de θ_3 são os indicados na legenda de cada gráfico. A estrela a vermelho indica o valor de θ_3 .

4.4.1.3. Logan Plot

O método de análise proposta por *Logan* [57] é rápido e evita a sobrestimação verificada no uso do SRTM. Na Figura 4.11 (C), podemos observar os resultados da quantificação de BP com este método. Na Figura 4.13 podemos observar uma representação gráfica da linearidade esperada para a equação (4-32). Na figura, representa-se $\int REF(t)/ROI(T)$ em função de $\int ROI(t)/ROI(t)$. Como podemos ver na equação (4-32), e tendo em conta que o termo \bar{k}_2^{ref} pode ser negligenciado, o declive da recta é dado para cada *voxel* pelo parâmetro a determinar, DVR.

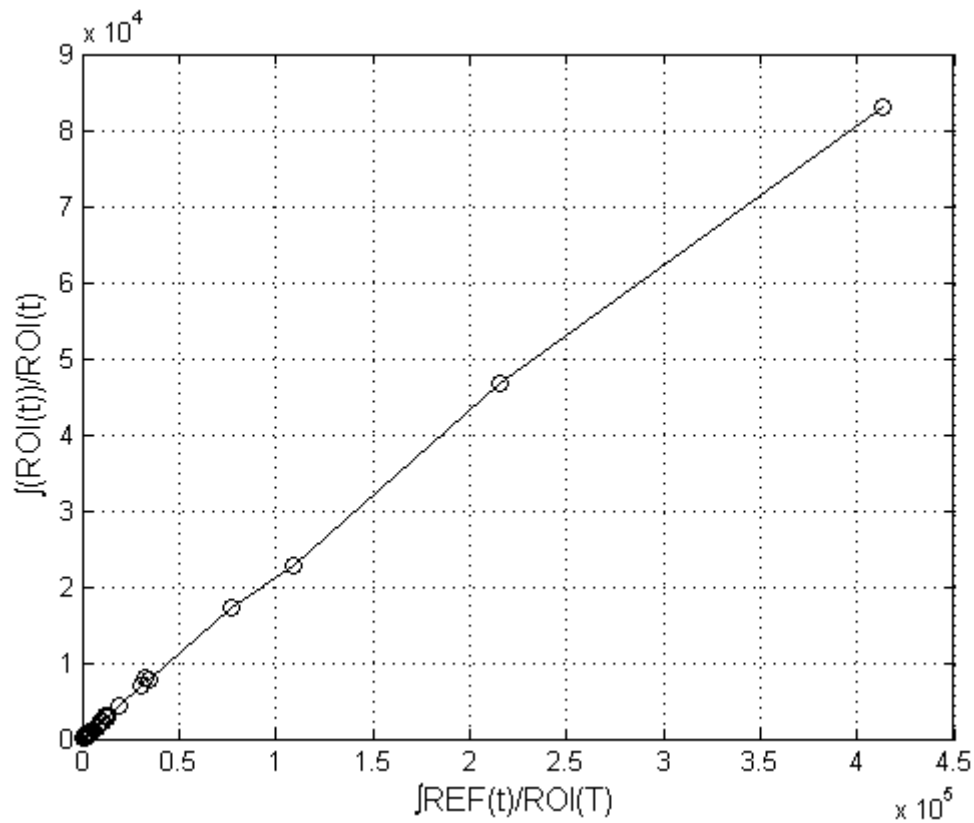


Figura 4.13: Representação da equação (4-32). O declive da recta representa o DVR.

4.4.2. Comparação dos métodos apresentados

Os métodos apresentados anteriormente pretendem quantificar imagens PET através da estimação de parâmetros cinéticos.

Para realizar uma comparação dos métodos entre si, representou-se o BP dos *voxels* individuais de cada método, confirmando-se assim a sobrestimação que possivelmente poderia existir entre cada método. Os resultados estão apresentados nas figuras seguintes.

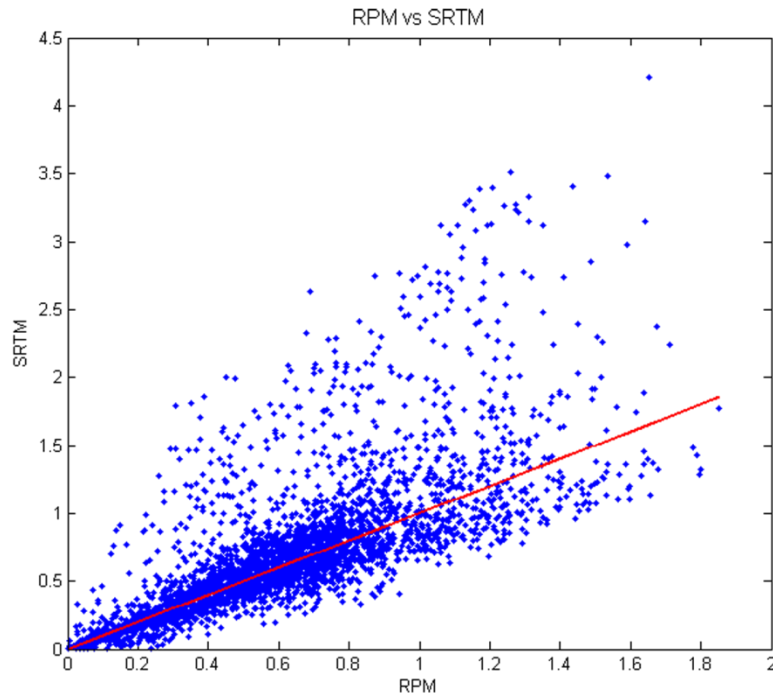


Figura 4.14: Comparação entre os métodos RPM e SRTM.

Na Figura 4.14, podemos ver a comparação entre os métodos RPM e SRTM. Estes métodos apresentam alguma dispersão, o que pode ser explicado pela sobrestimação dos *voxels* que existe no algoritmo de SRTM, esperada devido ao carácter não linear deste.

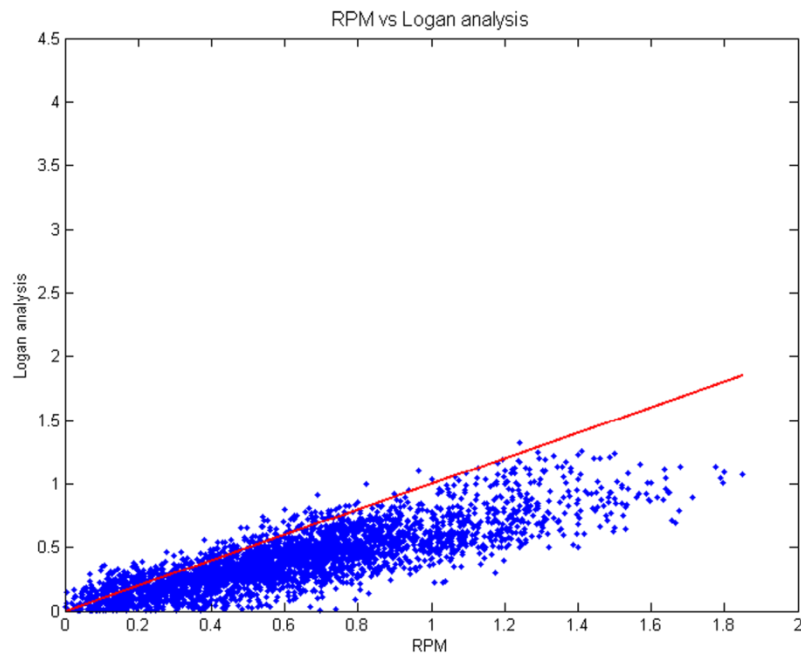


Figura 4.15: Comparação entre os métodos RPM e *Logan Analysis*.

A comparação da Figura 4.15 mostra que o RPM e a análise de *Logan* permitem obter resultados semelhantes. Os *voxels* dispersos no método RPM mostram que poderá existir uma pequena sobrestimação no método RPM quando comparado com o de *Logan*. No entanto, esta sobrestimação pode ser negligenciada, uma vez que é num conjunto reduzido de *voxels*.

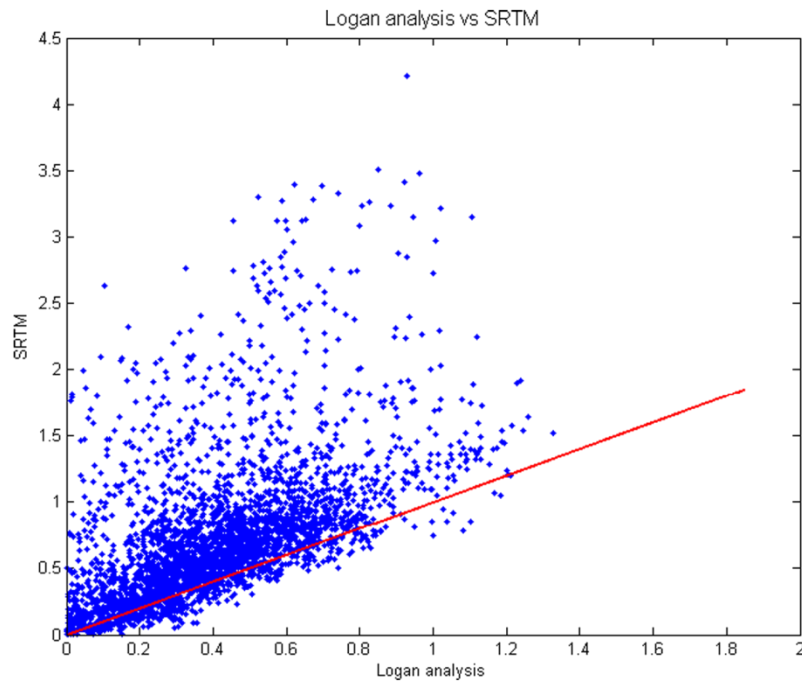


Figura 4.16: Comparação entre os métodos *Logan Analysis* e SRTM.

Na Figura 4.16, é apresentada a comparação entre os métodos de Logan e SRTM. Tal como na Figura 4.14, a dispersão observada no método SRTM deve-se à sobrestimação deste.

4.5. Conclusão

As imagens PET requerem uma quantificação prévia anterior à sua análise estatística. No entanto, para que esta quantificação aconteça é necessário que se obtenha a função de entrada arterial (AIF). Esta função pode ser obtida através de canulação arterial, isto é, por introdução de um cateter por via percutânea na artéria radial, tornando o processo invasivo e doloroso para os sujeitos. Como alternativa, surgiram as IDIF, que são determinadas através da segmentação das imagens PET em zonas de grande fluxo sanguíneo. Mas se as primeiras são bastante invasivas, desencorajando os sujeitos a voluntariarem-se, as IDIF apresentam outro problema pois as estruturas vasculares mais fáceis de segmentar nem sempre estão no campo de visão do *scanner* PET, tornando a estimação da AIF imprecisa. A estimação da concentração do marcador numa região de referência apresenta-se assim como alternativa para as AIF e as IDIF.

A determinação dos parâmetros cinéticos recorrendo a modelos de região de referência é um método não invasivo traduzido por equações diferenciais, podendo nalguns casos as mesmas ser expressas por equações simplificadas como a equação (4-20). Dos parâmetros cinéticos que aparecem nesta equação, aquele com maior significado fisiológico é geralmente o BP, o

potencial de ligação. A resolução da equação (4-20) pode ser feita -com métodos diferentes, diferindo também as vantagens e desvantagens destes decorrentes. O SRTM pretende resolver a expressão da equação (4-20), encontrando o ponto (ou por outras palavras, o conjunto de parâmetros cinéticos) que minimiza a disparidade entre os dois lados da equação. Este método sobrestima muitas vezes o valor de BP, apresentando um valor demasiado elevado para este parâmetro. Devido à natureza não linear deste método, o tempo de computação é elevado. Por seu lado, o método RPM lineariza o último termo do membro direito da equação (4-20). Daí advém um método computacionalmente bastante rápido que foi validado para vários marcadores. Já o método de resolução gráfico proposto por *Jean Logan* foi também validado para diversas situações e fornece resultados bastante semelhantes ao RPM.

Capítulo 5

Morfometria *voxel-a-voxel*

5. Morfometria *voxel-a-voxel*

A morfometria *voxel-a-voxel* (VBM, do inglês *Voxel-Based Morphometry*) é um método de análise de imagem que permite a detecção de diferenças anatômicas ou funcionais entre cérebros de sujeitos com diferentes patologias ou em cérebros examinados em diferentes momentos [58]. Para a detecção de diferenças morfológicas são usualmente analisados exames T1 de Ressonância Magnética. Após um pré-processamento que torna as imagens obtidas comparáveis entre si, usam-se testes estatísticos para os *voxels* ou grupos de *voxels* correspondentes a uma mesma posição nas várias imagens [59], [60]. Como resultado final do VBM, são tipicamente obtidos mapas estatísticos onde se podem visualizar as diferenças significativas detectadas [60].

Nesta dissertação, o VBM será utilizado para detectar alterações entre sujeitos saudáveis e sujeitos que sofrem da doença de Alzheimer, em diferentes fases da doença, bem como para aferir a relação entre testes cognitivos realizados pelos sujeitos e dados de imagem obtidos para os mesmos [16], [61].

5.1. Introdução

Uma imagem MRI permite detectar diferenças anatômicas, mas por exigências de rigor ou porque muitas vezes as diferenças não são visíveis a olho nu, são necessários métodos adequados que as identifiquem de forma sistemática. O VBM é um método que usa estatística para detectar alterações nos tecidos cerebrais entre dois grupos de sujeitos [60]. Este método compara volumes regionais de tecidos, gerando mapas estatísticos onde são visíveis estas alterações [60]. No caso de imagens estruturais de ressonância magnética, o VBM pode ser utilizado para comparar grupos de controlos com grupos de doentes. Para permitir esta comparação, os dados utilizados no VBM são antes pré-processados em 3 passos. Em primeiro lugar realiza-se a normalização espacial das imagens para o mesmo espaço estereostático, seguida da sua segmentação em matéria branca, cinzenta e líquido cefalorraquidiano. Finalmente, as imagens são suavizadas e este pré-processamento culmina numa análise estatística que permite comparar grupos de imagens e verificar onde existem diferenças.

Nos últimos anos, os estudos com VBM têm sido bastante eficazes na análise de algumas doenças que apresentam diferenças estruturais no cérebro, como é o caso de demências como a esquizofrenia, autismo, distúrbios cognitivos, síndromes de *Kallman* e *Klinefelter*, distúrbios de bipolaridade, epilepsia, síndrome de *Down*, doença de Parkinson, doença de Huntington, doença de Alzheimer e afasias progressivas [62]–[65]. Por exemplo, *Gitelman et al.* [64] realizaram um estudo que consistia em comparar concentrações de matéria cinzenta em sujeitos com anomalias bastante graves (encefalite herpética), o que permitiu identificar extensas alterações anatômicas no sistema límbico e paralímbico dos sujeitos com anomalia. Existem também alguns estudos que mostram como o VBM pode ser utilizado para detectar atrofia no hipocampo de pacientes com epilepsia [63].

