INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

MARCIA RENATA HIDALGO MARQUES

Avaliação da gordura hepática utilizando ressonância magnética

São Carlos

2016

MARCIA RENATA HIDALGO MARQUES

Avaliação da gordura hepática utilizando ressonância magnética

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestra em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Fernando Fernandes Paiva

Versão Original

São Carlos
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica revisada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Marques, Marcia Renata Hidalgo
Avaliação da gordura hepática utilizando ressonância magnética / Marcia Renata Hidalgo Marques; orientador Fernando Fernandes Paiva -- São Carlos, 2016.
130 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2016.

1. Esteatose hepática. 2. Imagem por ressonância magnética. 3. Espectroscopia por ressonância magnética. I. Paiva, Fernando Fernandes, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marcia Renata Hidalgo Marques

Dissertação apresentada ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de Concentração: Física Aplicada - Opção: Física Biomolecular.

Aprovado(a) em: 29/03/2016

Comissão Julgadora

Dr(a). Fernando Fernandes Paiva

Instituição: (IFSC/USP)

Dr(a). Gabriela Castellano

Instituição: (UNICAMP/Campinas)

Dr(a). Carlos Ernesto Garrido Salmon

Instituição: (FFCLRP/USP)

À minha família: papai, mamãe e irmã com toda gratidão e carinho.
À minha avó (in memorian).
Dedico-lhes e compartilho minha felicidade na concretização de um sonho, em coração e em pensamento.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Fernando Fernandes Paiva, que desde quando eu estava na graduação, no ano de 2012, aceitou me orientar como aluna de iniciação científica e depois como aluna do programa de mestrado. Sou imensamente grata por todos os ensinamentos, tanto os que me fizeram crescer como uma profissional da área de Ressonância Magnética, como os que me fizeram crescer como pessoa.

Ao Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino, pela parceria nesse trabalho.

À minha família, mamãe Nieves, papai Benedito, irmã Fernanda por todo amor, carinho, suporte e preocupações, mesmo que exageradas. Mas sempre acreditando em mim, no meu trabalho e na minha carreira.

Ao meu namorado Guilherme, pela paciência e companheirismo.

Aos amigos do CIERMag, pelas boas conversas, pelos bons cafés e por estarem sempre prontos a ajudar.

Por fim, gostaria de agradecer ao Instituto de Física de São Carlos, pela oportunidade de realização do curso de mestrado e a CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

"O lucro do nosso estudo é tornarmo-nos

melhores e mais sábios"

Michel de Montaigne

RESUMO

MARQUES, M. R. H. **Avaliação da gordura hepática utilizando ressonância magnética**. 2016. 130 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

A esteatose hepática, que se caracteriza pelo acúmulo excessivo de gordura nas células do fígado, é um problema que vem preocupando a comunidade médico-científica, pois sua incidência vem aumentando a nível global, com expectativa de se tornar a doença crônica hepática de maior predominância em várias partes do mundo. Apesar de ser considerada uma doença benigna, a esteatose pode evoluir para doenças mais graves como cirrose, fibrose avançada, esteato hepatite (com ou sem fibrose) ou carcinoma. Entretanto, é potencialmente reversível, mesmo em quadros mais graves, o que reforça a urgência de se desenvolver métodos confiáveis para detecção e avaliação, inclusive ao longo de tratamento. Os métodos atuais para diagnóstico e quantificação da gordura hepática ainda são falhos: com a ultrassonografia não se é capaz de realizar quantificação; a tomografia computadorizada faz uso de radiação ionizante; a punção (biópsia), considerada o padrão ouro, é precisa, mas invasiva e pontual. A Ressonância Magnética (RM), tanto com espectroscopia (MRS) como com imagem (MRI), são alternativas completamente não invasivas, capazes de fornecer o diagnóstico e quantificação da gordura infiltrada no fígado. Entretanto, os trabalhos encontrados na literatura utilizam sequências de pulsos desenvolvidas especialmente para esse fim, com métodos de pós-processamento extremamente rebuscados, o que não é compatível com o estado atual dos equipamentos encontrados em ambientes clínicos nem mesmo ao nível de experiência e conhecimento das equipes técnicas que atuam em clínicas de radiodiagnóstico. Assim, o objetivo central do presente trabalho foi avaliar o potencial da RM como candidato a método de diagnóstico e de quantificação de gordura em ambientes clínicos, utilizando, para isso, sequências de pulsos convencionais, disponíveis em qualquer sistema comercial de RM, com protocolos de aquisição e processamento compatíveis com àqueles realizados em exames clínicos, tanto no que se refere à simplicidade como ao tempo total de aquisição. Foram avaliadas diferentes abordagens de MRS e MRI utilizando a biópsia hepática como padrão de referência. Foram avaliados pacientes portadores de diabetes tipo

II, que apresentam alta prevalência de esteatose hepática não alcoólica, além de grande variabilidade nos percentuais de gordura. Foram realizadas medidas de correlação, acurácia, sensibilidade e especificidade de cada uma das abordagens utilizadas. Todos os métodos avaliados apresentaram alto grau de correlação positiva (> 87%) com os dados obtidos de maneira invasiva, o que revela que os valores obtidos utilizando RM estão de acordo com aquilo observado pela biópsia hepática. Muito embora os métodos de processamento utilizados não sejam tão complexos quanto seriam necessários caso uma quantificação absoluta fosse desejada, nossas análises mostraram alta acurácia, especificidade e sensibilidade da RM na avaliação da esteatose. Em conclusão, a RM se apresenta, de fato, como uma excelente candidata para avaliar, de forma não invasiva, a fração de gordura hepática, mesmo quando se considera as limitações impostas por um ambiente clínico convencional. Isso sugere que essas novas metodologias podem começar a migrar para ambientes clínicos sem depender das sequências complexas e dos processamentos exóticos que estão descritos na literatura mais atual.

Palavras-chave: Esteatose hepática. Imagem por ressonância magnética. Espectroscopia por ressonância magnética.

ABSTRACT

MARQUES, M. R. H. **Fat liver evaluation using magnetic resonance**. 2016. 130 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Hepatic steatosis is a disease characterized by excessive accumulation of fat in liver cells. Its incidence is increasing and it is expected to become the chronic liver disease with the highest prevalence worldwide, which became a major concern to medical and scientific community. Although considered a benign disease, fatty liver can evolve to more serious diseases such as cirrhosis, advanced fibrosis, steatohepatitis (with or without fibrosis) or carcinoma. However, it is potentially reversible, even in the most severe cases, which reinforces the urgent need to develop reliable methods for detection and evaluation, including throughout treatment. Current methods for diagnosis and measurement of liver fat are still flawed: ultrasound is not able to perform quantification; CT uses ionizing radiation; biopsy, considered the gold standard, is accurate but invasive and focal. Magnetic resonance imaging (MRI) and spectroscopy (MRS) are completely non-invasive alternatives capable of providing diagnosis and quantification of infiltrated fat in the liver. However, studies in the literature frequently employ pulse sequences especially developed for this purpose, with extremely elaborate post-processing methods, which are not compatible with the current state of the art of typical clinical scanners or even with the level of experience and knowledge of technical staff working in radiology clinics. Thus, the main goal of this study was to evaluate the potential of MRI as a candidate for diagnosing and quantifying fat liver in clinical settings, using conventional pulse sequences, acquisition and post-processing protocol, compatible with those performed in clinical examinations in both simplicity and total acquisition time. We investigated different approaches of MRI and MRS using liver biopsy as reference standard. We evaluated patients with type II diabetes, which have a high prevalence of non-alcoholic fat liver disease, and great variability in the percentage of fat. Correlation, accuracy, sensitivity and specificity measurements of each of the approaches used were performed. All evaluated methods highly correlated (> 87%) with the data obtained from invasive measurement, which shows that the values obtained using MRI are consistent with that observed for liver biopsy. Although the

processing methods used are not as complex as would be required if an absolute quantification was desired, our analyzes showed high accuracy, sensitivity and specificity of MRI in the evaluation of steatosis. In conclusion, MRI is an excellent candidate to assess liver fat fraction in a non-invasive way, even when considering the limitations imposed by conventional clinical setting. This suggests that these new methods may begin to migrate to clinical environments without relying on complex sequences and exotic post-processing techniques that are described in the current literature.

Keywords: Hepatic steatosis. Magnetic resonance imaging. Magnetic resonance spectroscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Número de artigos científicos publicados nos últimos anos de pesquisas associadas à NAFLD. Gráfico mostra que essas pesquisas cresceram rapidamente nos últimos 15 anos. 26

Figura 2 - Anatomia do fígado. Vista frontal, onde se observa o lobo direito, esquerdo e o ligamento falciforme. 29

Figura 3 - Anatomia funcional do fígado de acordo com a classificação de Couinaud. 30

Figura 4 - Níveis de energia para núcleos com spin ½ quando submetidos a um campo magnético externo. 44

Figura 5 - Transição dos núcleos de spins ½ entre os níveis de energia quando irradiados por ondas eletromagnéticas de frequência $\hbar\omega$. 45

Figura 6 - Spins orientados (A) aleatoriamente na ausência de campo magnético e (B) alinhados paralelamente ou antiparalelamente na presença de um campo magnético B_0. 46

Figura 7 - Partícula carregada que gira ao redor de seu próprio eixo, criando um momento magnético μ_n. 47

Figura 8 - Núcleo com spin e momento magnético (μ_n) na presença de um campo magnético B0, realizando movimento de precessão ao redor do eixo do campo. 48

Figura 9 - Esquema mostrando a precessão dos spins ao redor do campo externo B_0 e a magnetização resultante M_0. 50

Figura 10 - Sistema de coordenadas girantes (x', y', z') com frequência $\boldsymbol{\Omega}$. 51

Figura 11 - Campo $\boldsymbol{B1}$ decomposto em duas componentes circularmente polarizadas girando em sentidos contrários – uma no sentido horário $\boldsymbol{B1}+$ e outra no anti-horário $\boldsymbol{B1}-$. 53

Figura 12 - Excitação dos núcleos atômicos através dos pulsos de radiofrequência. Da esquerda para a direita estão representados um pulso de 90°, um pulso de 180° (pulso de inversão) e um pulso θ, respectivamente. 56

Figura 13 - Mecanismos de relaxação após a aplicação de um pulso de 90º. 59

Figura 14 - O esquema mostra a evolução temporal de um experimento para obtenção de um eco de spins. Primeiro, há a aplicação do pulso de 90° seguido da aplicação do pulso de 180° que faz com que surja um eco de spins, em $t = TE$. 60

Figura 15 - O esquema representa a obtenção de um eco de spins. Após um pulso de 90°, a magnetização é levada para o plano transversal, seguido de uma defasagem devido às interações spin-spin. O pulso de 180° é aplicado em *y'* para reverter a fase, corrigindo a defasagem natural, formando um eco de spins. 61

Figura 16 - Campo magnético produzido pelas bobinas de gradiente (a) na direção x, (b) na direção y e (c) na direção z. 62

Figura 17 - A fatia é excitada por um pulso de RF seletivo aplicado em conjunto com um gradiente de seleção. 66

Figura 18 - Na fatia selecionada é aplicado um gradiente de fase, sendo esta subdividida em regiões com fases bem determinadas. 67

Figura 19 - A figura representa a aplicação do gradiente de leitura. O volume de elemento indicado está agora codificado, e desta forma, gera um sinal característico, pois apresenta frequência de precessão e fase bem determinadas. 68

Figura 20 - O esquema mostra a forma de aquisição de imagens ponderadas por T_1 e T_2. 69

Figura 21 - Sequência de pulsos GRE. 71

Figura 22 - Espectro da Vitamina C, que possui várias frequências ressonantes e, portanto, o FID obtido é a combinação dos FIDs individuais. 72

Figura 23 - Sequência de pulsos PRESS. 75

Figura 24 - Espectro de MRS da gordura hepática de um sujeito com acúmulo de gordura no fígado. 79

Figura 25 - Espectro de MRS simulado da gordura hepática. 81

Figura 26 - Representação da quantificação utilizando o software jMRUI. 82

Figura 27 - Conjunto de espectros representativos adquiridos com múltiplos TEs em um paciente com esteatose moderada. 87

Figura 28 - Ajuste não linear para determinação da densidade de prótons da água e da gordura hepática. 88

Figura 29 - Imagem representativa do fígado de um paciente mostrando o posicionamento típico da ROI definida para a determinação do percentual de gordura hepática. 89

Figura 30 - Dados simulados para representar a espectro de RM da gordura hepática com diferentes níveis de ruído. 96

Figura 31 - Amplitudes dos FIDs obtidos para cada uma das componentes do sinal de gordura simulado obtidas utilizando o algoritmo AMARES. 97

Figura 32 - Taxas de relaxação transversal dos picos simulados obtidas utilizando o algoritmo AMARES. 99

Figura 33 - Espectros representativos obtidos no fígado de pacientes dos diferentes grupos avaliados (controle, esteatose leve, moderada e severa). 101

Figura 34 - Espectro representativo obtido no fígado de um paciente e o respectivo resíduo do sinal após o processamento utilizando o método AMARES. 102

Figura 35 - Imagens IP (coluna da esquerda) e OP (coluna da direita) representativas obtidas no fígado de pacientes dos diferentes grupos avaliados (controle, esteatose leve, moderada e severa). 104

Figura 36 - Distribuição dos dados obtidos utilizando técnicas de RM. A linha tracejada representa uma distribuição normal dos dados. 106

Figura 37 - Correlação entre os dados de fração de gordura hepática obtida com biósia hepática e MRS. O coeficiente de correlação Spearman (ρ) está listado no próprio gráfico. 107