Para além da aplicação à determinação de alterações entre sujeitos doentes e sujeitos saudáveis, o VBM também é usado em estudos em que o mesmo grupo de sujeitos, doentes ou controlos, é acompanhado ao longo do tempo. Como exemplo de estudos numa população de voluntários saudáveis, *Maguire et al.* [65] investigaram o impacto da aprendizagem e da prática em estruturas cerebrais. Estes investigadores pretendiam detectar as diferenças estruturais que poderiam existir em cérebros dos taxistas londrinos como resultado da sua aprendizagem de navegação espacial. Concluíram que o hipocampo posterior destes sujeitos estava bastante mais desenvolvido que nos restantes participantes, nos quais o hipocampo anterior apresentava maior desenvolvimento.

Apesar de ser um método aceite actualmente para identificar alterações significativas em sujeitos com a doença de Alzheimer, o VBM apresenta também algumas limitações. Algumas destas advêm dos erros subjacentes à captação de imagem. Outras devem-se ao pré-processamento dos dados: a normalização espacial e/ou a segmentação de cérebros atípicos pode levar a resultados menos precisos ou complicar a interpretação dos resultados [62]. Para minimizar as limitações referidas, bem como a variabilidade introduzida pelo uso de diferentes *scanners*, posicionamento de sujeitos ou protocolos de aquisição, é recomendável que todas as imagens de um estudo sejam adquiridas nas mesmas condições [62]. Posteriormente à aquisição, recorre-se a *templates* para ajustar as imagens obtidas e torna-las comparáveis entre si. Estes *templates* são imagens de cérebros padrão, usualmente obtidas tirando a média de várias imagens de cérebros de sujeitos saudáveis. Em cérebros atípicos, isto é, cérebros que apresentem características diferentes dos cérebros contidos no *template*, a normalização bem como a segmentação devem ser realizadas com cuidado, pois podem causar erros que posteriormente levam a interpretações erradas. Apesar de o último passo do pré-processamento – a suavização – tentar colmatar estas falhas, existem sempre alguns erros que podem levar a erros de interpretação dos dados e que têm que ser tidos em conta aquando da análise estatística e interpretação dos resultados [60].

5.2. Métodos

5.2.1. Participantes e aquisição de dados

Pretende-se aqui fazer uma análise comparativa entre sujeitos com a doença de Alzheimer e sujeitos normais, de forma a verificar quais as alterações mais significativas que ocorrem e em que zonas do cérebro. A metodologia seguida e o conjunto de códigos desenvolvidos para o efeito serão usados em estudos, em decurso ou futuros, na Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Em particular, para permitir a comparação com resultados publicados, analisam-se dados provenientes de uma base de dados on-line: a ADNI (*Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative Database*, disponível em: www.loni.ucla.edu/ADNI/Data⁶). As imagens nesta base de dados referem-se maioritariamente a sujeitos com Doença de Alzheimer e foram obtidas em diferentes momentos, nomeadamente na fase de diagnóstico, 12 meses depois do primeiro diagnóstico e 24 meses depois do diagnóstico. Também se obteve, da mesma

⁶ Data used in preparation of this dissertation were obtained from the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI) database (adni.loni.ucla.edu). As such, the investigators within the ADNI contributed to the design and implementation of ADNI and/or provided data but did not participate in analysis or writing of this report. A complete listing of ADNI investigators can be found at: <http://adni.loni.ucla.edu/research/active-investigators/>

base e de forma análoga, imagens relativas a um grupo controlo de sujeitos saudáveis em diferentes momentos. Todas as imagens são ponderadas em T1 e obtidas com *scanners* MRI de 1,5 Tesla da *General Electrical Healthcare* ou da *Siemens Medical Solutions*. Os *scans* foram recolhidos utilizando o protocolo MRI da base de dados ADNI, descrito em [38].

Na Figura 5.1 podemos observar o esquema da avaliação temporal realizado aos sujeitos com Doença de Alzheimer (DA). Os doentes cujos dados estão na base ADNI realizaram o mesmo conjunto de testes e exames a cada 12 meses após o diagnóstico inicial. Também relativamente aos voluntários saudáveis se obtiveram dados MRI da mesma forma que para os sujeitos com DA. Nas secções seguintes serão utilizados os dados obtidos 12 e 24 meses após o diagnóstico para os sujeitos doentes e imagens obtidas em dois grupos de sujeitos saudáveis, de idades semelhantes às do grupo de doentes nos diferentes momentos dos exames. A comparação entre imagens permite-nos comparar estágios mais e menos avançados da doença de Alzheimer.



Figura 5.1: Esquema temporal da obtenção das imagens de MR para o grupo de doentes com DA, segundo o protocolo usado na ADNI [38].

Na Tabela 5.1 estão apresentados os dados demográficos dos sujeitos envolvidos neste estudo. A tabela divide-se em duas secções: os sujeitos controlo (colunas #1 e #2) e os sujeitos com doença de Alzheimer (colunas #3 e #4). Todos os dados da tabela correspondem às avaliações feitas aos sujeitos nos diferentes momentos. Relativamente aos sujeitos com DA, foram obtidas imagens nos dois momentos 12 e 24 meses após os mesmos serem diagnosticados. Os sujeitos controlo não têm qualquer tipo de relação entre si, sendo dois grupos distintos de 30 sujeitos cada. Optou-se pela inclusão de dois grupos controlo, cada um com médias de idades próxima de um dos grupos de doentes, para não se valorizar indevidamente efeitos de idade quando apenas se pretendem avaliar alterações devidas à doença.

Na Tabela 5.1, MMSE corresponde a *Mini Mental State Examination* e CDR corresponde ao *Clinical Dementia Rating Scale*. Todos são testes cognitivos que permitem avaliar o estado de demência do sujeito, como referido no Capítulo 2. Os dados presentes nesta tabela estão expressos em média \pm desvio padrão.

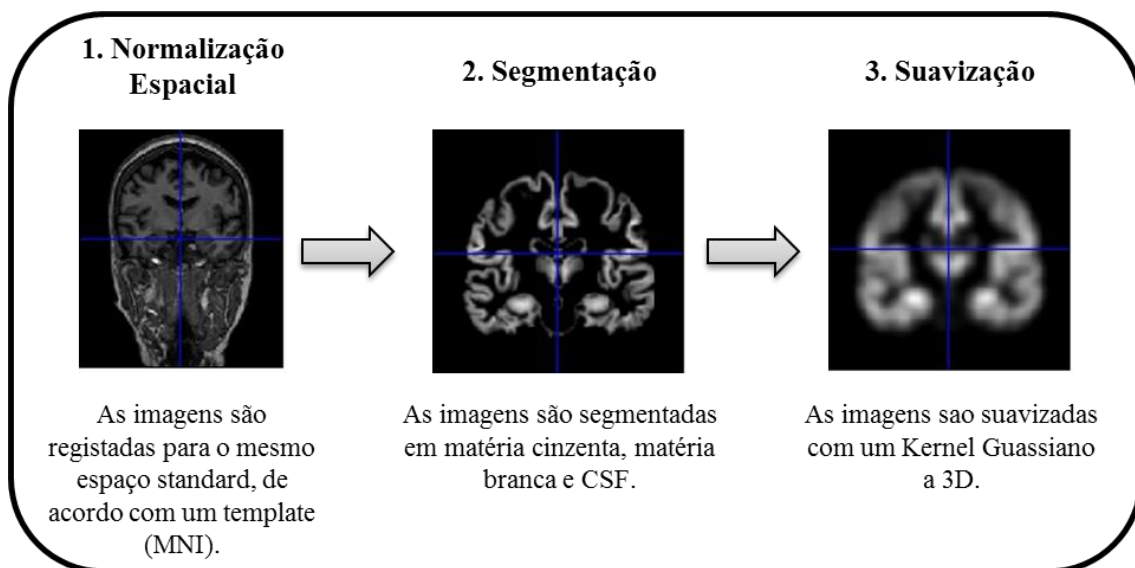
Tabela 5.1: Informação demográfica dos pacientes em estudo.

	<i>Controlo (m12)</i>	<i>Controlo (m24)</i>	<i>DA (m12)</i>	<i>DA (m24)</i>
	<i>#1</i>	<i>#2</i>	<i>#3</i>	<i>#4</i>
Número de sujeitos	30	30	30	30
Homens	13	15	11	14
Mulheres	17	15	19	16
Idade (anos)	75.9 ± 5.4	78 ± 5.7	76.5 ± 9.1	79 ± 6.8
Mão dominante: direita (%)	86.7 ± 0.4	90 ± 0.3	96.7 ± 0.2	96.7 ± 0.2
MMSE	29.2 ± 1.2	29 ± 1	21.5 ± 4.4	18 ± 5.1
CDR	0 ± 0.1	0 ± 0.1	0.9 ± 0.4	1 ± 0.6

5.2.2. Pré-processamento

Como já visto, para realizar uma análise VBM, é necessário pré-processar os dados correctamente. Pretende-se comparar valores, entre dois grupos, em *voxels* correspondentes e para fazer isto é necessário primeiro conhecer a correspondência entre os voxels de cérebros morfologicamente distintos. A Figura 5.2 representa os 3 passos de pré-processamento de uma análise VBM para imagens de ressonância estrutural.

Nesta dissertação, utilizou-se para a realização de análises VBM o *software* SPM8 (*Welcome Trust Centre for Neuroimaging, Institute of Neurology, UCL, London, UK*, <http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm>), em conjunto com a *toolbox* VBM8 (<http://dbm.neuro.uni-jena.de/vbm8/>).

**Figura 5.2:** Passos de pré-processamento de dados utilizados no VBM.

(A) Registo e Normalização

Um conjunto de imagens MRI podem ser obtidas com um mesmo protocolo, mas isso não basta para que as imagens possam ser comparadas com rigor estatístico. Tal deve-se, por um lado, ao facto de os sujeitos não se manterem estáticos ao longo do tempo de permanência no *scanner* MRI. Para além disto, a variabilidade biológica normal de tamanho e forma de cérebros dificulta encontrar-se correspondência entre *voxels* de cérebros de diferentes sujeitos.

O primeiro passo, denominado de registo, de uma análise VBM consiste em tornar as imagens dos diferentes sujeitos comparáveis, colocando-as num espaço comum e com o mesmo tamanho. Para realizar o registo, recorre-se usualmente a um espaço *standard*. O mais utilizado actualmente é o espaço MNI (*Montreal Neurological Institute*) [66]. O espaço MNI é baseado na média de um conjunto de imagens de Ressonância Magnética de sujeitos saudáveis, normalizadas para a mesma orientação [67]. Na Figura 5.3 podemos ver a representação do *template* MNI utilizado para o registo das imagens consideradas neste estudo. Para além de uniformizar os tamanhos das imagens, a normalização corrige ainda as imagens para efeitos de volume parcial, descritos em [68]. Neste sentido, há um aumento de precisão das imagens registadas face às originais [60], [69].

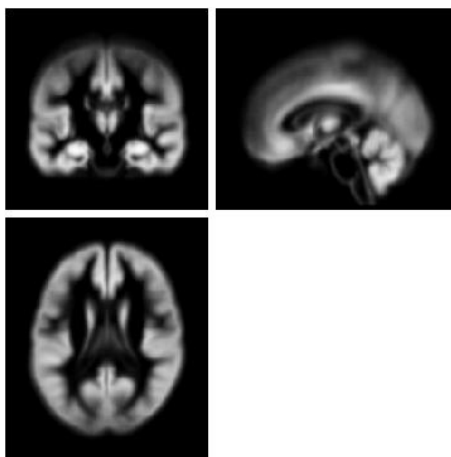


Figura 5.3: *Template* MNI usado para registar as imagens de MR neste estudo.

Na Figura 5.4 podemos ver uma imagem de um sujeito incluído neste estudo, numa fase anterior e posterior ao registo. Conseguem distinguir-se algumas diferenças visualmente. Na imagem registada, rotações e translações estão corrigidas para o novo espaço, o espaço *standard*. A colocação das imagens neste último irá facilitar a comparação entre informações morfológicas de diferentes grupos. No registo, o plano da cabeça também sofre alterações, ficando alinhado em relação à origem⁷, a cabeça fica ligeiramente mais pequena e o ruído do *scanner* é atenuado.

Apesar das vantagens que existem em registar as imagens MRI, este passo apresenta algumas limitações que deverão ser colmatadas com os restantes passos do pré-processamento.

⁷ A origem é definida de acordo com o *template*. No *template* utilizado (MNI) a origem está localizada na comissura anterior, isto é, todas as imagens apresentam a origem do referencial ($x = 0$, $y = 0$ e $z = 0$) localizada neste ponto.

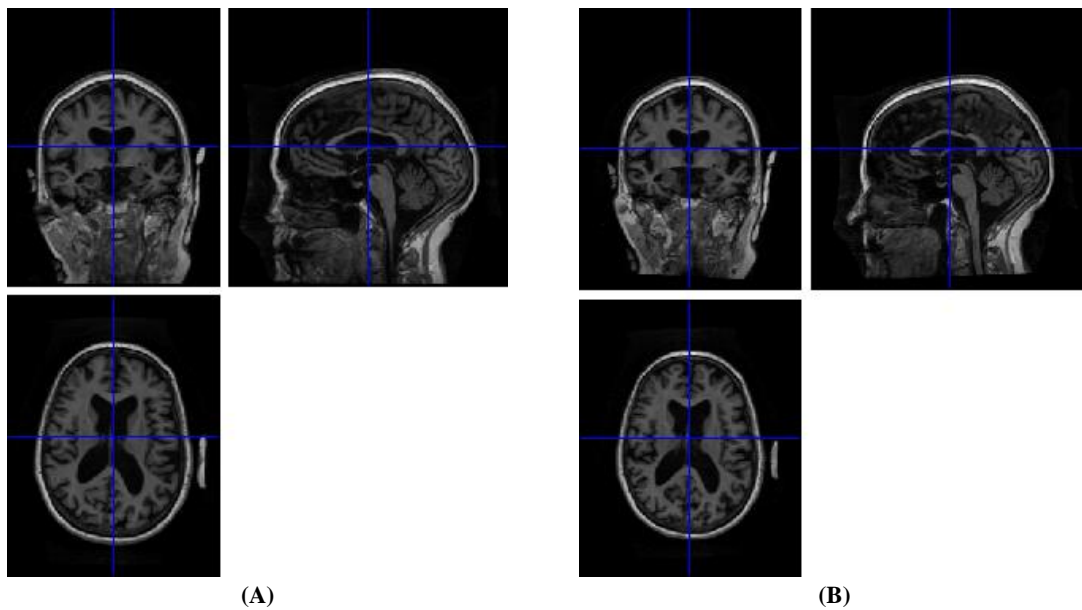


Figura 5.4: (A) Imagem de MR antes do registo; (B) Imagem de MR após o registo. Ambas as imagens são do mesmo sujeito. A imagem original (A) foi registada com o *template* MNI representado na Figura 5.3, obtendo-se a imagem em (B).

(B) Segmentação

As imagens MRI têm um grande conjunto de informação anatómica, mas nem toda é relevante e nem toda essa informação é igualmente interessante para o estudo. Na doença de Alzheimer, a matéria cinzenta perde mais volume que a matéria branca e está relacionada na literatura com a progressão clínica desta patologia, sendo como tal um bom marcador da progressão da doença [70]. Deste modo, é usual no caso da doença de Alzheimer estudar-se apenas a matéria cinzenta. Para que tal seja possível é necessário segmentar as imagens.

A segmentação consiste em dividir a imagem em matéria cinzenta (MC), matéria branca (MB), líquido cefalorraquidiano (CSF) e outras substâncias que possam existir. Na Figura 5.5 inclui-se um exemplo de uma segmentação do cérebro de um dos sujeitos estudados. No VBM, o passo da segmentação é realizado com recurso a mapas de probabilidade *a priori*. Estes mapas contêm a probabilidade de um *voxel* pertencer a um determinado tipo de tecido e foram obtidos partindo de estudos baseados em cérebros normais, jovens e saudáveis, fazendo assim com que o algoritmo seja menos preciso para sujeitos não representativos desta população [60], [71]. Para além disto, para obter bons resultados da aplicação do algoritmo da segmentação, é necessário que o mesmo seja aplicado a imagens de boa qualidade. Estas não devem ter artefactos e deverá ser possível separar bem as intensidades dos diferentes tecidos [71], [72].

Quando se segmentam imagens de sujeitos não representados pela população, quer por serem doentes, quer por apresentarem cérebros atípicos – por exemplo, com ventrículos mais largos ou cabeças mais pequenas/maiores –, a segmentação não é perfeita e podemos ter alguns *voxels* mal segmentados. Para garantir que tal não acontece, o passo da segmentação deve acontecer em simultâneo com o passo do registo. Esta dependência circular restringe as garantias de perfeição no registo e segmentação [71]. Para colmatar esta limitação, considera-se

ainda um último passo de pré-processamento. A ideia deste é diminuir as imperfeições que possam ainda existir.

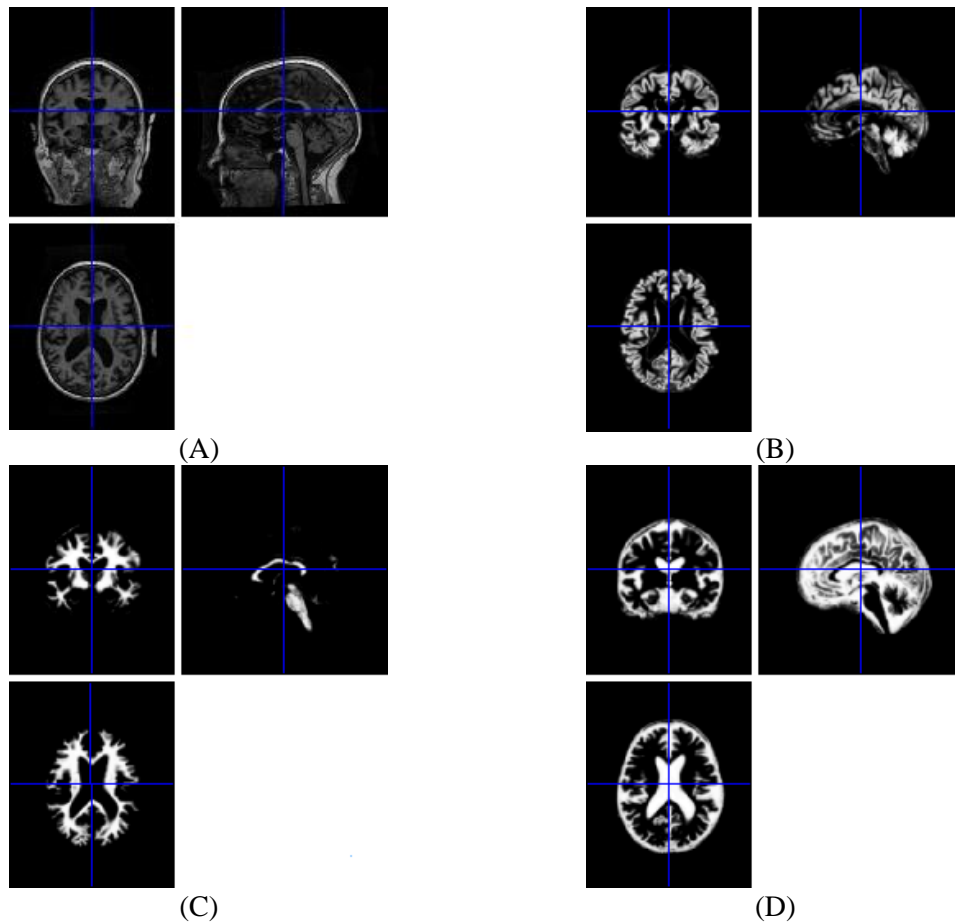


Figura 5.5: Imagens de MR com as respectivas segmentações: (A) Imagem original; (B) Imagem de matéria cinzenta; (C) Imagem de matéria branca; (D) Imagem de CSF e outros.

(C) Suavização

Como referido, as imagens registadas e segmentadas podem conter pequenas imperfeições. Assim, ao suavizarmos os dados, estes ficarão com menos diferenças anatómicas, os erros do registo serão compensados e os dados adquirem uma distribuição mais próxima da normal. O ruído proveniente tanto do *scanner* como de erros associados aos algoritmos numéricos será também compensado, pois cada *voxel* passará a ter também contribuição dos *voxels* vizinhos [60]. Para a suavização dos dados, usa-se uma convolução com uma função: um *kernel* Gaussiano a 3 dimensões caracterizado pela sua largura a meia altura (FWHM, do inglês Full width at half maximum), que está relacionada com o seu desvio padrão, σ [73]:

$$FWHM = \sqrt{8 \ln 2} \sigma . \quad (5-1)$$

O tamanho do *kernel* dependerá das diferenças que pretendemos observar, da qualidade da imagem e do tipo de imagem. Para imagens de MR, normalmente usa-se um *kernel* de 8 mm, enquanto que para imagens PET o *kernel* usado pode variar entre 4 e 6 mm. Este *kernel* depende ainda da resolução do *scanner* e poderá ter que ser adaptado [60]. No caso específico deste

estudo, todas as imagens MRI foram suavizadas com um *kernel* Gaussiano a 3 dimensões de 8 mm.

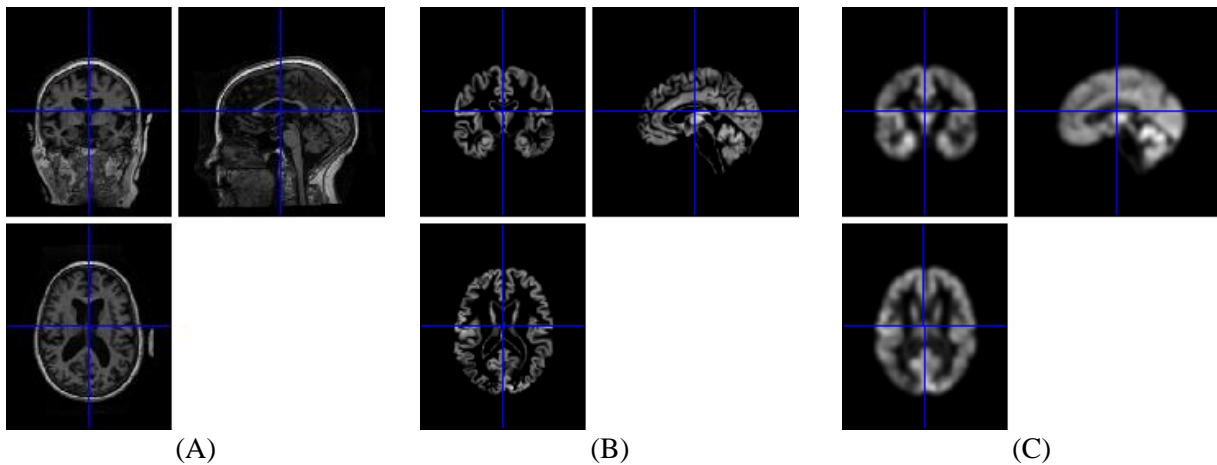


Figura 5.6: Imagens de MR: (A) Imagem Original; (B) Imagem de matéria cinzenta; (C) Imagem de matéria cinzenta suavizada. Todas as imagens correspondem ao mesmo sujeito (doente de Alzheimer) e foram obtidas no âmbito do trabalho desta dissertação.

Na Figura 5.6 (C), podemos ver uma imagem suavizada. A imagem torna-se mais suave e os *voxels* tornam-se mais dependentes, esta dependência irá facilitar as comparações entre *voxels* semelhantes. Isto irá compensar possíveis erros que possam existir nos passos anteriores, bem como facilitar a análise estatística (pois os dados estão normalmente distribuídos) como veremos de seguida.

(D) Análise Estatística

O Modelo Linear Geral (GLM do inglês *General Linear Model*) está na base dos estudos de VBM realizados para dados MRI [74]. Neste tipo de modelo, realizam-se testes de inferência estatísticos paramétricos em forma de regressão. O objectivo final da análise estatística é comparar os efeitos estimados com os efeitos medidos, isto é, verificar se existem de facto alterações nas imagens que estimamos como sendo de doentes de Alzheimer. Existem vários testes estatísticos que se podem realizar para completar a análise, como o teste t de duas amostras ou o teste t de amostras emparelhadas. Os mais utilizados para este tipo de testes são os testes de duas amostras e os testes de amostras emparelhadas. O teste t de duas amostras ou de *t-Student* é o teste paramétrico aplicado quando temos duas amostras independentes e pretendemos fazer uma comparação entre elas. O teste t de amostras emparelhadas compara a média de duas variáveis obtidas relativamente a um mesmo grupo de sujeitos e avalia se as suas médias diferem.

5.3. Resultados

O estudo de comparação entre sujeitos com a doença de Alzheimer e sujeitos saudáveis foi realizado em diferentes fases. Primeiramente verificou-se quais as alterações que ocorrem em cérebros de sujeitos com a doença de Alzheimer, comparando-os com um grupo de controlos. De seguida, verificou-se qual a relação entre os scores cognitivos obtidos para os voluntários seleccionados da base de dados ADNI e os estágios da demência respectivos. Finalmente, verificou-se quais as alterações que os sujeitos sofrem com o passar do tempo, individualmente. Os resultados estão apresentados de seguida.

5.3.1. Avaliação de alterações ocorridas ao fim de 12 meses de diagnóstico

Para avaliar as diferenças neurológicas entre doentes de Alzheimer e sujeitos saudáveis, seleccionaram-se sujeitos aleatoriamente da base de dados ADNI: 30 sujeitos com doença de Alzheimer e 30 voluntários saudáveis. Procurou-se apenas que as características dos últimos (em termos de distribuição de idade e género) fossem semelhantes às dos primeiros. As características dos sujeitos seleccionados foram já apresentadas nas colunas #1 e #3 da Tabela 5.1. Relativamente aos sujeitos com DA, obtiveram-se os dados MRI recolhidos 12 meses após o diagnóstico inicial. As imagens foram então pré-processadas com os passos já referidos em cima. Em particular, para este estudo apenas se utilizaram as imagens de matéria cinzenta segmentada, o que permite visualizar em maior detalhe as alterações ocorridas na zona do hipocampo, apesar de ser possível distinguir também outras alterações. A estas imagens, aplicou-se o Modelo Linear Geral para obter mapas paramétricos de diferenças estatisticamente significativas. Neste caso, pretendemos comparar duas amostras independentes, os sujeitos com doença de Alzheimer e os sujeitos Controlo, verificando se existem alterações significativas na anatomia cerebral dos sujeitos com doença de Alzheimer. Usamos para tal testes t de duas amostras, realizados ao nível de cada *voxel*.

Na Figura 5.7, apresenta-se o resultado da análise VBM que traduz a comparação de imagens de ressonância obtidas 12 meses após o diagnóstico para doentes DA com um conjunto de voluntários saudáveis com a mesma média de idade. Ambas as imagens desta figura mostram as alterações ocorridas em cérebros com a doença quando comparados com cérebros de sujeitos saudáveis. As imagens foram obtidas com um valor p , para cada teste t, menor que 0.01. Escolheu-se um valor para p menor que o tipicamente apresentado na literatura (0.05) para evitar a proliferação de Falsos Positivos (isto é, que se identificassem alterações que não correspondam à verdade biológica), o que poderia acontecer devido às múltiplas comparações realizadas, uma para cada *voxel*.

Na Figura 5.7 (A), está representado um *Glass Brain*, onde são apresentadas as regiões de grande perda de matéria cinzenta. Os *voxels* estão representados em escala cinzenta e nesta escala, quanto mais escuro o cinzento, menor será o valor P do teste t realizado para o mesmo *voxel*. Desta forma, descurando acasos estatísticos, poderá interpretar-se que quanto mais escuro o *voxel*, mais alterações existem neste entre o grupo de pacientes e o grupo de controlos. Nesta figura é possível visualizar três vistas do cérebro (no sentido dos ponteiros do relógio: sagital, coronal e axial). Não é porém possível distinguir as alterações a nível anatómico. Para permitir isto, gera-se uma segunda imagem que permite verificar as alterações existentes, colocando-as sobre uma máscara anatómica do cérebro. O resultado está apresentado na Figura 5.7 (B) e

permite identificar a localização das alterações. Para complementar esta imagem usamos a Tabela 5.2, que permite identificar as coordenadas das zonas onde ocorrem as alterações, combinando esta informação com o valor T da estatística do teste realizado. Nesta tabela, o valor p está corrigido para comparações múltiplas, como descrito em [73]. As coordenadas presentes na Tabela 5.2, foram obtidas utilizando as funções NFRI descritas em [75].

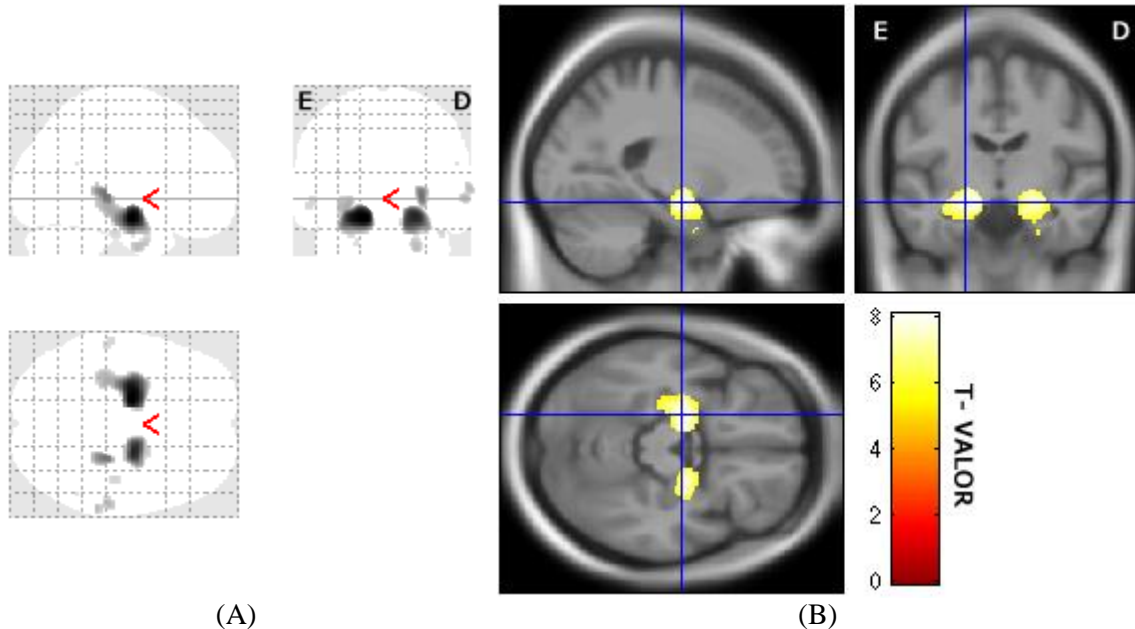


Figura 5.7: (A) **Glass Brain**, representação das alterações que ocorrem no cérebro a nível quantitativo. (B) **Color Map**, mapa de cores da localização das alterações que ocorrem, bem como a quantidade de alterações que ocorrem. A seta vermelha em (A) aponta para a comissura anterior.