Figura 38 - Correlação entre os dados de fração de gordura hepática obtida com biósia hepática e MRI (duplo-eco, triplo-eco e multieco). O coeficiente de correlação Spearman (ρ) obtido em cada um dos casos está listado no respectivo gráfico. 108

Figura 39 - Fração de gordura estimada pelos diferentes métodos de RM para cada um dos grupos de pacientes avaliado. 110

Figura 40 - Performance diagnóstica para esteatose leve das sequências de MRI e MRS utilizando histopatologia como referência. A linha pontilhada mostra o valor de corte para especificidade e sensibilidade estimado. 114

Figura 41 - Performance diagnóstica para esteatose moderada das sequências de MRI e MRS utilizando histopatologia como referência. A linha pontilhada mostra o valor de corte para especificidade e sensibilidade estimado. 114

Figura 42 - Performance diagnóstica para esteatose severa das sequências de MRI e MRS utilizando histopatologia como referência. A linha pontilhada mostra o valor de corte para especificidade e sensibilidade estimado. 115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Núcleos utilizados em RM e suas características. 43

Tabela 2 - Componentes espectrais da gordura obtidas utilizando MRS.....78

Tabela 3 - Parâmetros usados nas simulações do espectro de MRS da gordura. 80

Tabela 4 - Parâmetros utilizados na definição da base utilizada para quantificação de gordura em dados *in vivo* utilizando o AMARES. 87

Tabela 5 - Medianas obtidas para os diferentes graus de esteatose, determinados pela biópsia, para as medidas feitas utilizando as diferentes técnicas de RM. IQR: intervalo interquartil. 109

Tabela 6 - Performance diagnóstica para esteatose das sequências de MRI e MRS utilizando histopatologia como referência. AUC: área sob a curva. 116

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASD	*Alcoholic Steosis Disease*
AUC	Área sob a curva
FID	*Free Induction Decay*
FOV	*Field of View*
GRE	Gradiente Eco
IP	*In phase*
IQR	Intervalo interquartil
MRI	*Magnetic Resonance Imaging*
MRS	*Magnetic Resonance Spetroscopy*
NAFLD	*Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*
OP	*Out of phase*
PRESS	*Point Resolved Spectroscopy Sequence*
PSF	*Point Spread Function*
R_2	Taxa de Relaxação Transversal
RF	Radiofrequência
RG	Referencial Girante
RL	Referencial do Laboratório
RM	Ressonância Magnética
ROI	*Region of Interest*
STEAM	*Stimulated-Echo Acquisition Mode*
SNR	*Signal to Noise Ratio*
TAG	Triacilglicerídeo
TC	Tomografia Computadorizada
TE	Tempo ao Eco
TR	Tempo de Repetição
US	Ultrassonografia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 25

2 O FÍGADO E A INFILTRAÇÃO GORDUROSA NAS CÉLULAS HEPÁTICAS 29
2.1 ESTEATOSE HEPÁTICA 31
2.2 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DE ESTEATOSE HEPÁTICA 34
2.2.1 ULTRASSONOGRAFIA 34
2.2.2 TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA 35
2.2.3 BIÓPSIA HEPÁTICA 36
2.2.4 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA 37

3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA 41
3.1 NÚCLEO ATÔMICO 41
3.2 INTERAÇÃO ENTRE NÚCLEO ATÔMICO E CAMPO MAGNÉTICO 42
3.3 ANALOGIA SEMICLÁSSICA 47
3.4 MAGNETIZAÇÃO 49
3.5 O SISTEMA GIRANTE DE COORDENADAS 51
3.6 PULSOS DE RADIOFREQUÊNCIA E SEUS EFEITOS 53
3.7 AS EQUAÇÕES DE BLOCH 56
3.8 TEMPOS DE RELAXAÇÃO: T_1 E T_2 58
3.9 ECO DE SPINS 59
3.10 PRINCÍPIOS BÁSICOS DE IMAGENS POR RM 61
3.10.1 IMAGENS UNIDIMENSIONAIS 62
3.10.2 IMAGENS BIDIMENSIONAIS 64
3.10.2.1 EXCITAÇÃO SELETIVA E CODIFICAÇÃO ESPACIAL: O PASSO A PASSO PARA OBTENÇÃO DE UMA IMAGEM. 66
3.10.3 CARACTERÍSTICAS DA MRI 68
3.10.4 SEQUÊNCIA GRADIENTE ECO 70
3.11 PRINCÍPIOS BÁSICOS DE ESPECTROSCOPIA POR RM 72

4 MATERIAIS E MÉTODOS 77
4.1 AVALIAÇÃO DO ALGORITMO AMARES PARA QUANTIFICAÇÃO DE GORDURA 77
4.1.1 COMPLEXIDADE ESPECTRAL DA GORDURA 78
4.1.2 SIMULAÇÃO DO ESPECTRO DE RM DA GORDURA 80
4.1.3 PROCESSAMENTO DOS DADOS SIMULADOS 81
4.2 QUANTIFICAÇÃO DE GORDURA HEPÁTICA UTILIZANDO RM 83
4.2.1 PACIENTES 83
4.2.2 SISTEMA DE RM 84
4.2.3 RM: PROTOCOLOS DE AQUISIÇÃO 84
4.2.3.1 MRS 84
4.2.3.2 MRI 85
4.2.4 RM: PROTOCOLOS DE PROCESSAMENTO 85
4.2.4.1 MRS 86
4.2.4.2 MRI 88
4.3 BIÓPSIA HEPÁTICA 92
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA 92

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES 95
5.1 AVALIAÇÃO DO ALGORITMO AMARES PARA QUANTIFICAÇÃO DE GORDURA.....95
5.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....100
5.3 QUANTIFICAÇÃO DE GORDURA HEPÁTICA UTILIZANDO RM.....101

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS 117

REFERÊNCIAS.....121

1 INTRODUÇÃO

Esteatose hepática não alcoólica, ou NAFLD (do inglês *"Non-alcoholic fatty liver disease"*) é uma condição em que há um acúmulo excessivo de gordura nas células do fígado, em indivíduos que consomem pouco ou não consomem bebidas alcóolicas. (1-5) A prevalência da NAFLD, que na maioria dos casos está associada à obesidade e resistência à insulina, vem aumentando a nível global, e a expectativa é que se torne a doença crônica hepática de maior predominância em várias partes do mundo. (6-7)

Com mais de 70% dos pacientes com esteatose obesos, tornou-se a doença hepática de maior prevalência nos Estados Unidos. De modo geral, a maioria dos estudos nos Estados Unidos reportam uma prevalência de 10-35% de NAFLD. Essa alta prevalência nesse país pode ser explicada pelo fato de que um terço de sua população é considerada obesa, condição já citada como fator altamente associado à esteatose hepática não alcoólica. (8)

No Brasil, estudos coordenados pelo professor da Universidade Federal de São Paulo, Edison Roberto Parise, utilizando a ultrassonografia como método de diagnóstico, encontraram cerca de 20% de esteatose hepática na população geral. Quando pacientes portadores de diabetes foram avaliados pelo ultrassom em relação à presença de esteatose, 70% indicaram a presença da doença. (9)

A grande importância que se dá à NAFLD é devido ao seu potencial evolutivo. Apesar de inicialmente ser considerada uma doença benigna, sabe-se que a esteatose pode evoluir para doenças mais graves como cirrose, fibrose avançada, esteato hepatite (com ou sem fibrose) ou carcinoma. (10-13) Mesmo sendo patogênica, a esteatose é potencialmente reversível, mesmo em quadros mais graves. Devido a isso, existe uma necessidade urgente – nas áreas clínicas e de pesquisa – para que se detecte e avalie o quadro clínico da NAFLD. (10,14)

Um estudo bibliométrico de periódicos científicos (2015) mostrou que nos últimos anos houve um rápido crescimento no número dos artigos relacionados à NAFLD e às doenças associadas a ela, como a síndrome metabólica e a obesidade. Com a pesquisa sobre NAFLD em expansão, métodos novos e eficazes de prevenção e controle da doença são esperados em um futuro próximo. (15)

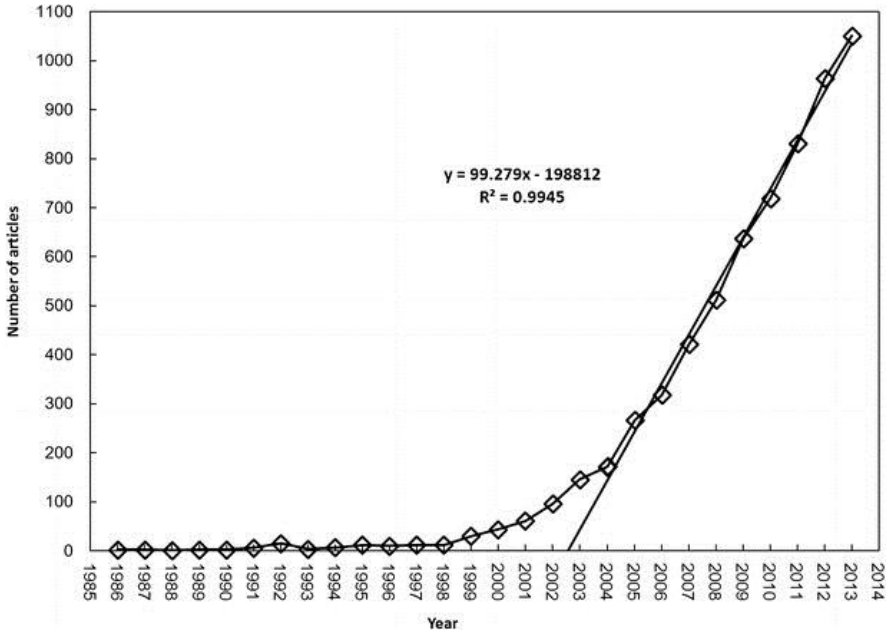

Figura 1 - Número de artigos científicos publicados nos últimos anos de pesquisas associadas à NAFLD. Gráfico mostra que essas pesquisas cresceram rapidamente nos últimos 15 anos.

Fonte: ZHANG (15)

A biópsia hepática e análise histológica são consideradas o padrão ouro para diagnóstico de esteatose hepática. No entanto, a NAFLD também pode ser avaliada através de métodos de diagnóstico por imagem como a Ultrassonografia (US), a Tomografia Computadorizada (TC) e a Ressonância Magnética (RM). (10,14,16-18)

Como veremos nas próximas sessões, a biópsia é uma técnica invasiva e limitada espacialmente, enquanto a TC abrange todo o fígado, mas faz uso de radiação ionizante e devido a isso tem sua utilização limitada. A ultrassonografia é simples, mas não realiza quantificação e tem uma limitada relação sinal-ruído, além de ter sua eficácia ligada diretamente à experiência do operador, sendo pouco reprodutível. Se comparada aos demais métodos de diagnóstico, a RM aparece como o único método de diagnóstico não invasivo, com a qual é possível realizar quantificação e acompanhamento da evolução do quadro clínico de esteatose, com boa resolução e acurácia. (14,19,20)

O foco central do trabalho foi mostrar que a RM, tanto com espectroscopia (MRS, do inglês *Magnetic Resonance Spectroscopy*) como com imagens (MRI, do inglês *Magnetic Resonance Imaging*), é um excelente candidato a método de diagnóstico e de quantificação de gordura em ambientes clínicos. Muito embora vários trabalhos tenham sido feitos nesse sentido, nossa abordagem inclui sequências de pulsos convencionais, disponíveis em qualquer sistema comercial de

RM, com protocolos de aquisição compatíveis com àqueles realizados em exames clínicos, tanto no que se refere à simplicidade como ao tempo total de aquisição. Esse é um ponto importante do trabalho uma vez que a maior parte dos resultados encontrados na literatura não são compatíveis com os sistemas clínicos disponíveis, além de demandar que especialistas participem de todo o processo de aquisição e processamento dos dados.

Assim, avaliamos dados obtidos usando sequências de imagens e de espectroscopia com o intuito de estabelecer a eficácia e aplicabilidade de diferentes protocolos de aquisição no que se refere à adequada quantificação de gordura hepática de maneira não invasiva. Como referência, foram utilizados dados de biópsia hepática dos pacientes avaliados. Foram avaliados três protocolos de imagens (duplo eco, triplo eco e multieco) e um de espectroscopia por RM. Análises estatísticas de correlação e curvas de sensitividade e especificidade foram utilizadas para avaliação dos dados.

O presente trabalho está organizado de forma a cobrir os aspectos teóricos e experimentais relacionados à quantificação de gordura hepática utilizando RM. Os diferentes protocolos de aquisição e processamento de imagens e espectroscopia cobertos no presente trabalho, incluindo a base teórica necessária para a compreensão dos mesmos, bem como os resultados obtidos a partir de suas utilizações foram expostos em 7 capítulos.

Seguindo esta introdução, o segundo capítulo aborda, em linhas gerais, o caso clínico da infiltração de gordura nas células hepáticas, como elas ocorrem e doenças associadas a esse processo. Este capítulo traz, também, uma visão geral dos métodos de diagnóstico atuais, enfatizando suas respectivas vantagens e desvantagens.

O capítulo seguinte trata dos aspectos teóricos do fenômeno RM, incluindo uma descrição formal do mesmo. A contextualização e descrição das equações fenomenológicas de Bloch é seguida por uma abordagem dos principais conceitos necessários para a formação de imagens por RM.

O quarto capítulo descreve os aspectos teóricos e práticos de como a RM pode ser utilizada para medidas de gordura hepática. São discutidas as técnicas de imagens e espectroscopia utilizadas no presente trabalho, bem como os pontos mais importantes para que a quantificação da gordura hepática possa ser feita a partir desses dados.