A análise conjunta da Tabela 5.2 e da Figura 5.7 permite-nos tirar algumas conclusões acerca das alterações ocorridas em sujeitos com a doença de Alzheimer quando comparados com sujeitos considerados saudáveis. A alteração mais notória verifica-se na zona do hipocampo. Como já havia sido reportado [70], esta zona sofre grandes alterações nos sujeitos com esta doença, o que se confirma com esta análise. Não obstante, as alterações observadas são assimétricas mas não lateralizadas, podendo observar-se pela análise da tabela que o lado direito apresenta mais alterações que o lado esquerdo [70], [72], [76], [77].

Associada ao hipocampo temos a zona Parahipocampal que também é afectada. Esta zona envolve o hipocampo e está associada à codificação das memórias bem como à sua recuperação [78], pelo que não surpreende que seja alterada na doença de Alzheimer.

Para além do hipocampo existem outras zonas que sofrem alterações e que estão envolvidas com a memória. Uma dessas zonas é o giro lingual do lobo occipital, que está envolvido no processamento e armazenamento das memórias visuais [79]. A amígdala cerebelosa também é referenciada na tabela como uma zona que sofre alterações significativas. A amígdala é uma parte do sistema límbico responsável por controlar os conteúdos emocionais das memórias [80]. Já o fusiforme, que faz parte da superfície inferior do lobo temporal, também ele envolvido nas memórias, sofre alterações pouco significativas [81]. No entanto, com o passar do tempo esta zona apresenta maiores deteriorações, como poderemos ver nas subsecções seguintes.

Tabela 5.2: Áreas mais afectadas nos pacientes avaliados 12 meses após o diagnóstico, com as respectivas coordenadas MNI.

Coordenadas MNI			P valor (corrigido)	k	T valor	Localização
x	y	z				
-15	-10	-17	< 0.001	3389	8.10	E – Hipocampo; E – Para-hipocampal; E – Amígdala.
23	-9	-15	< 0.001	2236	7.61	D – Hipocampo; D – Para-hipocampal; D – Amígdala; D – Putâmen; D – Globo Pálido
27	-30	-2	< 0.001	421	6.75	D – Hipocampo; D – Para-hipocampal; D – Lingual; D – Tálamo
60	-27	-2	< 0.001	352	6.03	D – Temporal Médio
42	-23	-27	< 0.001	387	5.71	D – Hipocampo; D – Para-hipocampal; D – Fusiforme; D – Temporal Inferior; D – Cerebelo 4, 5; D – Cerebelo 6
-56	-30	-3	< 0.001	907	5.70	E – Temporal Superior; E – Temporal Médio
54	-52	24	0.007	59	5.57	D – Angular; D – Temporal Superior; D – Temporal Médio
9	-48	21	0.004	81	5.51	E – Cíngulo Posterior; D – Cíngulo Posterior; D – Precuneus
50	0	-41	0.004	90	5.23	D – Temporal Médio; D – Temporal Inferior
-47	-15	-23	0.041	2	5.02	E – Fusiforme; D – Temporal Superior; E – Temporal Médio; E – Temporal Inferior

Foi aplicado um limiar de $p < 0.01$ (corrigido para comparações múltiplas) de forma a identificar os locais com maiores alterações. As coordenadas (x, y e z) referem-se ao espaço MNI. Os resultados estão listados pelo tamanho do *cluster*, indicado pelo valor k, isto é, o número de *voxels* num *cluster* particular. E corresponde a área esquerda do cérebro e D a área direita. Os números correspondem às áreas de *Broadman*.

5.3.2. Relação entre os scores cognitivos e os estágios da demência

Como já descrito anteriormente [82], o teste MMSE é usado para avaliar o estado cognitivo da pessoa que o realiza. Apesar de não ser uma avaliação final, é um teste preliminar que permite diagnosticar alguns estágios de demência [18]. Através de algumas perguntas, que são influenciadas pela idade e escolaridade dos pacientes em estudo [18], avalia-se o estado de demência de um sujeito. Como explicado em [16], [82], convencionou-se que um score de MMSE inferior a 25 (para sujeitos dos EUA) significa que os pacientes apresentam demência.

Assim, e como os sujeitos em estudo correspondem a uma amostra populacional dos Estados Unidos da América, admitimos para esta dissertação que o valor de corte do MMSE para o qual se verificam a maioria das alterações é 25. Abaixo deste valor, será de esperar que os sujeitos com DA apresentem alterações mais significativas que os sujeitos controlo [16].

Pretende-se nesta subsecção avaliar apenas os sujeitos com MMSE inferior a 25 (em sujeitos com a doença de Alzheimer) e comparar-se as imagens de ressonância adquiridas 12 meses após o diagnóstico com imagens de uma população saudável. O grupo de controlos seleccionados para esta avaliação é o mesmo que aquele já descrito na subsecção anterior, (coluna #1 da Tabela 5.1). Já quanto ao grupo dos doentes de Alzheimer, foram seleccionados um total de 30 doentes que apresentassem score MMSE menor que 25. Na Tabela 5.3 encontra-se a informação demográfica dos dois grupos estudados nesta subsecção.

Tal como descrito anteriormente, os dados foram pré-processados e aplicou-se o Modelo Linear Geral para assim chegar aos mapas de probabilidade estatísticos (Figura 5.8) que nos permitem ver as alterações ocorridas neste grupo de sujeitos.

Tabela 5.3: Informação demográfica dos pacientes com MMSE < 25.

	<i>Controlo (m12)</i>	<i>DA m12</i>
Número de sujeitos	30	30
Homens	13	14
Mulheres	17	16
Idade (anos)	75.9 ± 5.4	78 ± 6.8
Mão dominante: direita (%)	86.7 ± 0.4	96.7 ± 0.2
MMSE	29.2 ± 1.2	19.5 ± 4.5
CDR	0 ± 0.1	1 ± 0.6

Como seria de esperar, os dados apresentados na Figura 5.8 (A), quando comparados com os da Figura 5.7, mostram-nos mais alterações significativas a olho nu, uma vez que os sujeitos avaliados nesta segunda etapa apresentam maior probabilidade de sofrer de demência. Tal está também de acordo com o que é referido na literatura: os scores cognitivos estão relacionados com a doença e um score MMSE < 25 indica maiores alterações no que toca a esta doença [16], [18]. Os mapas estatísticos da Figura 5.8 permitem-nos verificar quais as regiões que sofrem

mais alterações nestes sujeitos e a Tabela 5.4 permite-nos concluir sobre as localizações exactas dessas alterações.

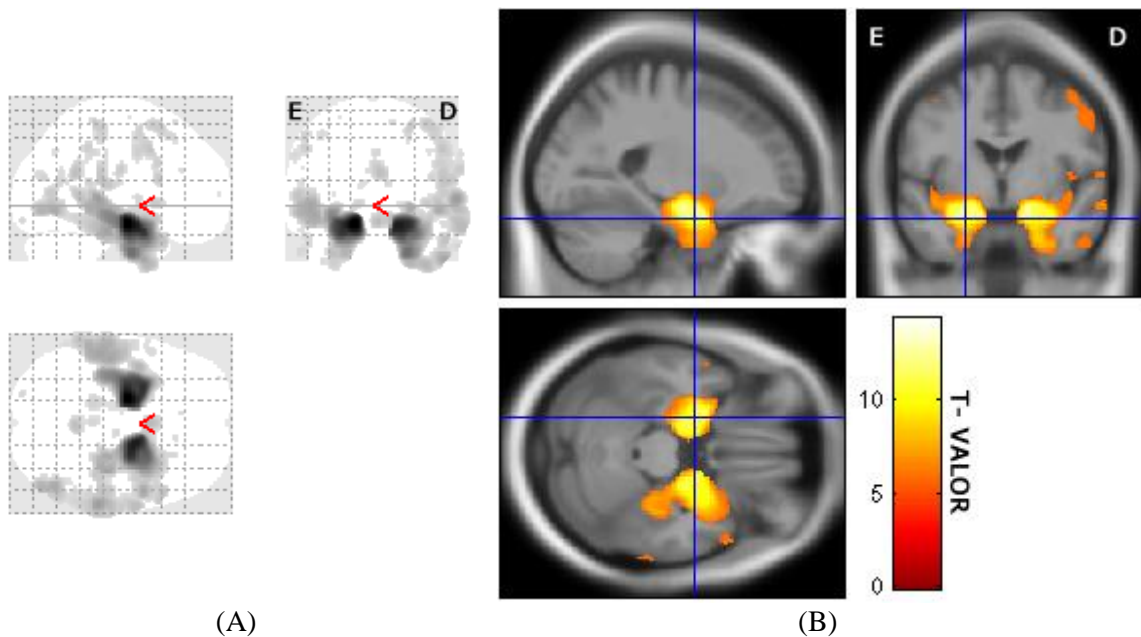


Figura 5.8: Glass Brain (A) e Color Map (B), comparando doentes de Alzheimer com score MMSE < 25 com sujeitos saudáveis. A seta vermelha (A) aponta para a comissura anterior.

É possível verificar através da observação da Figura 5.8 que a maioria das alterações observadas nos sujeitos com DA ocorre na zona do hipocampo. Em comparação com a Figura 5.7, aqui as alterações são bastante mais evidentes e apresentam-se numa área ligeiramente superior. Para além disso, surgem outras zonas com alterações, nomeadamente no Lobo Temporal.

Este segundo estudo foi realizado exactamente nas mesmas condições (a aquisição dos dados e as normas estatísticas) que o estudo da subsecção anterior, sendo que a única diferença registada foi na escolha dos sujeitos: para esta segunda etapa apenas foram escolhidos os sujeitos com MMSE < 25. As alterações verificadas nesta segunda fase foram em grande número, o que pode ser confirmada na Figura 5.8 quando comparada com a Figura 5.7. Isto permite-nos confirmar a relação entre o score MMSE e a demência [16].

Tabela 5.4: Áreas mais afectadas com as respectivas coordenadas MNI nos pacientes avaliados ao mês 12 e com MMSE < 25.

Coordenadas MNI			P valor (corrigido)	k	T valor	Localização
x	y	z				
-15	-10,5	-16,5	0	9752	14,39	E – Hipocampo, E – Para-hipocampal, E – Amígdala
-24	1,5	-21	0	9752	12,26	E – Frontal Superior e Inferior E – Bolbos Olfactorios, E – Insula, E – Hipocampo; E – Para-hipocampal, E – Amígdala.
-51	-31,5	-3	> 0,001	9752	7,80	E – Temporal Superior, E – Temporal Médio
18	-6	-18	0	9573	13,14	D – Hipocampo, D – Para-hipocampal, D – Amígdala
24	-7,5	-37,5	> 0,001	9573	9,85	D – Para-hipocampal, D – Fusiforme, D – Temporal Médio

Foi aplicado um limiar de $p < 0.01$ (corrigido para comparações múltiplas) de forma a identificar os locais com maiores alterações. As coordenadas (x, y e z) referem-se ao espaço MNI. Os resultados estão listados pelo tamanho do *cluster*, indicado pelo valor k, isto é, o número de *voxels* num *cluster* particular. E corresponde a área esquerda do cérebro e D a área direita.

5.3.3. Avaliação das alterações ocorridas num período de 12 meses em cada sujeito

Durante a vida de um sujeito com Doença de Alzheimer, as áreas do cérebro que já estão danificadas tendem a deteriorar-se ainda mais [70]. Na Figura 5.9 podemos ver duas imagens que comprovam essa deterioração: enquanto a Figura 5.9 (A) mostra uma avaliação realizada ao fim de 12 meses de diagnóstico, a Figura 5.9 (B) mostra a mesma avaliação realizada aos mesmos sujeitos mas em imagens obtidas ao fim de 24 meses de diagnóstico, isto é, um ano depois.

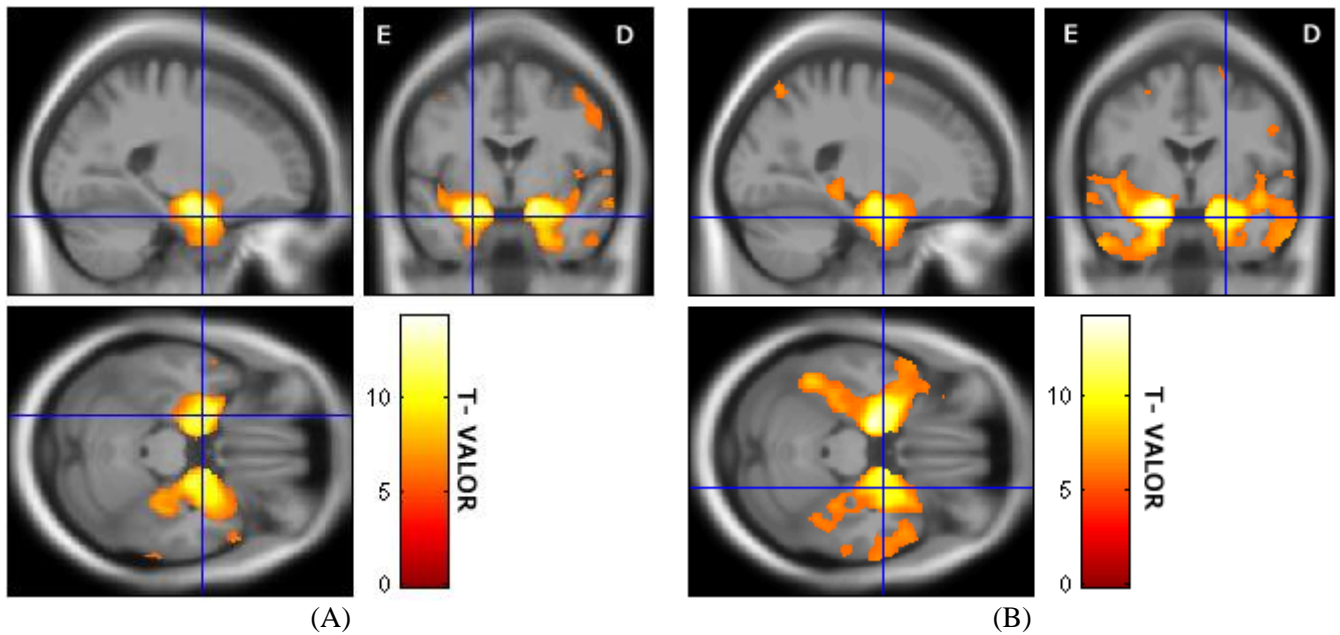


Figura 5.9: (A) *Color Map* de um estudo realizado com imagens obtidas 12 meses após o diagnóstico (correspondente ao estudo apresentado na **Figura 5.8**). (B) *Color Map* de um estudo realizado aos mesmo sujeitos que em (A), mas com imagens obtidas 12 meses depois, isto é, imagens obtidas 24 meses após o diagnóstico.