Na sequência, o quinto capítulo traz a descrição detalhada da implementação dos protocolos de imagens e espectroscopia para estudo de uma população de pacientes com alta prevalência de NAFLD. Este capítulo inclui uma descrição do sistema de RM utilizado nos experimentos, bem como uma descrição dos estudos associados à eficiência dos métodos de processamento.

Os resultados obtidos e as respectivas análises são apresentadas no capítulo seguinte. As discussões e conclusões acerca dos métodos avaliados no que se refere à quantificação de gordura hepática em ambientes clínicos encerram o escopo dessa dissertação.

2 O FÍGADO E A INFILTRAÇÃO GORDUROSA NAS CÉLULAS HEPÁTICAS

O fígado saudável é um órgão macio, flexível e de superfície lisa pertencente ao sistema digestório. Em adultos seu peso normal varia entre 1200 e 1500 gramas sendo considerado o maior órgão interno do corpo Humano. Encontra-se localizado abaixo do diafragma no quadrante superior do abdômen direito. Funcionalmente, divide-se o fígado em dois lobos, o direito e o esquerdo, sendo o direito cerca de seis vezes maior que o esquerdo (figura 2). A estrutura responsável por esta divisão, o ligamento falciforme, não aparenta ter outra função a não ser a de garantir a fixação do fígado ao diafragma e à parede anterior abdominal; essa estrutura faz com que o fígado se movimente de acordo com a respiração. (21-22)

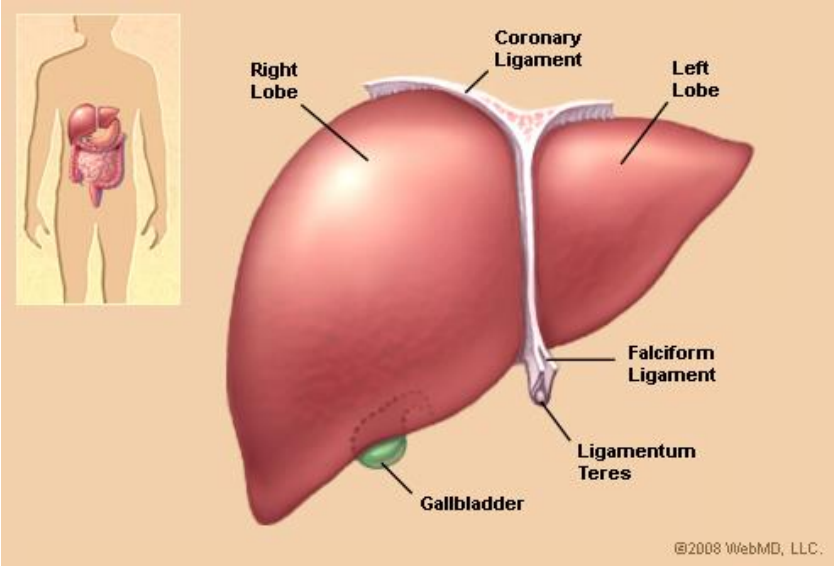

Figura 2 - Anatomia do fígado. Vista frontal, onde se observa o lobo direito, esquerdo e o ligamento falciforme.

Fonte: WEBMD (23)

O fígado está estrategicamente situado no sistema circulatório recebendo um suprimento sanguíneo duplo: cerca de 20% do seu fluxo é rico em gás oxigênio e provém da artéria hepática, enquanto o restante 80% é rico em nutrientes e provém da veia porta. Esta particularidade permite ao fígado controlar as substâncias que são absorvidas em todo o intestino e determinar quais delas vão entrar, e como vão entrar na circulação sistêmica. (24)

Cada lobo funcional possui seu próprio suprimento arterial devido a ramificações da artéria hepática e venoso devido a ramos da veia porta, além de

ductos hepáticos para drenagem biliar. Essas três estruturas são conhecidas como “tríade portal” e distribui-se pelos dois lobos – esquerdo e direito – de modo que sejam criados oito segmentos com independência funcional (figura 3). Essa divisão segmentada em oito lobos foi proposta por Couinaud em 1957 e é a aceita universalmente. (21,22,24-26)

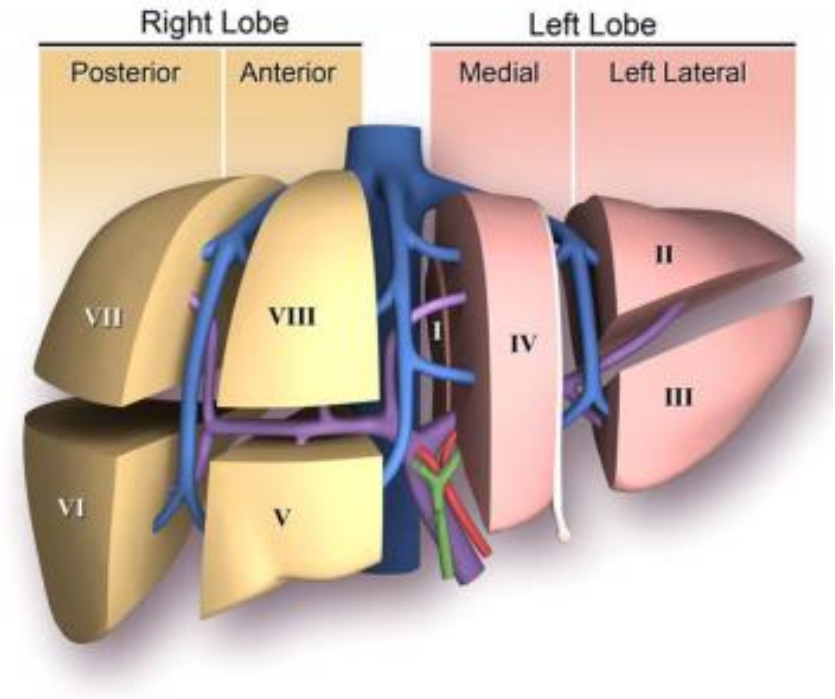

Figura 3 - Anatomia funcional do fígado de acordo com a classificação de Couinaud.
Fonte: SIBULESKY (26)

O tecido hepático é, em sua maioria, composto por células denominadas hepatócitos chegando a ocupar de 80 a 88% do volume total do fígado humano. Os hepatócitos, juntamente com outras células do fígado, desempenham funções vitais como síntese de proteínas, síntese, armazenamento e exportação de triacilglicerídeos neutros para o tecido adiposo e regulação da energia homeostática que garante o bom funcionamento do organismo. O fígado também assume funções no metabolismo de gorduras, na excreção de medicamentos e toxinas como o álcool, por exemplo [6].

Danos causados aos hepatócitos resultam em consequências que se manifestam, geralmente, como infiltrações de gordura (esteatose), inflamações (hepatite) ou morte celular (necrose). (21,24,27)

2.1 ESTEATOSE HEPÁTICA

A esteatose hepática, ou fígado gorduroso, é uma patologia histologicamente caracterizada por um acúmulo anormal de triacilglicerídeos (TAG) ou outros tipos de gordura nos hepatócitos (superior a 10% do peso total do fígado). (1-3,8) Em condições fisiológicas normais e boa nutrição, não há acúmulo de triacilglicerídeos nas células hepáticas; no entanto, algumas doenças e situações são fatores de risco para o desenvolvimento de esteatose hepática.

As causas que originam a esteatose hepática agrupam-se em dois conjuntos e presença do consumo de álcool é responsável por esta divisão. (4,21,28-30) Um indivíduo que consuma uma quantidade de álcool superior a 20 gramas por dia apresenta uma elevada probabilidade de possuir um fígado esteatótico; para este caso, dá-se o nome de Doença Gordurosa Alcoólica (ASD, do inglês *Alcoholic Steosis Disease*). (17,29) O outro tipo de esteatose, já citada e foco do trabalho, não associado ao consumo de álcool, é a NAFLD.

No caso da ASD, sabe-se que consumo crônico do álcool promove a esteatose por desregular o metabolismo lipídico no fígado. Essa desregulação ocorre via geração de acetaldeído, radicais livres e estresse no retículo endoplasmático. As consequências são o bloqueio de proteínas responsáveis pela oxidação de ácidos graxos e de exportação dos mesmos. Além disso, o consumo crônico de álcool induz a ativação de uma proteína responsável pela síntese de ácidos graxos. Estes mecanismos, e outros não citados, levam a alterações no metabolismo dos lipídios no fígado, aumentando a lipogênese e diminuindo oxidação e exportação dos ácidos graxos. (28-29)

A patogênese associada à NAFLD não é totalmente esclarecida. (31, 32) No entanto, é fato que uma parte dos casos de esteatose não alcoólica está associada à resistência insulínica, ou seja, é uma manifestação hepática quanto aos efeitos fisiológicos da resistência à insulina. (31) Acredita-se que a causa da NAFLD em pacientes com Diabetes tipo II está, justamente, associada a isso, ou seja, ao organismo não conseguir usar adequadamente a insulina que produz. (30,33-34)

A insulina, hormônio produzido pelo pâncreas, participa do metabolismo de lipídios e carboidratos no organismo humano. Elevados níveis desse hormônio no

organismo promovem uma série de reações metabólicas, tanto nos adipócitos (células do tecido adiposo), como nos hepatócitos. Nos adipócitos, elevados níveis de insulina promovem a lipólise, fazendo com que a oferta de ácidos graxos ao fígado aumente – ácidos graxos livres. Já nos hepatócitos, elevados níveis de insulina promovem a síntese de ácidos graxos livres e inibem a oxidação dos mesmos. (31)

Não menos importante, mas secundária à resistência à insulina, há o aumento na degradação da apolipoproteína B – apolipoproteína contida nas lipoproteínas (quilomícrons, VLDL, IDL, LDL) – que atua regulando a ligação entre a lipoproteína e seu receptor celular, mediando processos celulares de degradação. (35) Esse aumento leva a uma redução da excreção hepática de triacilglicerídeos, consequentemente aumentando a quantidade de TAG estocada no fígado. (31)

A obesidade é uma doença de acúmulo de triglicerídeos no tecido adiposo. Quando este atinge o seu limite de expansão começa a ocorrer acúmulo ectópico de gorduras, o que inclui o fígado. O mecanismo exato da patogênese da NAFLD na obesidade também não é totalmente claro. Sabe-se, no entanto, que há uma desregulação entre a síntese de triacilglicerídeos no fígado e sua excreção. (30)

Há outros fatores de risco, não tão intimamente relacionados à esteatose hepática, que valem ser citados: idade, etnia e infecções crônicas. Frith e colegas realizam um estudo com 351 pacientes portadores de NAFLD, diagnosticado por biópsia, subdividos em três grupos, os novos (< 50 anos), meia idade (entre 50 – 60 anos) e os idosos (>60 anos). (36) Foi mostrado que a prevalência de NAFLD e fibrose aumenta com a idade dos pacientes. A hipótese é de que isso ocorra devido ao fato de que pacientes com mais idade estão mais suscetíveis a fatores como hipertensão, diabetes etc. Outro ponto a se considerar, é o tempo de evolução da doença, proporcional à idade do paciente. (8)

Em 2008, um estudo de associação do genoma, em uma população compreendendo hispânicos, afro-americanos e euro-americanos, mostrou uma variante genética comum no gene PNPLA3. (37) Esse gene associado ao acúmulo de gordura no fígado, está mais presente em hispânicos, seguido pelos caucasianos e afro-americanos. Isso está de acordo com diversos estudos que reportaram a prevalência de esteatose hepática em hispânicos, seguidos pelos brancos não hispânicos, e os com menores taxas de NAFLD, os afro-americanos. (38)

Embora não seja, especificamente, considerada uma parte da NAFLD, casos de esteatose hepática não alcoólica podem frequentemente ser encontrados juntos com casos de infecções. Um exemplo típico é o vírus da hepatite C, que parece aumentar a síndrome metabólica, por induzir um aumento à resistência insulínica. (39)

Além das mais diversas causas e fatores de risco, existem variações morfológicas no padrão de infiltração gordurosa no tecido hepático. Conforme a distribuição do depósito de gordura no fígado, a esteatose pode ser considerada difusas, heterogênea, focal, perilesional, intralesional, perivascular e subcapsular.

O padrão difuso é o mais encontrado na esteatose hepática, assumindo uma forma de múltiplos nódulos, sendo caracterizado por envolvimento difuso e homogêneo do fígado, o que torna seu diagnóstico mais rápido e acurado. O padrão heterogêneo foi primeiramente descrito por Basaran e colaboradores, que perceberam que haviam áreas do fígado com esteatose hepática difusa que possuíam maior infiltração gordurosa em comparação ao resto do fígado. (40-42) O padrão focal de infiltração é frequentemente encontrado como uma infiltração de aparência similar à difusa, mas limitada a uma região hepática, no entanto também podem ter uma aparência tumoral: nodular e maciça. (41-42)

Os demais padrões são encontrados menos frequentemente e são de difícil diagnóstico. Isso ocorre pela aparência pseudotumoral de algumas formas atípicas de infiltração gordurosa, que podem simular lesões hepáticas nodulares de várias etiologias. (41,43)

Apesar de tamanho alcance da esteatose, os métodos atuais para diagnóstico e quantificação da gordura ainda são falhos: a ultrassonografia (US) é simples e rápida, mas não é capaz de realizar quantificação. A biópsia, padrão ouro, embora precisa, é invasiva e pontual. A tomografia computadorizada (TC) permite uma melhor visualização, quando comparada às técnicas anteriores, mas faz uso de radiação ionizante. Assim, a RM, tanto a com MRS como com MRI, surge como uma alternativa completamente não invasiva, capaz de fornecer diagnóstico e quantificação da gordura presente no fígado com boa precisão em tempo hábil. (44-45)

2.2 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DE ESTEATOSE HEPÁTICA

Além da avaliação clínica, o diagnóstico e o acompanhamento da esteatose hepática demanda métodos auxiliares de avaliação do tecido do fígado, seja de maneira indireta, através de imagens ou espectroscopia, ou direta, como por exemplo a biópsia hepática. A seguir, serão expostos os principais métodos utilizados para essa avaliação atualmente.

2.2.1 ULTRASSONOGRAFIA

A ultrassonografia é um método de diagnóstico por imagem que faz uso de ondas mecânicas (ondas de ultrassom) com frequência acima da faixa da audição humana ($> 20kHz$). Por ser onda mecânica, é necessária a existência de um meio de propagação, e a velocidade de propagação dependerá das propriedades desse meio, como a impedância acústica, a absorção da onda pelos tecidos (atenuação) etc. (46)

As ondas de ultrassom são geradas por um transdutor, pela conversão de energia térmica, elétrica ou magnética em mecânica. Ao passo que as ondas se propagam pelos tecidos, parte é refletida ao equipamento (ecos) e parte é atenuada. Os ecos são detectados, transformados em sinais elétricos e estes transformados em imagens. As imagens são adquiridas em escala de cinza, que varia do branco (hiperecogênico) ao preto (anecogênico). (47)

A ultrassonografia caracteriza-se por um método não invasivo, com baixo custo operacional. No entanto, há algumas limitações como a presença de ruídos do tipo Speckle, que é um ruído granular inerente à técnica que ocorre devido à interferência das ondas de ultrassom, o que degrada bastante a qualidade da imagem. (48) Outra desvantagem se dá pelo grau de atenuação devido à absorção da onda sonora, dependendo dos diferentes tecidos. O grau de atenuação também depende da frequência da onda, explicando o porquê ondas com altas frequências terão menor poder de penetração nos tecidos.

Como ferramenta de diagnóstico em esteatose hepática, a ultrassonografia é o método de imagem mais utilizado para avaliar, qualitativamente, o grau de esteatose. No entanto, possui baixos valores de repetitividade e reprodutibilidade,

por ser dependente do equipamento e, principalmente, do operador. Além do mais, em pacientes obesos, grupo de risco para esteatose hepática, há uma dificuldade adicional devido ao baixo poder de penetração do ultrassom nos tecidos. (47,49)

2.2.2 TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA

Tomografia, do grego, significa cortes ("*tomo*") e registrar ("*grafen*"), ou seja, é uma modalidade de diagnóstico por imagens que permite a visualização de estruturas em formas de cortes, sem que haja superposição de imagens na geração da imagem final. (50-51)

A tomografia computadorizada se baseia nos mesmos princípios da radiografia convencional (Raios-X), segundo os quais tecidos com diferentes composições absorvem a radiação eletromagnética, na faixa dos Raios-X, de maneira distinta. Tecidos mais densos, como o fígado, ou com elementos pesados (cálcio), absorvem mais radiação do que tecidos menos densos, como por exemplo, o pulmão. (52-54) Assim, a tomografia indica a quantidade de radiação absorvida por cada parte do corpo (radiodensidade), e traduz essas variações numa escala de cinza, produzindo uma imagem. (55-57)

Como já citado, a TC é um método de diagnóstico por imagem que faz uso de tubos de Raios-X movendo-se em torno do paciente. Raios-X são ondas eletromagnéticas de pequeno comprimento de onda e pertencem ao grupo das radiações ionizantes (Raios-X, gama e radiação cósmica), ou seja, são capazes de ionizar o meio por onde passam, isto é, transferem parte ou toda energia que carregam. Após ser gerado por tubos de alta potência, o feixe de Raios-X, altamente colimado, atravessa apenas uma parte do corpo do paciente e é atenuado por este, interagindo com um conjunto de detectores responsáveis por transformar o sinal da radiação eletromagnética em sinal elétrico. (55,57-58)

Uma das desvantagens da TC ocorre quando as estruturas diferem muito pouco entre si, especialmente quando os tecidos possuem densidades muito próximas, como no caso de tumores, tecidos adjacentes, ou grau leve de esteatose hepática. Outro ponto desfavorável para TC é que este se caracteriza como um método de diagnóstico invasivo, justamente pelo efeito nocivo da radiação ionizante utilizada. A base dos estudos que associam a radiação ionizante com indução do

câncer está em estudos epidemiológicos nos sobreviventes japoneses da bomba atômica. Não se sabe ao certo quanto de radiação é seguro receber, então quanto menos, melhor. (53, 59-60)

A TC pode fornecer uma objetiva avaliação da atenuação dos Raios-X na avaliação da esteatose hepática. (16,54) No entanto, a presença de ferro, cobre, fibrose ou edema confunde valores de atenuação, levando a erros no diagnóstico. Além do mais, possui baixa sensibilidade para esteatose leve a moderada. E a utilização de radiação ionizante impede sua utilização em crianças e repetição para acompanhar tratamento em adultos. (61)

2.2.3 BIÓPSIA HEPÁTICA

A biópsia do fígado é frequentemente requisitada no diagnóstico de muitas doenças hepáticas em que juntamente com uma análise histológica é considerada o padrão ouro para diagnóstico e quantificação da esteatose hepática. (16,18, 62-64)

A análise histológica providencia informação acerca da distribuição da gordura dentro dos lobos hepáticos fornecendo uma análise semiquantitativa da esteatose. Sob o ponto de vista microscópico, a esteatose pode ser organizada em duas categorias, dependendo do tamanho das gotículas de gordura depositadas nos hepatócitos: deposição microvesicular ou macrovesicular. O tipo de depósito que surge com maior frequência é a macrovesicular caracterizada por um único vacúolo lipídico localizado no citoplasma do hepatócito. As dimensões desta estrutura, superiores às do núcleo, obrigam o deslocamento do núcleo no citoplasma, sendo típica em casos de esteatose não alcoólica. Já nos casos de depósitos de gordura em microvesículas, numerosas inclusões preenchem o citoplasma do hepatócito de forma desorganizada. Essas são, geralmente, as formas mais severas de esteatose e estão associadas ao alcoolismo, ou a alguma outra toxicidade (medicamentos). (3-4,28)

A esteatose é tipicamente dividida em quatro graus de severidade, dependendo do número de células preenchidas com vacúolos de gordura.

- Grau 0 (normal): até 5% de células afetadas;
- Grau 1 (leve): de 5% a 33% de células afetadas;
- Grau 2 (moderada): de 34% a 66% de células afetadas;

- Grau 3 (severa): 67% ou mais de células afetadas.

Para a realização do procedimento de punção, existem diferentes tipos de agulha e vias de acesso. (62) Todas apresentam vantagens e desvantagens, e a opção deve ser feita pela que melhor atenda ao objetivo desejado – por exemplo, considerando se há fibrose ou não – e, principalmente, às condições clínicas do paciente. (65). É preciso, entretanto, que o fragmento obtido na punção siga alguns padrões: 1 a 3 cm de comprimento e de 1,2 a 2 mm de diâmetro (62) para que o mesmo seja suficiente para uma adequada avaliação. (66)

No que diz respeito às informações obtidas, a biópsia é um método de diagnóstico e quantificação vantajoso. No entanto, a biópsia possui o grande inconveniente de ser altamente invasiva podendo, mesmo com baixa incidência, desencadear complicações como hemorragias internas, infecção, formação de hematomas ou extravasamento biliar. Além disso, é um procedimento que necessita de repouso (mínimo de seis horas), devido ao quadro doloroso apresentado. (2, 63) Além do mais, a confiabilidade dos resultados fornecidos por esta técnica deve também ser questionada, uma vez que a amostra recolhida na biópsia corresponde a uma pequena porção do fígado o que pode não ser representativa de uma esteatose que possua uma distribuição de gordura não homogênea, como é o caso de uma esteatose focal. (63-64, 66)

2.2.4 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

Já no início da década de 90, Longo e colegas publicaram um estudo em que MRS foi utilizada para acessar, quantitativamente, a gordura hepática. Os autores obtiveram excelentes concordâncias ao correlacionar esses valores com os obtidos com CT e análise histológica. (67) A partir de então, vários estudos foram realizados na direção de se obter espectros do fígado selecionando um único volume (*voxel*), pequeno suficiente para que o mesmo fosse posicionado em uma região hepática sem interferência de outros tecidos, garantindo uma aquisição confiável e rápida. Duas sequências principais, e suas variantes, têm sido utilizadas para tal: a *Point Resolved Spectroscopy Sequence* (PRESS) e a *Stimulated-Echo Acquisition Mode* (STEAM).

Já em 2009, Gavin Hamilton e seus colaboradores descreveram as vantagens e desvantagens de cada uma dessas sequência no que se refere à quantificação de gordura hepática. Nesse trabalho, por exemplo, eles mostram, que conforme esperado, a sequência PRESS apresenta melhor relação sinal-ruído (SNR, do inglês *Signal to Noise Ratio*), ao passo que a STEAM permite tempos ao eco mais curtos, minimizando os efeitos de relaxação. (68)

A MRS permite uma estimativa direta da densidade de prótons e tem se mostrado ser o método mais sensível e objetivo para diagnóstico e quantificação de gordura hepática. No entanto é demorada e tecnicamente complexa, além de ser limitada espacialmente (assim como a biópsia). (14,19,69) A espectroscopia por RM exige, ainda, ferramentas de pós-processamento dedicadas à quantificação, sequências de pulsos específicas para MRS, que necessitam de uma maior atenção do operador que, em ambientes clínicos, nem sempre são especialistas. Por essa razão, MRS continua sendo uma ferramenta de pesquisa para estudos clínicos, mas ainda encontra grande resistência em ambientes clínicos convencionais. (19)

Por sua eficiência demonstrada em estudos clínicos, a MRS tem sido utilizada como padrão de referência de técnicas de RM para estudos preliminares de métodos quantitativos de MRI. (49) No entanto, uma validação mais rigorosa é necessária, como por exemplo, comparar dados de MRS e MRI com a concentração de TAG do tecido hepático, que é atualmente o método mais aceito para análise e quantificação de esteatose. (14)

Na quantificação de gordura utilizando imagens geradas por RM, Dixon descreveu, pela primeira vez em 1984, o uso de uma sequência *spin-echo* na aquisição de imagens em que o sinal da água e o da gordura estavam em fase (IP, do inglês *In Phase*) e fora de fase (OP, do inglês *Out of Phase*), respectivamente. (70) Desde que fora relatada, novas abordagens e adaptações foram propostas (71) de modo a minimizar as limitações que a técnica apresentava. Um exemplo é a sequência conhecida por "*Three-point Dixon*", (72) em que uma terceira imagem é adquirida com uma defasagem de 360° em relação à primeira, ou seja, em fase com esta. Outra abordagem foi descrita por Reeder e colaboradores, e é conhecida como IDEAL (*Iterative Decomposition of Water and Fat with Echo Asymmetry and Least-Squares Estimation*), que utiliza uma sequência do tipo *fast spin-echo* com ecos adquiridos assimetricamente para minimizar o efeito do ruído e de artefatos que

degradam as imagens e comprometem a adequada separação das frações de água e gordura. (73)

A MRI tem grande potencial para fornecer dados precisos na quantificação de gordura hepática, no entanto é preciso estar atento a alguns fatores que podem influir na técnica e ainda precisam ser aperfeiçoados, como, por exemplo, a complexidade do espectro da gordura, os efeitos do tempo de relaxação longitudinal (T1) e transversal T2*, entre outros. Se não levados em conta, podem comprometer a avaliação adequada do valor da fração de gordura mesmo em fígados normais. Por exemplo, em casos de deposição de ferro no fígado, algo comumente associado à esteatose hepática, quando não é feita a correção do tempo de relaxação efetivo, a fração de gordura é quase sempre subestimada. (14,74)

Muito já foi feito na RM no que se refere à quantificação de gordura hepática, mas ainda há uma gama de aplicações e estudos clínicos que precisam ser realizados, principalmente no sentido validar a RM como um método de diagnóstico e de quantificação de gordura hepática tão eficiente como a biópsia, reconhecida atualmente como o padrão ouro de quantificação pela comunidade médica.

Dessa forma, o presente trabalho foi desenvolvido utilizando RM e, na próxima sessão, serão apresentados os conceitos fundamentais da técnica, necessários para a compreensão da metodologia utilizada.

3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

Ressonância magnética é uma técnica baseada nas propriedades magnéticas do núcleo atômico que, quando submetido a um campo magnético externo, pode ser observado pela absorção e emissão de radiação eletromagnética. Em 1945, Purcell, Torrey e Pound (75), no MIT, e Bloch, Hansen e Packard (76), em Stanford, descreveram, independentemente, o fenômeno de RM. Em reconhecimento por suas contribuições, Purcell e Bloch dividiram, em 1952, o prêmio Nobel da Física.

3.1 NÚCLEO ATÔMICO

O núcleo atômico é formado por partículas denominadas núcleons (prótons e nêutrons) e têm sua estabilidade mantida pela chamada interação forte. Desse modo, o momento angular intrínseco (spin) ao núcleo dependerá dos momentos angulares intrínsecos aos prótons e nêutrons e dos momentos orbitais de cada um.

Tanto os prótons como os nêutrons apresentam números quânticos semi-inteiros de magnitude $1/2$, e dependem de sua orientação ao longo de uma direção, por exemplo, eixo *z*. Ambos pertencem a uma classe de partículas denominadas férmions, tendo seu spin associado ao seu momento angular intrínseco (momento de spin) de acordo com a equação (1):

$$I = \hbar S = \pm\frac{\hbar}{2} \tag{1}$$

em que I é o momento angular intrínseco (momento de spin), $\hbar$ é a constante reduzida de Planck e S é o número quântico de spin.