Como se observa da comparação entre a Figura 5.9 (A) e (B), existe uma clara evolução da doença ao longo de 12 meses. Para a obtenção destas imagens, realizaram-se comparações entre as imagens de ressonância dos doentes de Alzheimer, obtidas 12 e 24 meses após o diagnóstico inicial, com imagens de grupos de voluntários saudáveis. Todos os doentes de Alzheimer seleccionados para este estudo apresentavam score MMSE menor que 25, coincidindo com os mesmos doentes seleccionados para o estudo da subsecção anterior, ver Tabela 5.5 para um resumo da informação demográfica. Tal como anteriormente, pré processou-se os dados e realizaram-se testes estatísticos.

Tabela 5.5: Informação demográfica dos pacientes com MMSE < 25 em duas fases: 12 meses após o diagnóstico e 24 meses após o diagnóstico.

	<i>DA m12</i>	<i>DA m24</i>
Número de sujeitos	30	30
Homens	14	14
Mulheres	16	16
Idade (anos)	78 ± 6.8	79 ± 6.8
Mão dominante: direita (%)	96.7 ± 0.2	96.7 ± 0.2
MMSE	19.5 ± 4.5	18 ± 5.1
CDR	1 ± 0.6	1 ± 0.6

As alterações que os sujeitos sofrem ao longo do tempo, não só danificam zonas que estão na base das memórias, como zonas que estão na base de processos cognitivos e aprendizagem [12], o que é compatível com a degradação do score MMSE dos sujeitos, verificada ao longo do tempo. Na Figura 5.10 podemos ver as alterações deste *score* entre os pacientes estudados.

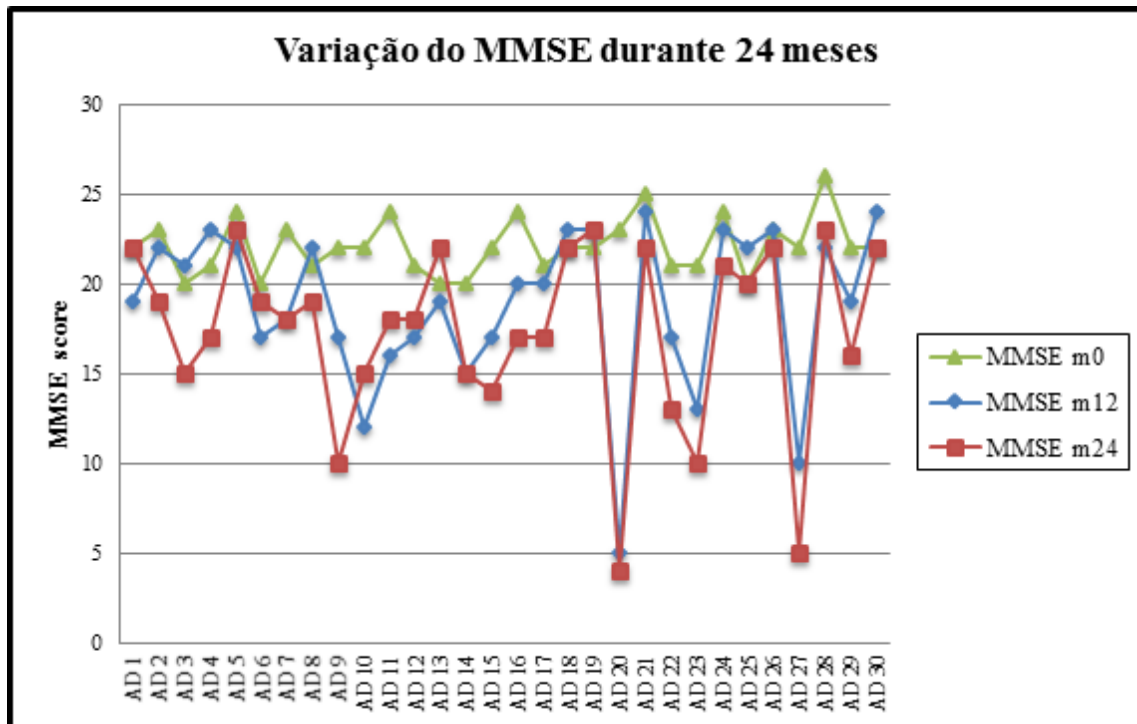


Figura 5.10: Variações do MMSE nos sujeitos com a doença de Alzheimer ao longo do tempo. A linha verde corresponde ao mês zero (o início do estudo), a linha azul corresponde ao mês 12 e a linha vermelha corresponde ao mês 24. Os sujeitos estão indicados como AD1,...,AD30.

O *score* cognitivo MMSE dos sujeitos em estudo varia bastante ao longo do estudo. A linha verde corresponde ao *score* MMSE determinado no momento do diagnóstico, encontrando-se na parte de cima do gráfico para a maioria dos sujeitos. As linhas azuis e vermelha, no gráfico, ilustram a degradação do *score* ao fim de 12 e 24 meses, respectivamente. Daqui, podemos verificar que com o progredir da doença o *score* diminui bastante, como seria de esperar em doentes com doença de Alzheimer [16].

Finalmente, pretende-se verificar quais as áreas que sofrem mais alterações entre os 12 e os 24 meses após o diagnóstico inicial em doentes de Alzheimer. Como anteriormente, os dados respectivos são pré-processados porém os testes estatísticos agora aplicados são testes de amostras emparelhadas. Aplicando-se em concordância o Modelo Linear Geral, obtiveram-se as imagens da Figura 5.11, onde podemos ver as diferenças observadas no mesmo conjunto de sujeitos num período de 12 meses.

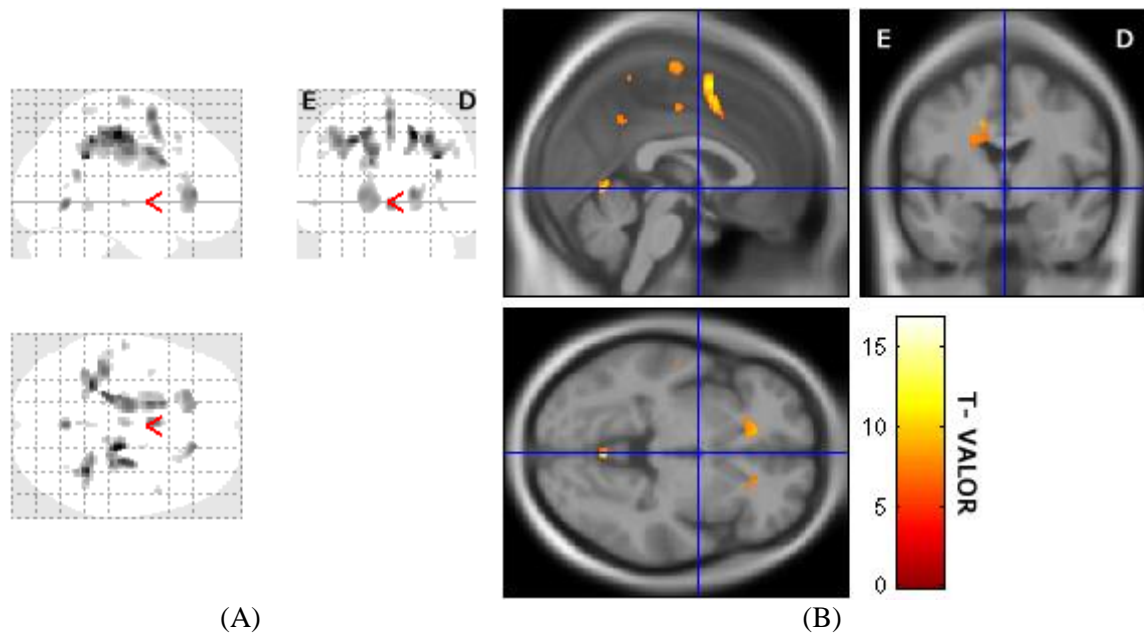


Figura 5.11: (A) **Glass Brain**, representação das alterações que ocorrem no cérebro a nível quantitativo. (B) **Color Map**, mapa de cores da localização das alterações que ocorrem, bem como a quantidade de alterações que ocorrem nos sujeitos num período de 12 meses. Todos os sujeitos apresentavam MMSE < 25 e correspondem aos dados demográficos apresentados na Tabela 5.5. A seta vermelha representada em (A), bem como o centro do eixo azul em (B) apontam para a comissura anterior.

Neste caso, estamos apenas a verificar quais as áreas mais afectadas com a progressão da doença e verifica-se que a maioria das alterações ocorre no lobo parietal, que tem algumas das zonas responsáveis pelo controlo das emoções e das memórias. Na Tabela 5.6 estão apresentadas as coordenadas MNI, as respectivas localizações e os valores p correspondentes.

Em concordância com o que já foi descrito e reportado [76], as alterações na matéria cinzenta são lateralizadas. A maioria das alterações verificadas acontece na zona esquerda do cérebro; não obstante, a zona direita apresenta também algumas alterações significativas. As alterações mais significativas (quer no lado direito, quer no lado esquerdo) são no lobo frontal e no lobo parietal (giros pré-central e pós-central, respectivamente). O lobo frontal, em conjunto com o córtex pré-motor e outras regiões subcorticais, tem a função de planear e executar certos movimentos [83]. O lobo parietal inferior está envolvido na percepção das emoções, na linguagem e nas operações lógicas, enquanto o lobo parietal superior está envolvido com os *inputs* visuais: desde a orientação espacial às memórias visuais [84].

Confirma-se assim que as áreas afectadas são áreas envolvidas nos processos diários, como havia sido descrito no Capítulo 2. Apesar de a maioria das alterações ser no Hipocampo (zona associada à linguagem), com a progressão da doença, os sujeitos começam a perder outras habilidades. A habilidade de ter discursos coerentes e de articular palavras difíceis começa a ser perdida, bem como a capacidade de se orientarem ou de coordenarem os seus movimentos [85]. As áreas que estão envolvidas nestas tarefas são afectadas não nos estágios iniciais da doença, mas sim em estágios posteriores da mesma, levando a uma perda de qualidade de vida destes sujeitos.

Tabela 5.6: Áreas mais afectadas com as respectivas coordenadas MNI nos pacientes durante um período de 12 meses (do mês 12 ao mês 24).

Coordenadas MNI			P valor (corrigido)	k	T valor	Localização
x	y	z				
18	-22,5	48	< 0,001	554	18.84	D – Área Suplementar Motora, D – Lóbulo Para central
28,5	-18	45	< 0,001	554	14.04	D – Pré Central, D – Pós Central
30	-27	42	< 0,001	554	11.89	D – Pré Central, D – Pós Central, D – Supra Marginal
-27	-42	43,5	< 0,001	903	14.72	E – Pós Central, E – Lobo Parietal Superior, E – Lobo Parietal Inferior
-37,5	-33	42	< 0,001	903	11.79	E – Pós Central, E – Lobo Parietal Inferior
-42	-36	49,5	< 0,001	903	10.29	E – Lobo Parietal Superior, E – Lobo Parietal Inferior
-18	-30	48	< 0,001	1197	13.09	E – Pré Central, E – Pós Central, E – Lóbulo Para central

Foi aplicado um limiar de $p < 0.01$ (corrigido para comparações múltiplas) de forma a identificar os locais com maiores alterações. As coordenadas (x, y e z) referem-se ao espaço MNI. Os resultados estão listados pelo tamanho do *cluster*, indicado pelo valor k, isto é, o número de *voxels* num *cluster* particular. E corresponde a área esquerda do cérebro e D a área direita.

5.4. Conclusão

Neste Capítulo avaliaram-se as alterações ocorridas na Doença de Alzheimer em diferentes fases da doença e em função do *score* MMSE. Já ao fim de 12 meses após o diagnóstico inicial de DA, são notórias as diferenças entre os grupos de sujeitos (DA vs. controlos), sendo que as diferenças mais visíveis são observadas na zona do hipocampo, zona para-hipocampal e nos lobos frontal e parietal. Estas diferenças acentuam-se com o passar dos meses.

O hipocampo é a zona que apresenta uma maior atrofia nos sujeitos com DA. O diagnóstico destas lesões leva a um conseqüente diagnóstico da DA [70]. A zona que envolve o hipocampo, a zona Parahipocampal, que está envolvida na codificação das memórias e na sua recuperação também é afectada [78]. Estas duas zonas, que são responsáveis por parte das nossas memórias, ao serem danificadas levam a que os sujeitos apresentem os primeiros sintomas da Doença de Alzheimer: os problemas de memória [14], [15]. Para além destes sintomas, os sujeitos podem ainda apresentar outros sintomas relacionados com a perda de memória, como é o caso de depressão, obsessão, agitação ou apatia [14], [15]. Estes sintomas mais emocionais estão relacionados com as alterações que ocorrem na amígdala cerebelosa, que é a parte do sistema límbico envolvida no controlo dos conteúdos emocionais das memórias [80]. O processamento da memória não ocorre só no hipocampo, o Lobo occipital (nomeadamente o giro lingual) está envolvido no processamento e armazenamento das memórias visuais e, em sujeitos com a doença de Alzheimer, apesar de apresentar poucas alterações, este também é danificado [86].

Para avaliar o estado de demência inicial dos sujeitos, é usado um conjunto de testes cognitivos, como o MMSE, o MoCA, ou o CDR. O MMSE (*Mini Mental State Examination*) é um teste que se baseia em perguntas do dia a dia para aferir se um sujeito sofre de algum tipo de demência [16]. Este score é bastante variável, pois depende de factores como o país e a escolaridade e baseia-se em perguntas bastante simples [18], no entanto, apresenta uma relação positiva com a doença de Alzheimer, pois sujeitos com MMSE inferior a 25 têm maior probabilidade de ter a doença. Ao avaliar este ponto, podemos concluir que de facto os sujeitos com score inferior a 25 apresentam mais alterações que os sujeitos com outros scores (como se pode ver na Figura 5.8 quando comparada com a Figura 5.7).

A DA é uma doença que vai degradando o cérebro dos sujeitos com o avançar do tempo. A zona do hipocampo vai continuando a ser degradada, enquanto outras áreas começam também a degradar-se. O lobo frontal e parietal são as zonas que maiores alterações sofrem com o progredir da doença, nos sujeitos estudados. Estas zonas têm diferentes funções: enquanto o lobo frontal tem a função de planear e executar movimentos [83], o lobo parietal está envolvida na percepção das emoções, na linguagem e nas operações lógicas [84].

Em suma, as alterações mais evidentes nesta doença ocorrem em áreas relacionadas com a memória e com os movimentos, sendo a primeira a mais afectada. Outras alterações cognitivas ocorrem nestes sujeitos, no entanto, estas manifestam-se em estágios mais tardios da doença, como os delírios, alucinações, depressão, obsessão, agitação/agressão, vaguear, apatia e desinibição sexual [14], [15].

O conjunto de técnicas apresentadas neste capítulo, implementadas na Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, é replicável para outros estudos. Tal é válido não apenas para estudos que envolvam imagens de ressonância magnética, mas também estudos PET, envolvendo imagens quantificadas tal como descrito no Capítulo 4 desta dissertação.

Capítulo 6

Conclusão

6. Conclusão

A prevalência de demência na população mundial tem vindo a aumentar nos últimos tempos. É essencial que as demências sejam diagnosticadas cada vez em fases mais precoce para que os indivíduos que delas sofrem, bem como os seus familiares, possam ter uma melhor qualidade de vida. O desenvolvimento de técnicas de diagnóstico como a PET e a MRI apresenta vantagens para este diagnóstico. Em particular para a doença de Alzheimer, a obtenção de imagens PET e MRI podem fornecer um precioso auxílio ao diagnóstico clínico.