Além do momento de spin, a cada núcleon (próton ou nêutron) pode ser atribuído um número quântico relativo ao seu movimento orbital dentro do núcleo, o momento angular orbital l, e, de acordo com a teoria quântica, o momento angular orbital é um múltiplo inteiro de $\hbar$. Portanto, cada núcleon tem um momento angular total j dado pela equação abaixo:

$$j = l \pm I \tag{2}$$

Desse modo, pode-se definir o momento angular de spin total do núcleo como sendo o somatório do momento angular total (momento de spin + momento angular orbital) referente a cada um dos núcleons.

A interação entre os núcleons e as propriedades nucleares pode ser explicada através do Modelo de Camadas. Esse modelo assume que os núcleons possuem uma distribuição análoga a distribuição dos elétrons em camadas eletrônicas. Um ponto a favor desse modelo, é a capacidade de prever o momento angular total do núcleo. Cada subnível de energia pode conter duas partículas (*spin up* e *spin down*), e os subníveis apenas estão completos quando se tem números pares de nêutrons ou prótons no núcleo (núcleo "par-par"). Por outro lado, quando se tem núcleos com um número ímpar de nêutrons e prótons (núcleo "ímpar-ímpar"), tem-se subcamadas não completas de ambos os tipos de partículas.

Nos núcleos par-par, todos os prótons e nêutrons se pareiam de modo que os momentos angulares de spin e orbital se cancelam mutuamente. Assim, os núcleos par-par possuem momento angular nuclear igual a zero. Os núcleos ímpar-ímpar possuem, cada qual, um próton e um nêutron extra, com spins semi-inteiros que se acoplam em um momento angular inteiro. Já nos núcleos par-ímpar, o spin semi-inteiro de um único núcleon extra é combinado com o momento angular inteiro do resto do núcleo para formar um momento angular total semi-inteiro.

São estes núcleos, com spin semi-inteiro, que, de fato, apresentam maior relevância para que o fenômeno de ressonância magnética ocorra.

3.2 INTERAÇÃO ENTRE NÚCLEO ATÔMICO E CAMPO MAGNÉTICO

As condições básicas para que o fenômeno de ressonância magnética seja observável é a de que o núcleo atômico possua duas características, sendo elas o momento angular intrínseco (momento de spin) e o momento magnético permanente (μ) não nulos, e, ainda, interaja com um campo magnético estático.

De acordo com a mecânica quântica, o momento magnético de um núcleo pode assumir valores específicos, dados pela quantização do momento angular I:

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma \boldsymbol{I} = \gamma \hbar \boldsymbol{S} \tag{3}$$

na qual γ é a constante giromagnética, identidade magnética do núcleo, S o spin nuclear e $\hbar = {}^{h}/_{2\pi}$, onde h é a constante de Planck.

Com base no que foi explicado previamente e analisando a dependência do momento magnético com a quantização do momento angular, torna-se mais clara a razão da necessidade de que haja spin nuclear diferente de zero. Caso o spin seja nulo, o momento magnético também se anulará e, nesse caso, não será observado o fenômeno de RM. Exemplos de núcleos estudados em Ressonância Magnética podem ser vistos na tabela 1.

Tabela 1 - Núcleos utilizados em RM e suas características.

Núcleo	**Spin**	**Momento magnético (μ)**	**γ (MHz/T)**	**Abundância no corpo humano**
^{1}H	1/2	2,793	42,58	88 M
^{23}Na	3/2	2,216	11,27	80 mM
^{31}P	1/2	1,131	17,25	75 mM
^{17}O	5/2	-1,893	-5,77	16 mM
^{19}F	1/2	2,627	40,08	4 μM

Fonte: GIL (77)

No presente estudo, o foco é no núcleo de hidrogênio. Este é de grande interesse, pois tem spin nuclear igual a $1/2$, e núcleos com esse valor de spin possuem uma distribuição de carga com simetria esférica, se aproximando fortemente do que seria um dipolo magnético, apresentando propriedades características destes. Além disso, o hidrogênio é um átomo bastante abundante em humanos (tabela 1).

Sabemos que momentos magnéticos interagem com campos magnéticos. Um núcleo com spin S e momento magnético μ, na presença de um campo magnético externo B_0, terá uma energia dada pelo produto escalar do momento magnético com o campo magnético. Podemos escrever o Hamiltoniano dessa interação, também conhecida como interação Zeeman, como:

$$H = -\boldsymbol{\mu} \cdot \boldsymbol{B_0} \tag{4}$$

Imaginemos, agora, que o campo magnético externo aponte unicamente na direção de *z*, $\boldsymbol{B_0} = B_0\hat{\boldsymbol{z}}$. Nesse caso, o Hamiltoniano do sistema torna-se:

$$H = -\gamma\hbar B_0 I_z \tag{5}$$

em que I_z é a componente *z* do spin nuclear. Sabemos que as componentes dos momentos angulares só podem assumir um conjunto de valores discretos, devido à quantização do mesmo. A esse conjunto de valores chamaremos de *m*, e este pode assumir valores entre $-I, (-I+1), \ldots, (I-1), I$. Como consequência, os autovalores do Hamiltoniano são as energias permitidas para essa interação.

$$E_m = -\gamma\hbar B_O m \tag{6}$$

Para o átomo de hidrogênio, com spin $\mathrm{I} = \frac{1}{2}$, existirão dois valores de energia associados a esse próton:

$$E_{+\frac{1}{2}} = -\frac{\gamma\hbar B_O}{2} \tag{7a}$$

$$E_{-\frac{1}{2}} = +\frac{\gamma\hbar B_O}{2} \tag{7b}$$

ou seja, haverá dois níveis de energia possíveis para o núcleo de hidrogênio quando este for submetido a um campo magnético (figura 4).

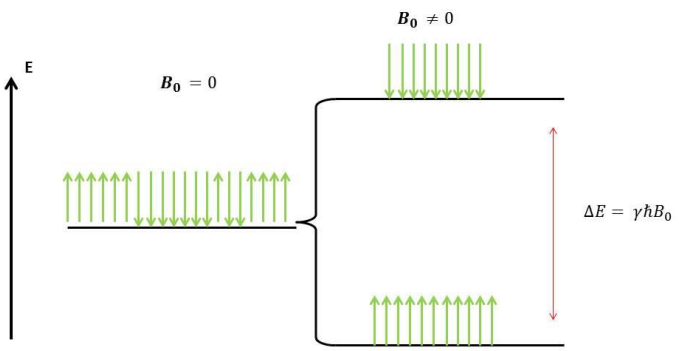

Figura 4 - Níveis de energia para núcleos com spin ½ quando submetidos a um campo magnético externo.

Fonte: Elaborada pela autora.

A diferença de energia entre dois níveis consecutivos de energia é dada por:

$$\Delta E = E_m - E_{m-1} = -\gamma\hbar B_0 m - \gamma\hbar B_0(m-1) = \gamma\hbar B_0 \tag{8}$$

De acordo com a equação (8), é possível notar que, quando se trata de diferença de energia, a dependência com relação ao número quântico de spin deixa de existir. Dividindo-se a equação (9) por $\hbar$, obtemos:

$$\frac{\Delta E}{\hbar} = \gamma B_0 \tag{9}$$

O lado esquerdo da equação (9) possui unidade de frequência angular. Essa frequência angular é importante para a RM e é chamada de frequência de Larmor (ω_L). Essa é a frequência natural de um sistema de núcleos na presença de um campo magnético.

$$\omega_L = \gamma B_0 \tag{10}$$

Analisando o núcleo de hidrogênio, que possui $I = {}^1/_2$, sob a ação de um campo magnético, como já mencionado, haverá o surgimento de dois níveis de energia (efeito Zeeman). A distância, em energia, entre dois níveis pode ser descrita, também, pela equação da quantização de energia de Planck-Einstein:

$$E = \hbar\omega \tag{11}$$

Se o sistema for irradiado por fótons com energia por partícula $\hbar\omega$, igual à separação entre os níveis de energia, o núcleo pode absorver/emitir um fóton possibilitando que haja transição dos mesmos entre os dois níveis de energia, caracterizando o fenômeno de RM (figura 5).

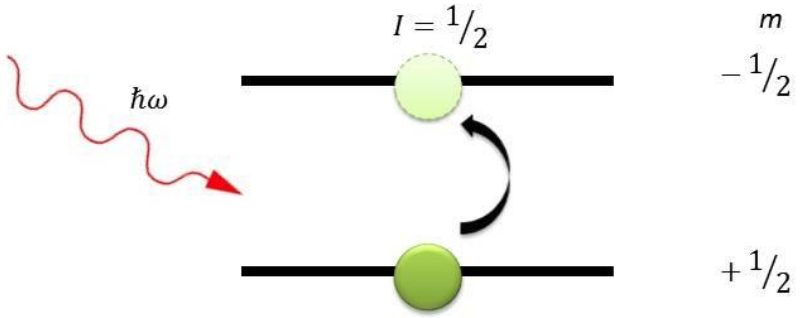

Figura 5 - Transição dos núcleos de spins ½ entre os níveis de energia quando irradiados por ondas eletromagnéticas de frequência $\hbar\omega$.

Fonte: Elaborada pela autora.

Não mais olhando para um único núcleo de hidrogênio, mas para um sistema de spins (sistema biológico, por exemplo), temos que para todos os spins nucleares $I = {}^{1}/_{2}$. Nesse caso, na presença de um campo magnético externo, ainda haverá dois níveis de energia acessíveis ao sistema. Os núcleos podem estar em um nível de menor energia, alinhados paralelamente ao campo, ou em um nível de menor energia, alinhados antiparalelamente ao campo externo (figura 6). No entanto, na natureza é comum níveis mais baixos de energia serem ocupados preferencialmente.

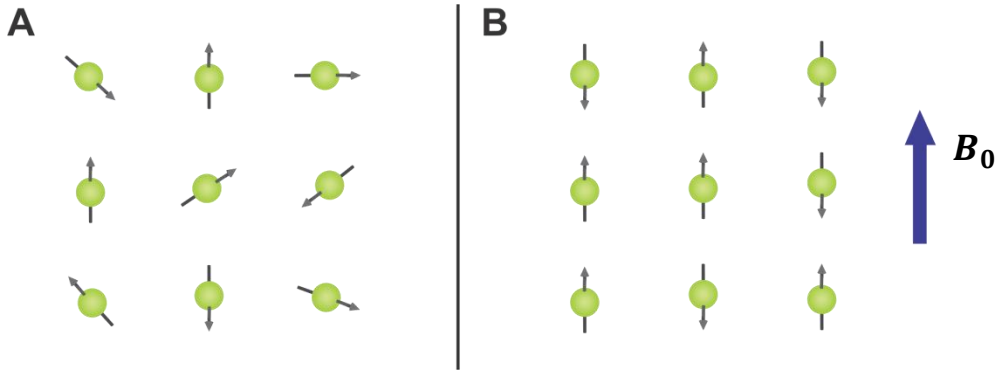

Figura 6 - Spins orientados (A) aleatoriamente na ausência de campo magnético e (B) alinhados paralelamente ou antiparalelamente na presença de um campo magnético B_0.

Fonte: Elaborada pela autora.

Essa diferença na ocupação entre os níveis de energia pode ser explicada pela estatística de Boltzmann. Considerando um sistema a uma temperatura T, podemos calcular o número de núcleos (n_j) encontrados em cada nível de energia (E_j) utilizando a descrição de Boltzmann:

$$n_j = \frac{N\, e^{-E_j/kT}}{Z(T)} \tag{12}$$

Na equação descrita acima, N é número total de núcleos existentes no sistema, k a constante de Boltzmann e $Z(T)$ é a função de partição, descrita por:

$$Z(T) = \sum_j e^{-E_j/kT} \tag{13}$$

Portanto, podemos calcular a razão entre o número de núcleos alinhados paralelamente (n_p) ao campo externo, no estado com energia $E_{+\frac{1}{2}}$, e os núcleos alinhados antiparalelamente (n_a) no estado com energia $E_{-\frac{1}{2}}$.

$$\frac{n_p}{n_a} = e^{-E_{+1/2}+E_{-1/2}/kT} = e^{\Delta E/kT} = e^{\gamma\hbar B_0/kT} \quad (14)$$

Considerando, novamente, o núcleo de hidrogênio, uma temperatura compatível com a fisiologia humana ($\cong 310K$) e um campo externo $B_0 = 3T$, obtemos que o valor para a diferença de população entre os dois níveis de energia é da ordem de 10^{-6}, com uma maior população de núcleos no estado de menor energia. Essa diferença é que é utilizada para gerar do sinal de RM.

3.3 ANALOGIA SEMICLÁSSICA

Embora o spin seja uma propriedade quântica, ele pode ser associado a um modelo semiclássico, já que o fenômeno de RM em si (equação 10) não apresenta quantização de maneira explícita. Isso é bastante didático na compreensão de como os momentos magnéticos de uma amostra interagem com um campo magnético externo.

Para o caso de um único próton, pode-se descrever o spin do núcleo como o movimento de uma esfera carregada que rotaciona ao redor do seu próprio eixo e, uma vez que essa esfera possui massa, também possui momento angular. Sendo a esfera carregada, cargas em movimento produzem correntes elétricas e, portanto, há uma corrente elétrica circular que, por sua vez, dá origem a um pequeno campo magnético (figura 7). Esse pequeno campo magnético é denominado momento magnético, μ_n.

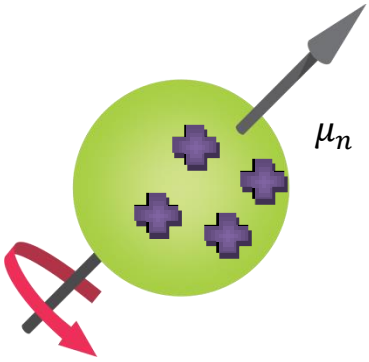

Figura 7 - Partícula carregada que gira ao redor de seu próprio eixo, criando um momento magnético μ_n.

Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com a mecânica clássica, um campo magnético agindo sobre uma distribuição de cargas em movimento gera um torque sobre essa distribuição. Esse torque tende a alinhar o momento magnético com o campo externo (figura 8). Nesse caso:

$$\boldsymbol{\tau} = \boldsymbol{\mu_n} \times \boldsymbol{B_0} \tag{15}$$

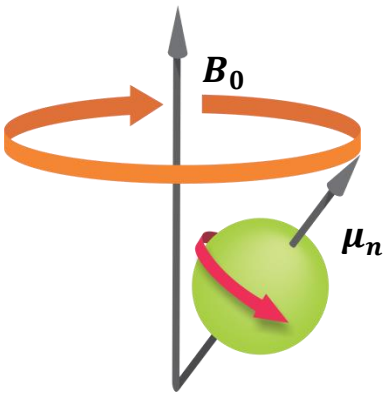

Figura 8 - Núcleo com spin e momento magnético (μ_n) na presença de um campo magnético B0, realizando movimento de precessão ao redor do eixo do campo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Mas o torque é dado pela variação temporal do momento angular J:

$$\boldsymbol{\tau} = \frac{d\boldsymbol{J}}{dt} \tag{16}$$

Combinando as equações (3), (15) e (16), temos que:

$$\frac{d\boldsymbol{\mu}}{dt} = \gamma\,(\boldsymbol{\mu_n} \times \boldsymbol{B_0}) \tag{17}$$

Esta é a equação que descreve o movimento de precessão do núcleo ao redor do campo magnético externo. Para o cálculo do produto vetorial, vamos supor que o momento magnético seja dado pela equação abaixo:

$$\boldsymbol{\mu_n}(t) = \mu_x\hat{\boldsymbol{x}} + \mu_y\hat{\boldsymbol{y}} + \mu_z\hat{\boldsymbol{z}} \tag{18}$$

de modo que o produto vetorial $(\boldsymbol{\mu_n} \times \boldsymbol{B_0})$ será:

$$(\boldsymbol{\mu_n} \times \boldsymbol{B_0}) = \begin{pmatrix} \hat{\boldsymbol{x}} & \hat{\boldsymbol{y}} & \hat{\boldsymbol{z}} \\ \mu_x & \mu_y & \mu_z \\ 0 & 0 & B_0 \end{pmatrix} = \mu_y\, B_0\hat{\boldsymbol{x}} + \mu_x B_0\hat{\boldsymbol{y}} \tag{19}$$

Calculando a variação temporal do momento magnético para cada uma das componentes, obtemos o conjunto de equações abaixo:

$$\frac{d\mu_x}{dt} = \gamma \mu_y B_0 \tag{20a}$$

$$\frac{d\mu_y}{dt} = -\gamma \mu_x B_0 \tag{20b}$$

$$\frac{d\mu_z}{dt} = 0 \tag{20c}$$

Para resolver esse sistema de equações, combinamos as equações (20a) e (20b) para obter uma equação diferencial de segunda ordem:

$$\frac{d^2}{dt^2}\begin{pmatrix}\mu_x\\ \mu_y\end{pmatrix} + (\gamma B_0)^2 \begin{pmatrix}\mu_x\\ \mu_y\end{pmatrix} = 0 \tag{21}$$

Vamos supor que para um tempo *t = 0*, o momento magnético seja dado pela equação abaixo:

$$\boldsymbol{\mu_n}(0) = \mu_{x0}\hat{\boldsymbol{x}} + \mu_{y0}\hat{\boldsymbol{y}} + \mu_{z0}\hat{\boldsymbol{z}} \tag{22}$$

Com isso, obtemos uma expressão para o momento magnético dependente do tempo:

$$\boldsymbol{\mu_n}(t) = \left(\mu_{x0} cos\omega_0 t + \mu_{y0} sen\omega_0 t\right)\hat{\boldsymbol{x}} + \left(\mu_{x0} cos\omega_0 t - \mu_{y0} sen\omega_0 t\right)\hat{\boldsymbol{y}} + \mu_{z0}\hat{\boldsymbol{z}} \tag{22}$$

A expressão acima mostra que o vetor momento magnético precessiona ao redor do eixo *z*, com frequência angular dada por $\omega_0 = \gamma B_0$, igual à frequência previamente discutida, denominada de frequência de Larmor.

3.4 MAGNETIZAÇÃO

É de suma importância entender os efeitos do campo magnético externo sobre os momentos magnéticos de uma amostra. Imaginemos uma amostra na qual os núcleos, sob a ação de um campo magnético externo, apresentam momento magnético diferente de zero. Define-se uma grandeza macroscópica, denominada magnetização ($\boldsymbol{M}$), que é dada pelo somatório vetorial dos momentos magnéticos de todos os núcleos existentes na amostra, dividido pelo volume da amostra.

$$\boldsymbol{M} = \frac{1}{V}\sum_i \boldsymbol{\mu_i} \tag{23}$$

A precessão dos spins ao redor do campo não ocorre com coerência de fase, embora com mesma frequência de precessão. Devido a isso, na direção perpendicular ao campo externo, a orientação dos spins se encontra distribuída de forma randômica, assim como quando eles não se encontravam na presença do campo magnético. Nesse caso, seus momentos magnéticos se anulam e, portanto, não há componente resultante da magnetização perpendicular a $\boldsymbol{B_0}$.

No entanto, na direção paralela ao campo magnético, o resultado é diferente. Nesse caso, temos uma componente não nula denominada magnetização inicial (M_0) originada a partir do pequeno excesso de núcleos alinhados paralelamente a $\boldsymbol{B_0}$ (estado mais favorável energeticamente) calculado de acordo com a distribuição de Boltzmann. Essa pequena diferença é que irá contribuir para o surgimento da magnetização macroscópica (figura 8).

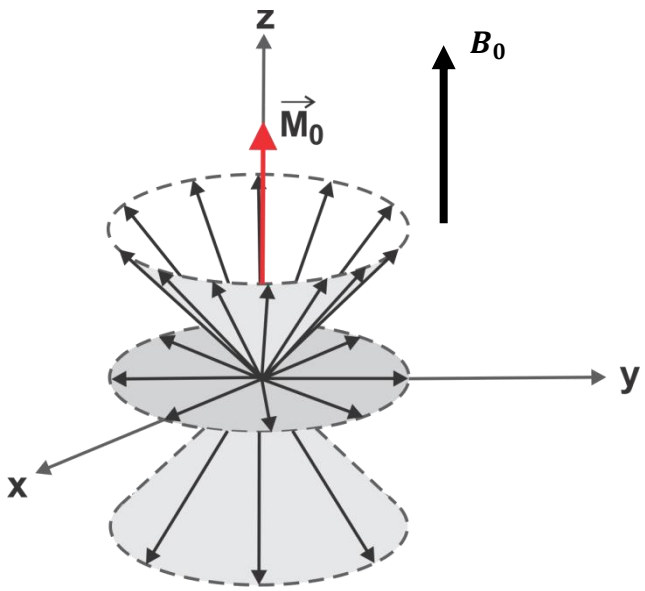

Figura 9 - Esquema mostrando a precessão dos spins ao redor do campo externo B_0 e a magnetização resultante M_0.

Fonte: Elaborada pela autora.

Podemos escrever uma equação que descreva o movimento da magnetização, de modo análogo à equação que descreve o movimento para um único núcleo (equação 17).

$$\frac{d\boldsymbol{M}}{dt} = \gamma(\boldsymbol{M} \times \boldsymbol{B_0}) \tag{24}$$

Como já visto anteriormente, quando o sistema for irradiado por ondas eletromagnéticas que oscilem na frequência de Larmor, a magnetização será retirada do equilíbrio e irá variar.

3.5 O SISTEMA GIRANTE DE COORDENADAS

A fim de melhor compreender o fenômeno de RM, introduz-se o conceito de referencial girante (RG) e referencial do laboratório (RL). Com o intuito de facilitar a matemática do problema, podemos imaginar um referencial que gire no plano (x, y). Este novo sistema de coordenadas, denominado RG, é descrito de modo que sua origem seja coincidente com a origem do sistema de coordenadas do RL. Chamaremos de $(\hat{x}', \hat{y}', \hat{z}')$ os vetores unitários no sistema de coordenadas girantes. Como a rotação se dá em torno do próprio eixo z, este coincide com z', enquanto os eixos x' e y' giram ao redor de z' com uma frequência angular Ω (figura 9).

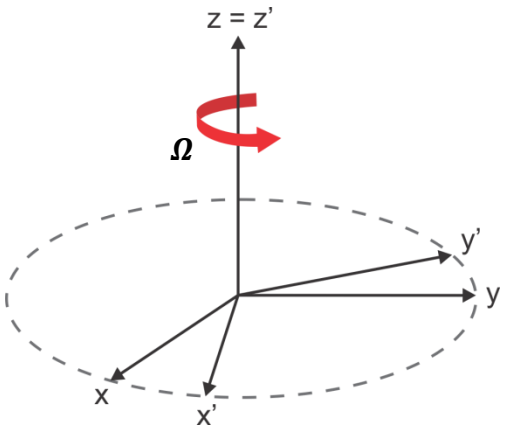

Figura 10 - Sistema de coordenadas girantes (x', y', z') com frequência $\boldsymbol{\Omega}$.
Fonte: Elaborada pela autora.

Consideremos um vetor V(t) descrito no RL:

$$\boldsymbol{V}(t) = V_X(t)\hat{\boldsymbol{x}} + V_y(t)\hat{\boldsymbol{y}} + V_z(t)\hat{\boldsymbol{z}} \tag{25}$$

Escrevendo-o no referencial girante:

$$\boldsymbol{V}'(t) = V_{x'}(t)\widehat{\boldsymbol{x}'}(t) + V_{y'}(t)\widehat{\boldsymbol{y}'}(t) + V_{z'}(t)\widehat{\boldsymbol{z}'}(t) \tag{26}$$

Como (29) e (30) são duas formas de representar o mesmo vetor, podemos igualar as derivadas com respeito ao tempo de ambas as equações.

$$\frac{d\boldsymbol{V}(t)}{dt} = \frac{dV_x}{dt}\hat{\boldsymbol{x}} + \frac{dV_y}{dt}\hat{\boldsymbol{y}} + \frac{dV_z}{dt}\hat{\boldsymbol{z}} \tag{27a}$$

$$\frac{d\boldsymbol{V'}(t)}{dt} = \frac{dV_{x'}}{dt}\widehat{\boldsymbol{x'}}(t) + \frac{dV_{y'}}{dt}\widehat{\boldsymbol{y'}}(t) + \frac{dV_{z'}}{dt}\widehat{\boldsymbol{z'}}(t) + V_{x'}\frac{d\widehat{\boldsymbol{x'}}(t)}{dt} + V_{y'}\frac{d\widehat{\boldsymbol{y'}}(t)}{dt} + V_{z'}\frac{d\widehat{\boldsymbol{z'}}(t)}{dt} \tag{27b}$$

$$\frac{d\boldsymbol{V}(t)}{dt} = \frac{d\boldsymbol{V'}(t)}{dt} \tag{28}$$

Mas sabemos que:

$$\frac{d\widehat{\boldsymbol{x'}}(t)}{dt} = \widehat{\boldsymbol{\Omega}} \times \widehat{\boldsymbol{x'}} \tag{29}$$

O que nos possibilita escrever a equação (28) da seguinte forma:

$$\frac{d\boldsymbol{V}(t)}{dt} = \left(\frac{d\boldsymbol{V}(t)}{dt}\right)' + (\boldsymbol{\Omega} \times \boldsymbol{V}) \tag{30}$$

Se substituirmos o vetor genérico $\boldsymbol{V}(t)$ pelo vetor momento magnético $\boldsymbol{\mu}$, obtemos a expressão:

$$\frac{d\boldsymbol{\mu}(t)}{dt} = \left(\frac{d\boldsymbol{\mu}(t)}{dt}\right)' + (\boldsymbol{\Omega} \times \boldsymbol{\mu}) \tag{31}$$

Sabendo que a variação temporal do momento magnético pode ser escrita como o produto vetorial do momento magnético pelo campo magnético multiplicado pela constante giromagnética (equação 19), escrevemos que:

$$\frac{d\boldsymbol{\mu}(t)}{dt} = \gamma(\boldsymbol{\mu} \times \boldsymbol{B}) + (\boldsymbol{\Omega} \times \boldsymbol{\mu}) = \gamma\boldsymbol{\mu} \times \left(\boldsymbol{B} + \frac{\boldsymbol{\Omega}}{\boldsymbol{\gamma}}\right) \tag{32}$$

que é a equação diferencial para o momento magnético representada no sistema de coordenadas girantes. Nota-se a presença de um campo magnético efetivo: $B_{eff} = B + {}^{\Omega}/_{\gamma}$ que, efetivamente, não se trata de um campo magnético real; a quantidade ${}^{\Omega}/_{\gamma}$ surge devido ao efeito da rotação do sistema de coordenadas.

3.6 PULSOS DE RADIOFREQUÊNCIA E SEUS EFEITOS

Vimos que o fenômeno de RM ocorre quando um sistema composto por núcleos que possuem momentos magnéticos não nulos sob a ação de um campo magnético externo e estático é irradiado por uma onda eletromagnética com frequência igual à frequência de precessão dos spins nucleares (frequência de Larmor). Para efeitos de RM, considera-se unicamente o campo magnético da onda eletromagnética. Esse campo adicional é gerado por uma bobina de radiofrequência (RF), e pode ser escrito como um campo magnético oscilante linearmente polarizado.

$$\boldsymbol{B_1}(t) = B_1 \cos(\omega t)\,\hat{\boldsymbol{x}} = \boldsymbol{B_1^+} + \boldsymbol{B_1^-} \tag{33}$$

Um campo magnético linearmente polarizado sempre pode ser escrito como dois campos circularmente polarizados com metade da amplitude e girando em sentidos contrários. Portanto, temos duas componentes circularmente polarizadas, uma componente girando no sentido horário $\boldsymbol{B_1^+}$, e outra componente do campo magnético girando no sentido anti-horário $\boldsymbol{B_1^-}$, como mostrado na figura 11.