Relativamente às imagens PET, estas precisam de ser quantificadas para isolar a parte do sinal PET correspondente apenas à ligação específica do radiofármaco à molécula alvo em causa. Existem vários métodos de quantificação destas imagens. Entre estes, os modelos cinéticos com região de referência apresentam uma alternativa credível e não invasiva ao *gold standard*, que recorre à canulação arterial para obter amostras de sangue.

Por outro lado, as imagens de MR necessitam de algum pré-processamento para poderem ser avaliadas estatisticamente. O objectivo do pré-processamento é torná-las uniformes e seleccionar as zonas que pretendemos avaliar em mais detalhe, segmentando as imagens. A avaliação estatística de imagens de MR mostra-nos que em demências como é o caso da DA, os sujeitos que sofrem da mesma apresentam grandes alterações na zona do córtex, bem como no hipocampo. A avaliação dos scores cognitivos quando comparados com o estado de demência permite-nos avaliar as alterações cognitivas que acontecem nestes sujeitos com o progredir da doença, verificando-se uma natural acentuação dos défices cognitivos com o passar do tempo. Da mesma forma, o tamanho do cérebro vai sendo reduzido sendo que as maiores alterações se registam na zona do hipocampo. Outras áreas são afectadas, como a amígdala cerebelosa que faz com que sentimentos e emoções sejam toldados em sujeitos com DA.

As alterações anatómicas que os sujeitos com esta doença sofrem são visíveis não só nas imagens de MR como nas imagens PET, às quais pode ser aplicado o mesmo pré-processamento e tratamento estatístico aqui proposto.

6.1. Trabalho Futuro

Sendo as imagens PET e MR uma mais-valia no diagnóstico de demências como é o caso da doença de Alzheimer, a sua análise deverá continuar não só das formas propostas nesta dissertação, mas noutras formas complementares.

As imagens quantificadas e apresentadas no Capítulo 4 poderão servir de base para uma análise estatística com recurso a VBM. Da mesma forma, deverão avaliar-se outros métodos de quantificação de natureza não-linear. Para além desta avaliação, poderão utilizar-se imagens PET de doentes com outras demências, aplicando os mesmos métodos de forma a comparar resultados.

As imagens de MR utilizadas no Capítulo 5 permitiram fazer uma primeira abordagem ao VBM e validação da implementação local do mesmo. O mesmo estudo poderá ser replicado com imagens provenientes de estudos em curso ou a decorrer futuramente no IBILI/ICNAS. Ambas as imagens (MRI e PET) poderão ser também avaliadas com recurso a máquinas de vector de suporte (SVM, do inglês *Support Vector Machine*). Esta avaliação permitirá o apoio ao diagnóstico clínico da doença de Alzheimer de forma rápida. Todos estes projectos poderão também ser aplicados noutras doenças neurodegenerativas.

Bibliografia

Bibliografia

- [1] C. P. Ferri, M. Prince, C. Brayne, H. Brodaty, L. Fratiglioni, M. Ganguli, K. Hall, K. Hasegawa, H. Hendrie, Y. Huang, A. Jorm, C. Mathers, P. R. Menezes, E. Rimmer, and M. Scazufca, "Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study.," *Lancet*, vol. 366, no. 9503, pp. 2112–7, Dec. 2005.
- [2] B. M. DeBomoy K. Lahiri, "Beyond the signaling effect role of amyloid- β 42 on the processing of A β PP, and its clinical implications," *Exp Neurol.*, vol. 225, no. 1, pp. 51–54, 2010.
- [3] T. Gómez-Isla, J. L. Price, D. W. M. Jr, J. C. Morris, J. H. Growdon, and B. T. Hyman, "Profound Loss of Layer II Entorhinal Cortex Neurons Occurs in Very Mild Alzheimer's Disease," *The Journal of Neuroscience*, vol. 16, no. 14, pp. 4491–4500, 1996.
- [4] T. by L. J. and H. Greenson, "About a Peculiar Disease of the Cerebral Cortex : Alzheimer ' s Original Case Translation from the original publication of Alois Alzheimer : Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde (1907).," *Alzheimer Dis Assoc Disord*, no. 412, pp. 30–33, 1907.
- [5] A. Medical Encyclopedia, "Alzheimer's disease," *PubMed Health*, 2011. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH000176>. [Accessed: 05-Jun-2013].
- [6] N. C. Fox, E. K. Warrington, P. A. Freeborough, P. Hartikainen, and A. M. Kennedy, "Presymptomatic hippocampal atrophy in Alzheimer ' s disease A longitudinal MRI study," no. 1996, pp. 2001–2007, 2007.
- [7] C. Ballard, S. Gauthier, A. Corbett, C. Brayne, D. Aarsland, and E. Jones, "Alzheimer's disease.," *Lancet*, vol. 377, no. 9770, pp. 1019–31, Mar. 2011.
- [8] B. Dubois, H. H. Feldman, C. Jacova, S. T. Dekosky, P. Barberger-Gateau, J. Cummings, A. Delacourte, D. Galasko, S. Gauthier, G. Jicha, K. Meguro, J. O'brien, F. Pasquier, P. Robert, M. Rossor, S. Salloway, Y. Stern, P. J. Visser, and P. Scheltens, "Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria.," *Lancet neurology*, vol. 6, no. 8, pp. 734–46, Aug. 2007.
- [9] D. Harris, "Forget me not: palliative care for people with dementia.," *Postgraduate medical journal*, vol. 83, no. 980, pp. 362–6, Jun. 2007.
- [10] B. Dubois, H. H. Feldman, C. Jacova, J. L. Cummings, S. T. Dekosky, P. Barberger-Gateau, A. Delacourte, G. Frisoni, N. C. Fox, D. Galasko, S. Gauthier, H. Hampel, G. a Jicha, K. Meguro, J. O'Brien, F. Pasquier, P. Robert, M. Rossor, S. Salloway, M. Sarazin, L. C. de Souza, Y. Stern, P. J. Visser, and P. Scheltens, "Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon.," *Lancet neurology*, vol. 9, no. 11, pp. 1118–27, Nov. 2010.

- [11] C. Cunha, M. Guerreiro, A. de Mendonça, P. E. Oliveira, and I. Santana, "Serial position effects in Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and normal aging: Predictive value for conversion to dementia," *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology*, vol. 34, no. 8, pp. 841–852, Oct. 2012.
- [12] P. Ronald C. and I. Robert J., "Mild Cognitive Impairment Clinical characterization and Outcome," *American Medical Association*, vol. 56, pp. 303–309, 1999.
- [13] E. Karran, M. Mercken, and B. De Strooper, "The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics.," *Nature reviews. Drug discovery*, vol. 10, no. 9, pp. 698–712, Sep. 2011.
- [14] A. Burns, R. Jacoby, and R. Levy, "Psychiatric phenomena in Alzheimer's disease. IV: Disorders of behaviour.," *BR J Psychiatry*, vol. 157, pp. 86–94, 1990.
- [15] M. Lou Donnelly, "Behavioral and psychological disturbances in Alzheimer disease: Assessment and treatment," *Medical Journal*, vol. 47, no. 9, pp. 487–493, 2005.
- [16] S. Borson and J. Scanlan, "The Mini-Cog as a screen for dementia: validation in a population-Based sample," *Journal of the American Geriatrics Society*, vol. 51, pp. 1451–1454, 2003.
- [17] J. Morgado, C. S. Rocha, C. Maruta, M. Guerreiro, and I. P. Martins, "Novos Valores Normativos do Mini-Mental State Examination," *Sinapse - Publicação da Sociedade Portuguesa de Neurologia*, vol. 9, no. 2, pp. 10–16, 2009.
- [18] G. Practitioner, N. H. Medicine, S. Medicine, U. Amsterdam, V. Universiteit, and V. U. Amsterdam, "Limitations of the Mini-Mental State Examination in diagnosing dementia," *International Journal of Geriatric Psychiatry*, vol. 12, no. January 1996, pp. 101–108, 1997.
- [19] D. Duro, M. R. Simões, E. Ponciano, and I. Santana, "Validation studies of the Portuguese experimental version of the Montreal Cognitive Assessment (MoCA): confirmatory factor analysis.," *Journal of neurology*, vol. 257, no. 5, pp. 728–34, May 2010.
- [20] Z. S. Nasreddine, N. A. Phillips, V. Bédirian, S. Charbonneau, V. Whitehead, I. Collin, J. L. Cummings, and H. Chertkow, "The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: A Brief Screening tool for mild cognitive impairment," *American Geriatrics Society*, vol. 53, pp. 695–699, 2005.
- [21] S. Freitas, M. R. Simões, C. Martins, M. Vilar, and I. Santana, "Estudos de Adaptação do Montreal Cognitive Assessment (MoCA) para a população portuguesa," *Avaliação Psicológica*, vol. 9, no. 3, pp. 345–357, 2010.
- [22] J. Morris, "Clinical dementia rating: a reliable and valid diagnostic and staging measure for dementia of the Alzheimer type.," *Int Psychogeriatr.*, vol. 9, pp. 173–178, 1997.
- [23] M. A. Brown and R. C. Semelka, *MRI Basic Principles and Applications*. 2003, p. 265.
- [24] D. Bailey, D. Townsend, P. Valk, and M. Maisey, *Positron Emission Tomography*. 2003, p. 884.

- [25] M. Patwardhan, D. C. Mccrory, D. B. Matchar, G. P. Samsa, and O. T. Rutschmann, "Alzheimer Disease: Operating Characteristics of PET - A Meta-Analysis," *Radiology*, no. 4, pp. 73–80, 2004.
- [26] M. Verdurand, G. Bort, V. Tadino, F. Bonnefoi, D. Le Bars, and L. Zimmer, "Automated radiosynthesis of the Pittsburg compound-B using a commercial synthesizer.," *Nuclear medicine communications*, vol. 29, no. 10, pp. 920–6, Oct. 2008.
- [27] A. Cedazo-Minguez and B. Winblad, "Biomarkers for Alzheimer's disease and other forms of dementia: clinical needs, limitations and future aspects.," *Experimental gerontology*, vol. 45, no. 1, pp. 5–14, Jan. 2010.
- [28] C. R. Jack, D. S. Knopman, W. J. Jagust, L. M. Shaw, P. S. Aisen, M. W. Weiner, R. C. Petersen, and J. Q. Trojanowski, "Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade.," *Lancet neurology*, vol. 9, no. 1, pp. 119–28, Jan. 2010.
- [29] J. Cal-González, J. L. Herraiz, S. España, P. M. G. Corzo, J. J. Vaquero, M. Desco, and J. M. Udías, "Positron range estimations with PeneloPET.," *Physics in medicine and biology*, vol. 58, no. 15, pp. 5127–52, Aug. 2013.
- [30] R. Laforest and X. Liu, "Image quality with non-standard nuclides in PET," *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, vol. 52, no. 2, pp. 151–158, 2008.
- [31] T. Mizuta, M. Senda, T. Okamura, K. Kitamura, Y. Inaoka, M. Takahashi, K. Matsumoto, M. Abe, Y. Shimonishi, and S. Shiomi, "NEC density and liver ROI S/N ratio for image quality control of whole-body FDG-PET scans: comparison with visual assessment.," *Molecular imaging and biology: MIB: the official publication of the Academy of Molecular Imaging*, vol. 11, no. 6, pp. 480–6, 2009.
- [32] R. G. Wells, R. A. DeKemp, and R. S. B. Beanlands, "Positron emission tomography instrumentation.," in *Nuclear Cardiology: Technical Applications*, vol. 39, no. 5, McGraw Hill Medical, 2009, pp. 25–45.
- [33] J. S. Fowler and A. P. Wolf, "Working against Time: Rapid Radiotracer Synthesis and Imaging the Human Brain," *Accounts of Chemical Research*, vol. 30, no. 4, pp. 181–188, Apr. 1997.
- [34] S. Vallabhajosula, *Molecular Imaging: Radiopharmaceuticals for PET and SPECT*. 2009, p. 372.
- [35] M. Ter-Pogossian and P. Herscovitch, "Radioactive oxygen-15 in the study of cerebral blood flow, blood volume, and oxygen metabolism.," *Semin Nucl Med.*, vol. 15, no. 4, pp. 377–94, 1985.
- [36] J. S. Karp, S. Surti, M. E. Daube-Witherspoon, and G. Muehllehner, "Benefit of time-of-flight in PET: experimental and clinical results.," *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*, vol. 49, no. 3, pp. 462–70, Mar. 2008.
- [37] D. J. Kadrmas, M. E. Casey, M. Conti, B. W. Jakoby, and D. W. Townsend, "Impact of Time-of-Flight on PET Tumor Detection," *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 50, no. 8, pp. 1315–1323, 2009.

- [38] X. Hua, A. Leow, S. Lee, and A. Klunder, "3D characterization of brain atrophy in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment using tensor-based morphometry," *Neuroimage*, vol. 41, pp. 19–34, 2008.
- [39] R. N. Gunn, S. R. Gunn, F. E. Turkheimer, J. A. D. Aston, and V. J. Cunningham, "Positron Emission Tomography Compartmental Models: A Basis Pursuit Strategy for Kinetic Modeling," *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, vol. 22, pp. 1425–1439, 2002.
- [40] A. A. Lammertsma, "Compartmental Modeling in Emission Tomography," in *Handbook of Particle Detection and Imaging*, C. Grupen and I. Buvat, Eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012, pp. 1065–1081.
- [41] R. N. Gunn, S. R. Gunn, and V. J. Cunningham, "Positron emission tomography compartmental models.," *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 21, no. 6, pp. 635–52, Jun. 2001.
- [42] M. E. Phelps, S. C. Huang, E. J. Hoffman, and D. E. Kuhi, "Validation of Tomographic Measurement of Cerebral Blood Volume with C-11-Labeled Carboxyhemoglobin," *The Journal of Nuclear Medicine*, vol. 20, pp. 328–334, 1979.
- [43] S. C. Huang, M. E. Phelps, E. J. Hoffman, K. Sideris, C. J. Selin, and D. E. Kuhl, "Noninvasive determination of local cerebral metabolic rate of glucose in man," *American Journal of Physiology*, vol. 238, pp. E69–E82, 1980.
- [44] M. A. Mintun, M. E. Raichle, M. R. Kilbourn, G. F. Wooten, and M. J. Welch, "A quantitative model for the in vivo assessment of drug binding sites with positron emission tomography.," *Annals of neurology*, vol. 15, no. 3, pp. 217–27, Mar. 1984.
- [45] A. A. Lammertsma and S. P. Hume, "Simplified reference tissue model for PET receptor studies.," *NeuroImage*, vol. 4, no. 3 Pt 1, pp. 153–8, Dec. 1996.
- [46] P. Zanotti-Fregonara, K. Chen, J.-S. Liow, M. Fujita, and R. B. Innis, "Image-derived input function for brain PET studies: many challenges and few opportunities.," *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 31, no. 10, pp. 1986–98, Oct. 2011.
- [47] B. A. Everett, M. A. Oquendo, A. Abi-Dargham, M. S. Nobler, D. P. Devanand, S. H. Lisanby, J. J. Mann, and R. V Parsey, "Safety of radial arterial catheterization in PET research subjects.," *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, vol. 50, no. 10, p. 1742, Oct. 2009.
- [48] S. Slogoff, A. Keats, and C. Arlund, "On the safety of radial artery cannulation.," *Anesthesiology*, vol. 59, no. 1, pp. 42–47, 1983.
- [49] E. K. Fung, B. Planeta-Wilson, T. Mulnix, and R. E. Carson, "A Multimodal Approach to Image-Derived Input Functions for Brain PET," *IEEE Nucl Sci Symp Conf Rec*, no. 1997, pp. 2710–2714, 2009.
- [50] N. A. da Silva, H. Herzog, C. Weirich, L. Tellmann, E. Rota Kops, H. Hautzel, and P. Almeida, "Image-derived input function obtained in a 3TMR-brainPET," *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, vol. 702, pp. 22–25, Feb. 2013.