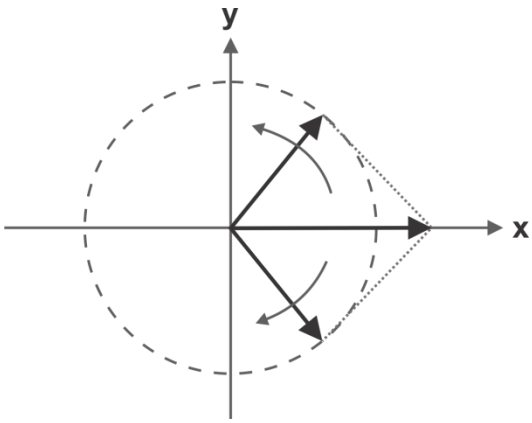

Figura 11 - Campo $\boldsymbol{B_1}$ decomposto em duas componentes circularmente polarizadas girando em sentidos contrários – uma no sentido horário $\boldsymbol{B_1^+}$ e outra no anti-horário $\boldsymbol{B_1^-}$.

Fonte: Elaborada pela autora.

Podemos expressar cada uma das componentes como sendo:

$$\boldsymbol{B_1^-}(t) = \frac{1}{2} B_1 [\cos(\omega t)\,\hat{\boldsymbol{x}} + \mathrm{sen}(\omega t)\,\hat{\boldsymbol{y}}] \tag{34a}$$

$$\boldsymbol{B_1^+}(t) = \frac{1}{2} B_1 [\cos(\omega t)\,\hat{\boldsymbol{x}} - \mathrm{sen}(\omega t)\,\hat{\boldsymbol{y}}] \tag{34b}$$

Recapitulando, há dois campos magnéticos atuando sobre o sistema: um estático na direção z com magnitude B_0 e outro oscilante, de magnitude B_1, que gira no plano (x, y). O primeiro serve para estabelecer uma frequência natural de precessão no sistema, ao passo que o segundo tem a função de levar o sistema à ressonância. Desse modo, o campo total que atua sobre os momentos magnéticos é dado por:

$$\boldsymbol{B_{total}}(t) = B_0\hat{\boldsymbol{z}} + B_1[\cos(\omega t)\,\hat{\boldsymbol{x}} + \mathrm{sen}(\omega t)\,\hat{\boldsymbol{y}}] \tag{35}$$

Para que se atinja a condição de ressonância, com o máximo de excitação dos spins existentes na amostra, é necessário que a frequência de oscilação do pulso de RF seja igual à frequência natural de precessão dos spins (ou próximo dela), $\omega \approx \omega_0$.

O objetivo é descrever o movimento da magnetização quando submetida ao campo magnético acima, no entanto, nota-se que o campo magnético total (equação 35) está girando. Então utilizamos o sistema de coordenadas girantes descrito acima com o intuito de facilitar a visualização e a matemática do problema.

Podemos escrever os vetores $\widehat{\boldsymbol{x}'}$ e $\widehat{\boldsymbol{y}'}$ do sistema de coordenadas girantes:

$$\widehat{\boldsymbol{x}'} = \cos(\omega t)\hat{\boldsymbol{x}} - sen(\omega t)\hat{\boldsymbol{y}} \tag{36a}$$

$$\widehat{\boldsymbol{y}'} = \cos(\omega t)\hat{\boldsymbol{x}} + sen(\omega t)\hat{\boldsymbol{y}} \tag{36b}$$

e reescrever o campo de radiofrequência no referencial girante:

$$\boldsymbol{B_1^-} = \frac{B_1}{2}\left[\cos(2\omega t)\,\widehat{\boldsymbol{x}'} + sen(2\omega t)\widehat{\boldsymbol{y}'}\right] \tag{37a}$$

$$\boldsymbol{B_1^+} = \frac{1}{2}B_1\widehat{\boldsymbol{x}'} \tag{37b}$$

A precessão dos spins ocorre no sentido horário, ou seja, no sentido negativo, em relação ao campo magnético externo quando olhamos o sistema através do RL. Concluímos, então, que a componente do campo de excitação que interage com a magnetização deve ser circularmente polarizada no sentido horário, B_1^+ (equação 37b). Dessa forma, podemos tratar o problema no referencial girante considerando os efeitos de B_1^+, utilizando a equação de movimento para a magnetização:

$$\frac{d\boldsymbol{M}}{dt} = \gamma\boldsymbol{M} \times \boldsymbol{B} \tag{38}$$

Calculando a derivada temporal da magnetização e dos versores no RG:

$$\frac{d\boldsymbol{M}}{dt} = \frac{d}{dt}\left(M_{x'}\widehat{\boldsymbol{x}'} + M_{y'}\widehat{\boldsymbol{y}'} + M_{z'}\widehat{\boldsymbol{z}'}\right) \tag{39}$$

$$\frac{d\boldsymbol{M}}{dt} = M_{x'}\frac{d\widehat{\boldsymbol{x}'}}{dt} + M_{y'}\frac{d\widehat{\boldsymbol{y}'}}{dt} + \frac{dM_{x'}}{dt}\widehat{\boldsymbol{x}'} + \frac{dM_{y'}}{dt}\widehat{\boldsymbol{y}'} + \frac{dM_{z'}}{dt}\widehat{\boldsymbol{z}'} \tag{40}$$

$$\frac{d}{dt}\begin{pmatrix}\widehat{\boldsymbol{x}'}\\ \widehat{\boldsymbol{y}'}\end{pmatrix} = \boldsymbol{\omega} \times \begin{pmatrix}\widehat{\boldsymbol{x}'}\\ \widehat{\boldsymbol{y}'}\end{pmatrix} \tag{41}$$

Assim, podemos reescrever a expressão (40), de modo a obtermos:

$$\left(\frac{d\boldsymbol{M}}{dt}\right)_{RL} = \left(\frac{d\boldsymbol{M}}{dt}\right)_{RG} + \boldsymbol{\omega} \times \boldsymbol{M} \tag{42}$$

e, portanto:

$$\left(\frac{d\boldsymbol{M}}{dt}\right)_{RG} = \left(\frac{d\boldsymbol{M}}{dt}\right)_{RL} - \boldsymbol{\omega} \times \boldsymbol{M} = \boldsymbol{\gamma M} \times \boldsymbol{B} - \boldsymbol{\omega} \times \boldsymbol{M} = \boldsymbol{\gamma M} \times \left(\boldsymbol{B} + \frac{\boldsymbol{\omega}}{\gamma}\right) \tag{43}$$

Esse resultado já havia sido apresentado previamente. Agora, considerando o efeito da aplicação do campo magnético B_1, sendo B_0 o campo magnético externo e $\omega = -\omega_0\hat{z}$ (sentido horário de rotação), o campo total sentido pela magnetização no RG será:

$$\boldsymbol{B}_{total} = \left(B_0 - \frac{\omega_0}{\gamma}\right)\hat{\boldsymbol{z}} + \frac{B_1}{2}\widehat{\boldsymbol{x}'} \tag{44}$$

No caso acima, a componente *z* do campo total será cancelada se o sistem estiver em ressonância e o único campo que exercerá influência sobre a magnetização será o campo magnético gerado pelas bobinas de radiofrequência.

A magnetização, sob efeito somente do campo externo estático $\boldsymbol{B_0}$, tende a precessionar ao redor deste. Então, por analogia, concluímos que a magnetização, no sistema de coordenadas girantes, tenderá a precessionar ao redor do campo de RF $\boldsymbol{B_1}$, com frequência de precessão dada por:

$$\omega_1 = \gamma B_1 \tag{45}$$

Dessa forma, a aplicação de um pulso de RF faz com que o vetor magnetização tenha uma variação angular de $\Delta\theta$ em relação ao eixo *z*, de acordo com a relação:

$$\Delta\theta = \omega_1\tau = \gamma B_1\tau \tag{46}$$

na qual B_1 é a amplitude do campo de RF (pulso) aplicado e τ é o intervalo de tempo no qual esse pulso atua sobre os núcleos ressonantes. O efeito sobre o vetor magnetização é o de afastá-lo, por um dado ângulo de desvio ($\Delta\theta$), do alinhamento com o campo estático. Um dos pulsos de RF mais utilizados é o que resultará em um ângulo de desvio de 90º, transferindo assim todo o vetor magnetização para o plano transversal. Pulsos de 180º também são bastante utilizados e são chamados de pulsos de inversão (figura 12). O ângulo $\Delta\theta$ é o que chamamos de ângulo de *flip*.

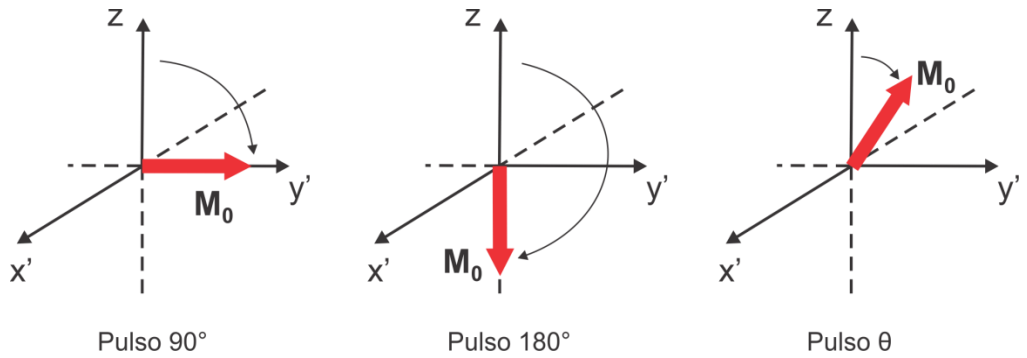

Figura 12 - Excitação dos núcleos atômicos através dos pulsos de radiofrequência. Da esquerda para a direita estão representados um pulso de 90°, um pulso de 180° (pulso de inversão) e um pulso *θ*, respectivamente.

Fonte: Elaborada pela autora.

Ao aplicarmos um pulso de 90°, por exemplo, o vetor magnetização é, conforme já mencionado, levado ao plano transversal. Uma vez cessada a atuação desse pulso, esse vetor volta a precessionar no plano (x, y) com uma frequência igual à frequência de Larmor. Com o passar do tempo, a magnetização tende a voltar a seu estado de equilíbrio devido aos mecanismos conhecidos como relaxação. Esse retorno é caracterizado por dois tempos característicos, denominados tempo de relaxação transversal (T_2) e tempo de relaxação longitudinal (T_1) e, durante esse período, tem origem um sinal característico, conhecido por *Free Induction Decay* (FID)

3.7 AS EQUAÇÕES DE BLOCH

Como dito acima, após a aplicação de um pulso de RF, a magnetização tende a retornar ao seu estado inicial, sendo este processo conhecido como relaxação,

que pode ser caracterizado por dois tempos de relaxação distintos: T_1 e T_2. Em 1946, Felix Bloch propôs um conjunto de equações que descrevessem o comportamento da magnetização (momentos magnéticos) na presença de um campo magnético externo após serem excitados.

As equações de Bloch se aplicam a casos em que as interações que provocam os mecanismos de relaxação são fracas. Nesses casos, considerando a derivada temporal da magnetização, podemos escrever:

$$\frac{dM_x}{dt} = \gamma M_y \left(B_0 - \frac{\omega}{\gamma}\right) - \frac{M_x}{T_2} \tag{47a}$$

$$\frac{dM_y}{dt} = \gamma M_z B_1 - \gamma M_x \left(B_0 - \frac{\omega}{\gamma}\right) - \frac{M_y}{T_2} \tag{47b}$$

$$\frac{dM_z}{dt} = -\gamma M_y B_1 - \left(\frac{M_z - M_0}{T_1}\right) \tag{47c}$$

Vamos considerar uma condição inicial estabelecida imediatamente após a aplicação de um pulso de 90°, ou seja, a magnetização M_0 totalmente no plano transversal em $t = 0$. As soluções das equações de Bloch para o referencial de laboratório, nesse caso, são:

$$M_x(t) = M_0 cos(\omega_0 t) e^{-t/T_2} \tag{48a}$$

$$M_y(t) = M_0 sen(\omega_0 t) e^{-t/T_2} \tag{48b}$$

$$M_z(t) = M_0 \left(1 - e^{-t/T_1}\right) \tag{48c}$$

Pela simetria do problema, podemos combinar as componentes x e y e definir uma magnetização transversal, M_t:

$$M_t(t) = M_x(t) + iM_y(t) = M_0\, e^{i\omega_0 t} e^{-t/T_2} \tag{49}$$

Como se pode ver, as magnetizações em qualquer instante de tempo podem ser descritas simplesmente se conhecendo a condição inicial do problema e os tempos de relaxação característicos da amostra estudada. Mais detalhes sobre esse tempos T_1 e T_2 serão descritos na próxima sessão.