- [51] H. Watabe, Y. Ikoma, Y. Kimura, M. Naganawa, and M. Shidahara, "PET kinetic analysis - compartmental model," *Annals of nuclear medicine*, vol. 20, no. 9, pp. 583–8, Nov. 2006.
- [52] R. Frackowiak, G. Lenzi, T. Jones, and J. Heather, "Quantitative measurement of regional cerebral blood flow and oxygen metabolism in man using ^{15}O and positron emission tomography: theory, procedure, and normal values.," *J Comput Assist Tomogr*, vol. 4, no. 6, pp. 727–36, 1980.
- [53] A. A. Lammertsma, C. J. Bench, S. P. Hume, S. Osman, K. Gunn, D. J. Brooks, and R. S. Frackowiak, "Comparison of methods for analysis of clinical [^{11}C]raclopride studies," *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 16, no. 1, pp. 42–52, Jan. 1996.
- [54] Y. Zhou, W. Ye, J. R. Brasić, A. H. Crabb, J. Hilton, and D. F. Wong, "A consistent and efficient graphical analysis method to improve the quantification of reversible tracer binding in radioligand receptor dynamic PET studies.," *NeuroImage*, vol. 44, no. 3, pp. 661–70, Feb. 2009.
- [55] B. J. Lopresti, W. E. Klunk, C. A. Mathis, J. A. Hoge, S. K. Ziolko, X. Lu, C. C. Meltzer, K. Schimmel, N. D. Tsopelas, S. T. DeKosky, and J. C. Price, "Simplified quantification of Pittsburgh Compound B amyloid imaging PET studies: a comparative analysis," *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, vol. 46, no. 12, pp. 1959–72, Dec. 2005.
- [56] R. N. Gunn, A. A. Lammertsma, S. P. Hume, and V. J. Cunningham, "Parametric Imaging of Ligand-Receptor Binding in PET Using a Simplified Reference Region Model," *NeuroImage*, vol. 6, pp. 279–287, 1997.
- [57] J. Logan, "Graphical analysis of PET data applied to reversible and irreversible tracers.," *Nuclear medicine and biology*, vol. 27, no. 7, pp. 661–70, Oct. 2000.
- [58] J. L. Whitwell, "Voxel-based morphometry: an automated technique for assessing structural changes in the brain.," *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 29, no. 31, pp. 9661–4, Aug. 2009.
- [59] G. Chételat, B. Desgranges, B. Landeau, F. Mézenge, J. B. Poline, V. de la Sayette, F. Viader, F. Eustache, and J.-C. Baron, "Direct voxel-based comparison between grey matter hypometabolism and atrophy in Alzheimer's disease.," *Brain : a journal of neurology*, vol. 131, pp. 60–71, Jan. 2008.
- [60] J. Ashburner and K. J. Friston, "Voxel-based morphometry - the methods," *NeuroImage*, vol. 11, no. 6 Pt 1, pp. 805–21, Jun. 2000.
- [61] K. Friston, A. Holmes, K. Worsley, J. Poline, C. Frith, and R. S. J. Frackowiak, "Statistical parametric maps in functional imaging: a general linear approach," *Human brain Mapping*, vol. 2, pp. 189–210, 1994.
- [62] A. Mechelli, C. J. Price, K. J. Friston, and J. Ashburner, "Voxel-Based Morphometry Applications of the Human Brain : Methods and," pp. 1–9, 2005.
- [63] S. S. Keller, M. Wilke, U. C. Wiesmann, V. a Sluming, and N. Roberts, "Comparison of standard and optimized voxel-based morphometry for analysis of brain changes

- associated with temporal lobe epilepsy.,” *NeuroImage*, vol. 23, no. 3, pp. 860–8, Nov. 2004.
- [64] D. R. Gitelman, J. Ashburner, K. J. Friston, L. K. Tyler, and C. J. Price, “Voxel-based morphometry of herpes simplex encephalitis.,” *NeuroImage*, vol. 13, no. 4, pp. 623–31, Apr. 2001.
- [65] E. A. Maguire, D. G. Gadian, I. S. Johnsrude, C. D. Good, J. Ashburner, R. S. Frackowiak, and C. D. Frith, “Navigation-related structural change in the hippocampi of taxi drivers.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 8, pp. 4398–403, Apr. 2000.
- [66] M. Brett, K. Christoff, R. Cusack, and J. Lancaster, “Using the Talairach atlas with the MN1 template,” no. 6, p. 2001, 2001.
- [67] J. L. Lancaster, D. Tordesillas-Gutiérrez, M. Martínez, F. Salinas, A. Evans, K. Zilles, J. C. Mazziotta, and P. T. Fox, “Bias between MNI and Talairach coordinates analyzed using the ICBM-152 brain template.,” *Human brain mapping*, vol. 28, no. 11, pp. 1194–205, Nov. 2007.
- [68] H. W. Müller-Gärtner, J. Links, J. Prince, N. Bryan, E. McVeigh, J. Leal, C. Davatzikos, and J. Frost, “Measurement of Radiotracer Concentration in Brain Gray Matter Using Positron Emission Tomography: MRI-Based Correction for Partial Volume Effects,” *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, vol. 12, pp. 571–583, 1992.
- [69] E. J. Burton, G. Karas, S. M. Paling, R. Barber, E. D. Williams, C. G. Ballard, I. G. McKeith, P. Scheltens, F. Barkhof, and J. T. O’Brien, “Patterns of Cerebral Atrophy in Dementia with Lewy Bodies Using Voxel-Based Morphometry,” *NeuroImage*, vol. 17, no. 2, pp. 618–630, Oct. 2002.
- [70] V. M. Anderson, J. M. Schott, J. W. Bartlett, K. K. Leung, D. H. Miller, and N. C. Fox, “Gray matter atrophy rate as a marker of disease progression in AD.,” *Neurobiology of aging*, vol. 33, no. 7, pp. 1194–202, Jul. 2012.
- [71] J. Ashburner and K. J. Friston, “Unified segmentation.,” *NeuroImage*, vol. 26, no. 3, pp. 839–51, Jul. 2005.
- [72] J. L. Tanabe, D. Amend, N. Schuff, V. DiSclafani, F. Ezekiel, D. Norman, G. Fein, and M. W. Weiner, “Tissue segmentation of the brain in Alzheimer disease.,” *American journal of Neuroradiology*, vol. 18, no. 1, pp. 115–23, Jan. 1997.
- [73] J. Ashburner, K. Friston, and W. Penny, *Human Brain Function*. 2003.
- [74] J.-B. Poline and M. Brett, “The general linear model and fMRI: does love last forever?,” *NeuroImage*, vol. 62, no. 2, pp. 871–80, Aug. 2012.
- [75] A. K. Singh, M. Okamoto, H. Dan, V. Jurcak, and I. Dan, “Spatial registration of multichannel multi-subject fNIRS data to MNI space without MRI.,” *NeuroImage*, vol. 27, no. 4, pp. 842–51, Oct. 2005.
- [76] S. Derflinger, C. Sorg, C. Gaser, N. Myers, M. Arsic, A. Kurz, C. Zimmer, A. Wohlschläger, and M. Mühlau, “Grey-matter atrophy in Alzheimer’s disease is

- asymmetric but not lateralized.” *Journal of Alzheimer’s disease : JAD*, vol. 25, no. 2, pp. 347–57, Jan. 2011.
- [77] J. C. Baron, G. Chételat, B. Desgranges, G. Perchey, B. Landeau, V. de la Sayette, and F. Eustache, “In vivo mapping of gray matter loss with voxel-based morphometry in mild Alzheimer’s disease.” *NeuroImage*, vol. 14, no. 2, pp. 298–309, Aug. 2001.
- [78] R. Epstein, a Harris, D. Stanley, and N. Kanwisher, “The parahippocampal place area: recognition, navigation, or encoding?,” *Neuron*, vol. 23, no. 1, pp. 115–25, May 1999.
- [79] C. E. Stern, S. Corkin, R. G. González, a R. Guimaraes, J. R. Baker, P. J. Jennings, C. a Carr, R. M. Sugiura, V. Vedantham, and B. R. Rosen, “The hippocampal formation participates in novel picture encoding: evidence from functional magnetic resonance imaging.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, no. 16, pp. 8660–5, Aug. 1996.
- [80] E. A. Phelps, “Human emotion and memory: interactions of the amygdala and hippocampal complex,” *Current opinion in neurobiology*, vol. 14, no. 2, pp. 198–202, Apr. 2004.
- [81] M. Mion, K. Patterson, J. Acosta-Cabronero, G. Pengas, D. Izquierdo-Garcia, Y. T. Hong, T. D. Fryer, G. B. Williams, J. R. Hodges, and P. J. Nestor, “What the left and right anterior fusiform gyri tell us about semantic memory.” *Brain : a journal of neurology*, vol. 133, no. 11, pp. 3256–68, Nov. 2010.
- [82] A. M. Matos, P. Faria, and M. Patrício, “Voxel-based morphometry analyses in Alzheimer’s disease,” *2013 IEEE 3rd Portuguese Meeting in Bioengineering (ENBENG)*, pp. 1–4, 2013.
- [83] P. E. Roland, B. Larsen, N. A. Lassen, and E. Skinhoj, “Supplementary motor area and other cortical areas in organization of voluntary movements in man,” *J. Neurophysiol.*, vol. 43, pp. 118–136, 1980.
- [84] R. A. Andersen, “Inferior parietal lobule function in spatial perception and visuomotor integration,” in *Comprehensive Physiology*, 2011, pp. 484–518.
- [85] E. Noe, K. Marder, K. L. Bell, D. M. Jacobs, J. J. Manly, and Y. Stern, “Comparison of dementia with Lewy bodies to Alzheimer’s disease and Parkinson’s disease with dementia.” *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, vol. 19, no. 1, pp. 60–7, Jan. 2004.
- [86] M. M. Keane, J. D. E. Gabrieli, H. C. Mapstone, K. A. Johnson, and S. Corkin, “Double dissociation of memory capacities after bilateral occipital-lobe or medial temporal-lobe lesion,” *Brain : a journal of neurology*, vol. 118, no. 5, pp. 1129–1148, 1995.

Anexos

Voxel-based Morphometry Analyses in Alzheimer's Disease

A. Margarida Matos^{1,2}, Paula Faria^{2,3}; for the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, Miguel Patrício²

¹ Department of Physics, Faculty of Sciences and Technology, University of Coimbra, Portugal

² Institute of Biomedical Research in Light and Image, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal

³ ESTG, CDRSP, Polytechnic Institute of Leiria, Portugal

Abstract— Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease recognized as one of the most important medical problems affecting the elderly. It is characterized by an irreversible loss of neurons which is mostly pronounced in the grey matter and specifically in the hippocampus. The aim of this paper is to identify alterations in grey matter in MRI images of AD patients, when compared to those of healthy volunteers, using Voxel-Based Morphometry (VBM). The latter is a widely used statistical-based technique that allows the detection of alterations in brain tissue. In our study, we used VBM to detect significant grey matter alterations of the hippocampal region in AD patients, which is consistent with previous findings reported in the literature. We also examined how the Mini Mental State Examination (MMSE) scores relates to the volume differences detected by VBM.¹

Keywords— VBM; Alzheimer's Disease; MRI; ADNI.

I. INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD), which accounts for about 60% of dementias, has a prevalence which rises over 35% at the age of 90 years [1]. It is characterized by a progressive and irreversible loss of neurons that causes memory impairments, inability to communicate and loss of other cognitive functions [2]. Although the unifying neuropathological hallmarks of AD have long been identified (namely by the presence of β -amyloid plaques and neurofibrillary tangles composed of tau protein) confirmation of the disease is normally only possible post mortem [2]. Brain imaging is often used to evaluate patients with dementia and form a correct diagnosis. Both structural imaging (CT/MRI) and metabolic imaging (PET/SPECT) have been employed to distinguish different forms of neurodegenerative dementias. Particularly in the case of AD, loss of neurons has been reported to be detectable in the brain cortex along with a progressive hippocampal atrophy and a dramatic decrease volume of the hippocampus [3].

Voxel-Based Morphometry (VBM) is a technique of voxel-wise statistical analysis that allows the identification of structural or functional differences between brains of healthy

subjects and AD patients. It has been applied to different types of data (such as MRI or PET) and it has been shown to present plausible biological results, see for example [3, 4]. In particular, when T1-weighted volumetric MRI scans of both cohorts are available, the VBM analysis is comprised by three steps: normalization, segmentation and smoothing, which in turn converge on a statistical analysis across all voxels in the image in order to identify volume differences between controls and AD patients [5].

The present study intends to provide a stepping stone for future VBM analysis in studies currently taking place in our research group. The starting point here consists in identifying brain structural alterations that occur on AD patients. For that purpose, a population of 30 healthy subjects and 30 AD patients is analysed. Volumetric differences identified between the two cohorts are presented, discussed and compared to what had been reported earlier in the literature.

II. METHODS

A. Participants and Data Acquisition

Data from 30 normal controls and 30 AD patients was obtained from the ADNI – Alzheimer's disease Neuroimaging Initiative – public database for the present study (www.loni.ucla.edu/ADNI/Data). Data used in this article was downloaded from the ADNI server on December, 2012. For up-to-date information, see www.adni-info.org.

Both patients and healthy subjects were chosen randomly from the database amongst participants in longitudinal studies, having been followed for at least a 12 months period. All subjects initially underwent several neuropsychological examinations resulting in several clinical characteristic indicators including the Mini Mental State Examination (MMSE) score, the Functional Assessment Questionnaire (FAQ) Total Score and the Clinical Dementia Ratio (CDR). The data description of participants is fully detailed in Table I.

B. MRI Image acquisition and Preprocessing

Several brain MRI scans of both controls and patients were acquired at multiple ADNI sites throughout the observation period. The analysis in this paper is restricted to the one year

¹ Data used in preparation of this article were obtained from the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI) database (adni.loni.ucla.edu). As such, the investigators within the ADNI contributed to the design and implementation of ADNI and/or provided data but did not participate in analysis or writing of this report. A complete listing of ADNI investigators can be found at: <http://adni.loni.ucla.edu/research/active-investigators/>

T1-weighted follow-up scans, obtained using 1.5 Tesla MRI scanners from General Electrical Healthcare and Siemens Medical Solutions. The scans were acquired under the standard ADNI MRI protocol, as described in [6].

TABLE I. DEMOGRAPHIC INFORMATION OF PARTICIPANTS IN THIS STUDY.

	<i>Diagnosis Group</i>	
	<i>NC</i>	<i>AD</i>
Number of subjects	30	30
Male	13	11
Age (years)	75.9 ± 5.4	76.5 ± 9.1
Right Handed (%)	86.7 ± 0.4	96.7 ± 0.2
MMSE	29.2 ± 1.2	21.5 ± 4.4
FAQ	0.1 ± 0.6	16.8 ± 7.0
CDR	0 ± 0.1	0.9 ± 0.4

Results are presented as mean ± SD.

In order to perform a VBM analysis it is necessary to preprocess the data properly, for which the SPM8 software was employed (Wellcome Trust Centre for Neuroimaging, Institute of Neurology, UCL, London, UK, <http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm>), together with the VBM8 toolbox (<http://dbm.neuro.uni-jena.de/vbm8/>).

The first step of the preprocessing stage lays in performing a spatial normalisation, which adjusts for global differences in brain positioning and scale between subjects by registering all MRI data in the same template image. In this analysis, we used the high-dimensional registration DARTEL algorithm to spatially align each subject's image with the standard MNI template [7]. Secondly, the normalised images were segmented in Grey Matter (GM), White Matter and CSF, resorting to *a priori* probability maps from healthy subjects which contain the probability of every voxel being of a certain type of tissue [8]. The focus of the current analysis is placed in GM, as it is where alterations are most expected to occur. Finally, the images were smoothed to ensure that the data is normally distributed. By employing this procedure the intensity of each voxel is replaced by the weighted average of the neighbourhood voxels. In this study, we used a 3-dimensional 8mm full-width-at-half-maximum (FWHM) isotropic Gaussian kernel [4, 9].

To perform a VBM analysis, the General Linear Model was applied at each voxel of the processed images, using SPM8 to investigate and localize GM alterations between cohorts. This results in Statistical Parametric Maps which provide information on GM alterations. In the following results, the data between cohorts is compared with t-tests (two-sample t-tests), with an uncorrected *p-value* of 0.05. To prevent False Positives, we employed a FWE (Family-Wise Error) correction of 0.05.

III. RESULTS

The methods laid out in the previous section were employed to obtain a map of GM alterations in AD patients. Figures 1 (A) and (B) display the results of a VBM analysis involving the 30 AD patients and 30 healthy controls. Both the glass brain in Figure 1 (A) and the color map in Figure 1 (B) show that grey matter loss occurs mostly in the hippocampus area. The brain regions identified by the VBM analysis were obtained from the MNI coordinates using the NFRI functions described in [10], yielding the results presented in Table II.

Besides the previous analysis, two more comparisons were performed. The first involved the 30 controls and the AD patients with an MMSE score smaller than 25, whilst the second compared all the controls with AD patients that presented an MMSE score greater or equal to 25. The resulting glass brains are displayed in Figures 2 (A) and (B) and a list of observed alterations in Table III. We used a threshold value of 25 to separate the AD patients into two groups because patients with an MMSE score lower than 25 are those considered to exhibit dementia [11].

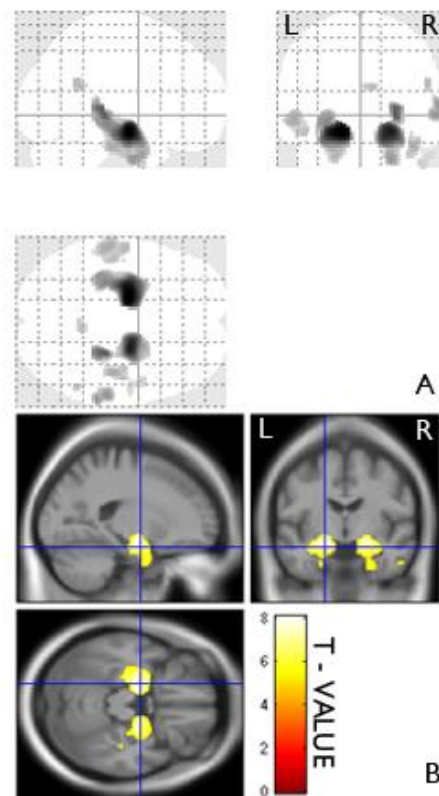


Figure 1. Two different display techniques of a VBM t-test analysis assessing grey matter alterations in a group of 30 AD patients compared to a group of 30 healthy controls. The statistical threshold employed was $p < 0.05$ (uncorrected). In both images, the right side of the brain appears to display more alterations than the left side.

(A) **Glass Brain.** Provides information on the regions of greatest grey matter loss: the voxels shown as grayscale are those for which there was significantly reduced grey matter volume in the AD subjects compared with controls. Three views are represented (sagittal, coronal and axial). Grey matter loss in this analysis was identified mainly in the hippocampus. (B) **Color map** of the same VBM t-test analysis seen in (A), but now the color bar represents the t statistic and so the alterations are in a color scale. The hippocampus area can be identified in the yellow region.

TABLE II. MOST AFFECTED AREAS: MNI COORDINATES AND THE RESPECTIVE BRAIN REGION.

MNI coordinates			P value (corrected)	T value	k	Location
x	y	z				
-15	-10	-17	< 0.001	8.10	3389	L – Hippocampus; L – ParaHippocampal; L – Amygdala
23	-9	-15	< 0.001	7.61	2236	R – Hippocampus; R – ParaHippocampal; R – Amygdala; R – Putamen; R – Pallidum
27	-30	-2	< 0.001	6.75	421	R – Hippocampus; R – ParaHippocampal; R – Lingual; R – Thalamus
60	-27	-2	< 0.001	6.03	352	R – Temporal_Mid
42	-23	-27	< 0.001	5.71	387	R – Hippocampus; R – ParaHippocampal; R – Fusiform; R - Temporal_Inf; R – Cerebelum_4_5; R – Cerebelum_6
-56	-30	-3	< 0.001	5.70	907	L – Temporal_Sup; L – Temporal_Mid
54	-52	24	0.007	5.57	59	R – Angular; R – Temporal_Sup ; R – Temporal_Mid
9	-48	21	0.004	5.51	81	L – Cingulum_Post; R – Cingulum_Post; R – Precuneus
50	0	-41	0.004	5.23	90	R – Temporal_Mid; R – Temporal_Pole_Mid; R – Temporal_Inf
-47	-15	-23	0.041	5.02	2	L – Fusiform; L – Temporal_Sup; L – Temporal_Mid; L – Temporal_Inf

The MNI coordinates refer to the coordinates of the brain in the MNI space. The respective brain regions were obtained using NFRI functions. The quantity of voxels (k) relates to the cluster size. In the location column, numbers correspond to Brodman areas and L is left and R is right brain hemisphere. The statistical threshold employed was $p < 0.05$ (uncorrected).

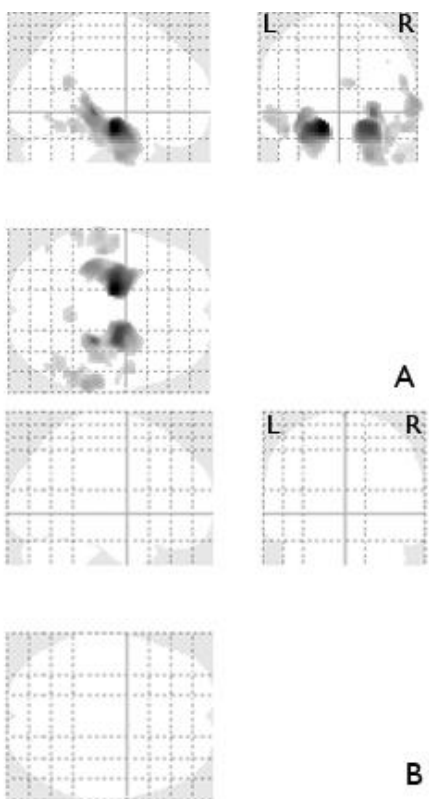


Figure 2. VBM t-test analysis assessing grey matter alterations in groups of AD patients compared to the group of 30 healthy controls. The statistical threshold employed was $p < 0.05$ (uncorrected). (A) only AD patients with an MMSE score lower than 25 were considered. Alterations occurred mostly in the hippocampus region. (B) only AD patients with an MMSE score greater of equal to 25 were considered. No visible alterations were detectable.

TABLE III. GREY MATTER ALTERATIONS WHEN COMPARING CONTROLS (N=30) AND AD PATIENTS WITH: (A) MMSE SCORE < 25 AND (B) MMSE \geq 25. IN BOTH ANALYSIS THE STATISTICAL THRESHOLD EMPLOYED WAS $p < 0.05$ (UNCORRECTED).

	MMSE	
	< 25	\geq 25
AD subjects	22	8
Control subjects	30	30
Alterations	Alterations on hippocampus, mostly on the Right Hemisphere.	No visible alterations.

IV. DISCUSSION

This study aimed to determine alterations that occur in the grey matter due to Alzheimer's disease. For that purpose, a VBM analysis was employed to compare MRI images of 30 healthy controls with an average MMSE score of 29.2 with those of 30 AD patients with an average MMSE score of 21.5.

The most visible changes were found on the hippocampus (see Figure 1 and Table II), in accordance to what the literature reports [12–14]. Also, we found visible changes in both hemispheres with particular emphasis on the right hemisphere. This asymmetric, but not lateralised, distribution of structural alterations is as expected [15].

Cognitive scores such as the MMSE are often used to characterise the mental condition of a subject. Though some questions may be raised about its effectiveness – it has been shown to depend on other parameters such as age or scholasticity

[16], it is widely used to evaluate state of dementia. It is deemed that if a subject has a MMSE score lower than 25, it can be said that he has some kind of dementia [11]. Taking this into account, we separated the 30 AD patients in two subgroups: one containing subjects with an MMSE score lower than 25 and the other the patients that displayed an MMSE score greater or equal than 25. Grey matter alterations, when compared to healthy controls, were sought for both cohorts (Figures 2 and Table III). As expected, patients with lower MMSE were shown to present the greatest volume reductions in the hippocampus, whereas patients with higher MMSE did not show any visible.

V. CONCLUSIONS

Voxel Based Morphometry was used to find grey matter alterations caused by Alzheimer's disease. As expected, we found that the hippocampus was significantly affected in AD patients. Additionally, we found that AD patients with an MMSE score smaller than 25 show significant hippocampus alterations whereas patients with an MMSE score greater or equal to 25 present no visible alterations in this brain area. We confirmed that VBM can be helpful in characterising AD patients and is a useful tool to assess the progression of this disease.

VI. FUTURE WORK

The study presented an application of VBM to one year MRI follow-up scans of AD patients. We plan to extend the analysis over time, looking into the further available data so as to assess longitudinal GM loss in these patients.

We also intend to use VBM analysis to interpret the meaning of weights identified by support vector machine algorithms for the same group of AD patients.

Additionally, we will use the methodology we have described to study other degenerative diseases for which data is currently being obtained in our research group. In particular, we will look into MRI and PET scans of Parkinson's disease patients.

ACKNOWLEDGMENTS

Data collection and sharing for this study were funded by the Alzheimer's disease Neuroimaging Initiative (ADNI) (National Institutes of Health Grant U01 AG024904). The authors gratefully acknowledges the fruitful discussions with João Duarte and João Pereira, both from IBILI-FMUC.

REFERENCES

- [1] C. P. Ferri, M. Prince, C. Brayne, H. Brodaty, L. Fratiglioni, M. Ganguli, K. Hall, K. Hasegawa, H. Hendrie, Y. Huang, A. Jorm, C. Mathers, P. R. Menezes, E. Rimmer, and M. Sczufca, "Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study.," *Lancet*, vol. 366, no. 9503, pp. 2112–7, Dec. 2005.
- [2] E. Karran, M. Mercken, and B. De Strooper, "The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics.," *Nature reviews. Drug discovery*, vol. 10, no. 9, pp. 698–712, Sep. 2011.
- [3] G. Chételat, B. Desgranges, B. Landeau, F. Mézenge, J. B. Poline, V. de la Sayette, F. Viader, F. Eustache, and J.-C. Baron, "Direct voxel-based comparison between grey matter hypometabolism and atrophy in Alzheimer's disease.," *Brain : a journal of neurology*, vol. 131, no. Pt 1, pp. 60–71, Jan. 2008.
- [4] J. L. Whitwell, "Voxel-based morphometry: an automated technique for assessing structural changes in the brain.," *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 29, no. 31, pp. 9661–4, Aug. 2009.
- [5] K. Friston, A. Holmes, K. Worsley, J. Poline, C. Frith, and R. S. J. Frackowiak, "Statistical parametric maps in functional imaging: a general linear approach.," *Human brain Mapping*, vol. 2, pp. 189–210, 1994.
- [6] X. Hua, A. Leow, S. Lee, and A. Klunder, "3D characterization of brain atrophy in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment using tensor-based morphometry.," *Neuroimage*, vol. 41, pp. 19–34, 2008.
- [7] J. Ashburner, "A fast diffeomorphic image registration algorithm.," *NeuroImage*, vol. 38, no. 1, pp. 95–113, Oct. 2007.
- [8] J. Ashburner and K. J. Friston, "Unified segmentation.," *NeuroImage*, vol. 26, no. 3, pp. 839–51, Jul. 2005.
- [9] J. Ashburner and K. J. Friston, "Voxel-based morphometry--the methods.," *NeuroImage*, vol. 11, no. 6 Pt 1, pp. 805–21, Jun. 2000.
- [10] A. K. Singh, M. Okamoto, H. Dan, V. Jurcak, and I. Dan, "Spatial registration of multichannel multi-subject fNIRS data to MNI space without MRI.," *NeuroImage*, vol. 27, no. 4, pp. 842–51, Oct. 2005.
- [11] S. Borson and J. Scanlan, "The Mini-•Cog as a screen for dementia: validation in a population-Bbased sample.," *Journal of the American Geriatrics Society*, vol. 51, pp. 1451–1454, 2003.
- [12] J. L. Tanabe, D. Amend, N. Schuff, V. DiSclafani, F. Ezekiel, D. Norman, G. Fein, and M. W. Weiner, "Tissue segmentation of the brain in Alzheimer disease.," *AJNR. American journal of neuroradiology*, vol. 18, no. 1, pp. 115–23, Jan. 1997.
- [13] V. M. Anderson, J. M. Schott, J. W. Bartlett, K. K. Leung, D. H. Miller, and N. C. Fox, "Gray matter atrophy rate as a marker of disease progression in AD.," *Neurobiology of aging*, vol. 33, no. 7, pp. 1194–202, Jul. 2012.
- [14] J. C. Baron, G. Chételat, B. Desgranges, G. Perchet, B. Landeau, V. de la Sayette, and F. Eustache, "In vivo mapping of gray matter loss with voxel-based morphometry in mild Alzheimer's disease.," *NeuroImage*, vol. 14, no. 2, pp. 298–309, Aug. 2001.
- [15] S. Derflinger, C. Sorg, C. Gaser, N. Myers, M. Arsic, A. Kurz, C. Zimmer, A. Wohlschläger, and M. Mühlau, "Grey-matter atrophy in Alzheimer's disease is asymmetric but not lateralized.," *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, vol. 25, no. 2, pp. 347–57, Jan. 2011.
- [16] G. Practitioner, N. H. Medicine, S. Medicine, U. Amsterdam, V. Universiteit, and V. U. Amsterdam, "Limitations of the Mini-Mental State Examination in diagnosing dementia.," *International Journal of Geriatric Psychiatry*, vol. 12, no. January 1996, pp. 101–108, 199