3.8 TEMPOS DE RELAXAÇÃO: T_1 E T_2

O tempo de relaxação longitudinal reflete o tempo que a projeção do vetor magnetização paralela ao campo externo principal, M_z, leva para recuperar 63% do seu valor inicial após a aplicação de um pulso de excitação de 90°. Tal recuperação obedece a uma relação exponencial já conhecida:

$$M_z = M_0\left(1 - e^{-t/T_1}\right) \tag{50}$$

Para entendermos o processo de relaxação longitudinal, temos que argumentar em termos de energia. A energia associada ao momento magnético sob a presença de um campo magnético é o negativo do produto entre essas duas grandezas. Ou seja, os spins tendem a se alinhar ao campo magnético a fim de atingirem uma situação de energia mínima. Assim, os prótons liberam pacotes de energia para o reservatório térmico, possibilitando, assim, a passagem para esse estado de menor energia.

O tempo de relaxação transversal é definido como sendo o tempo no qual a componente transversal da magnetização atinge 37% do seu valor inicial, obedecendo a seguinte relação:

$$M_t = M_0 e^{-t/T_2} \tag{51}$$

A interação, nesse caso, ocorre devido ao fato dos spins estarem sujeitos a um campo local, que é a combinação entre o campo magnético externo e o campo produzido pelos seus respectivos vizinhos. Tais variações no campo local fazem com que diferentes spins precessem com frequências ligeiramente distintas dos outros, acarretando em uma defasagem entre os mesmos (perda de coerência de fase) e, consequente, diminuição da componente transversal da magnetização, que relaxa com tempo característico T_2.

O processo de relaxação transversal é, também, afetado por inomogeneidades do campo magnético externo. A não homogeneidade de campo, juntamente como variações na susceptibilidade magnética, influenciam no processo de relaxação transversal. Esse efeito pode ser caracterizado por outro valor correspondente a esse processo, denominado $T_2{}'$. Desse modo, podemos escrever a taxa de relaxação transversal efetiva (T_2^*) do sistema como:

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{1}{T_2'} \tag{52}$$

A figura a seguir ilustra os mecanismos de relaxação, descritos acima.

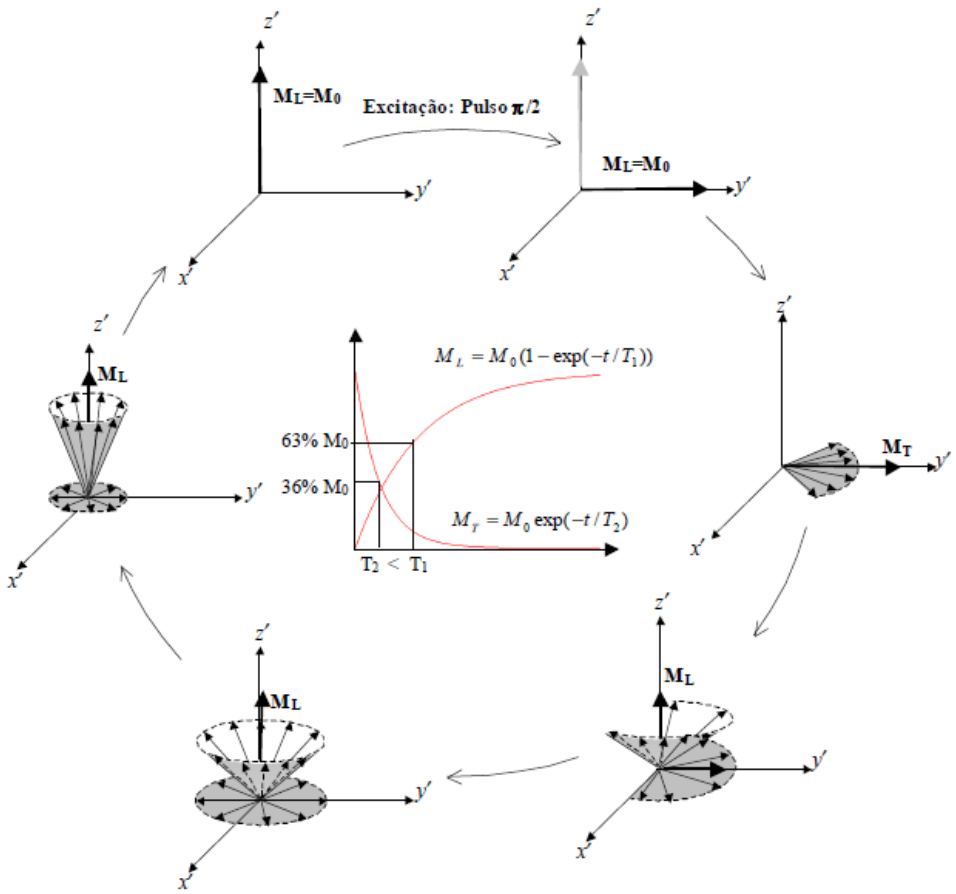

Figura 13 - Mecanismos de relaxação após a aplicação de um pulso de 90º.
Fonte: PANEPUCCI (78)

3.9 ECO DE SPINS

O processo de relaxação transversal está relacionado à perda da coerência de fase dos momentos magnéticos que compõem o vetor magnetização no plano transversal. Após a aplicação do pulso (90°, por exemplo), o vetor magnetização é defletido para o plano (x, y), tendo um valor igual a M_0. Em seguida, interações com a vizinhança provocam pequenas alterações no campo magnético local. Esta interação faz com que os spins adquiram frequências de precessão ligeiramente diferentes, havendo perda de coerência de fase entre os mesmos.

No entanto, essa perda da coerência de fase pode ser recuperada, uma vez que a energia não foi perdida para a vizinhança. Isto pode ser conseguido através da aplicação de um pulso de 180° (figura 14). A recuperação da coerência de fase induz outro tipo de sinal na bobina receptora, denominado eco de spins.

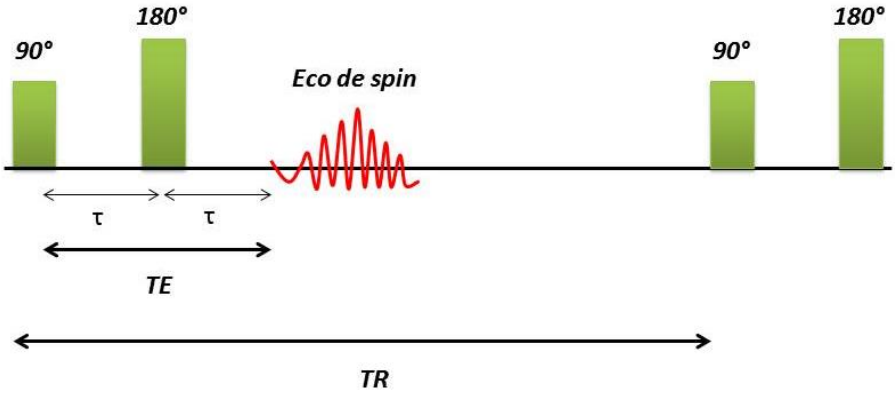

Figura 14 - O esquema mostra a evolução temporal de um experimento para obtenção de um eco de spins. Primeiro, há a aplicação do pulso de 90° seguido da aplicação do pulso de 180° que faz com que surja um eco de spins, em $t = TE$.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na figura 15, o processo está esquematizado: logo após a aplicação do pulso de 90°, os spins sentirão os efeitos da relaxação transversal e começarão a precessionar com frequências ligeiramente distintas, havendo perda de coerência de fase entre eles. Ao ser aplicado o pulso de inversão (180°), os spins começam a recuperar a coerência de fase, atingindo máxima coerência e, portanto, máxima magnetização transversal. Finalmente, perde-se novamente a coerência de fase, até o desaparecimento total da magnetização transversal.

O intervalo de tempo entre a aplicação do pulso de 90° e a obtenção do eco, é denominado Tempo ao Eco (TE). Este parâmetro é de grande importância na obtenção do contraste desejado na imagem. Outro parâmetro importante na obtenção do contraste é o Tempo de Repetição (TR). Ele é definido como o intervalo de tempo entre dois pulsos de 90° equivalentes de uma mesma sequência (figura 14).

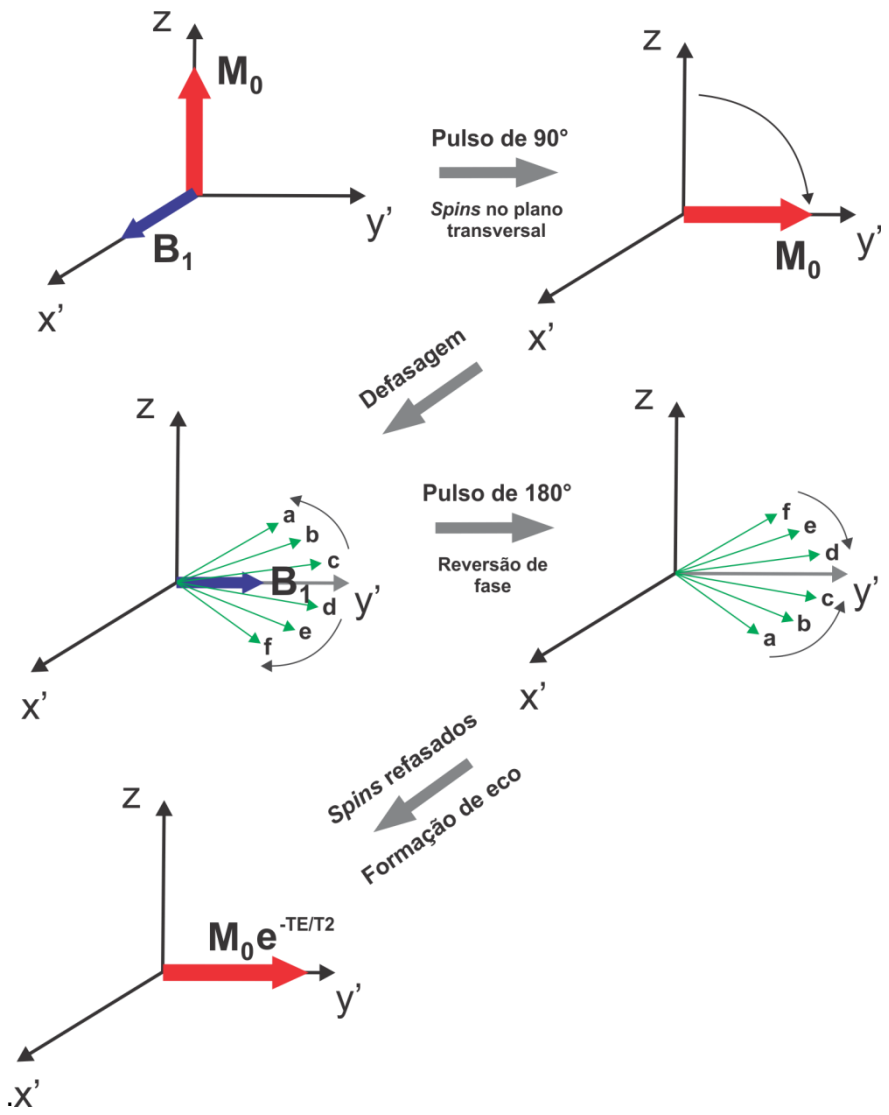

Figura 15 - O esquema representa a obtenção de um eco de spins. Após um pulso de 90°, a magnetização é levada para o plano transversal, seguido de uma defasagem devido às interações spin-spin. O pulso de 180° é aplicado em *y'* para reverter a fase, corrigindo a defasagem natural, formando um eco de spins.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.10 PRINCÍPIOS BÁSICOS DE IMAGENS POR RM

Para que seja possível a obtenção de imagens por RM, devemos conhecer a distribuição espacial dos spins nucleares existentes na amostra. Ou seja, é necessário codificar espacialmente os sinais emitidos pela amostra de uma forma conhecida. De modo geral, os gradientes de campo magnético são campos magnéticos dependentes do tempo com uma não uniformidade espacial controlada, usados em RM para localizar espacialmente o sinal gerado pelo objeto. Quando são

ligadas, as bobinas de gradiente geram um campo não uniforme (geralmente um campo que varia linearmente, conforme ilustrado na figura 16), e esse campo se soma campo magnético principal, gerando uma dependência espacial no campo sentido pelos spins presentes na amostra. Esse campo de gradiente é gerado, normalmente, por três bobinas de gradientes que são ortogonais entre si. Combinando o efeito gerado por essas bobinas, consegue-se codificar espacialmente a informação necessário para um mapeamento bi- ou mesmo tridimensional do objeto de interesse.

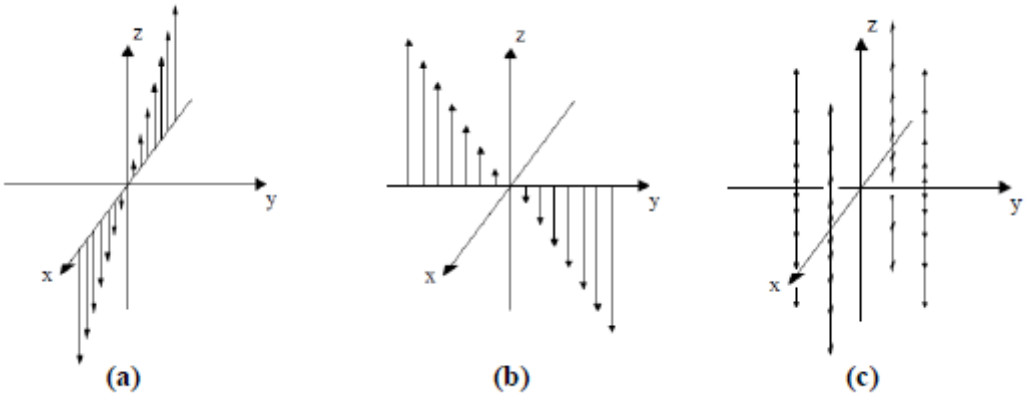

Figura 16 - Campo magnético produzido pelas bobinas de gradiente (a) na direção x, (b) na direção y e (c) na direção z.

Fonte: PANEPUCCI (78)

3.10.1 IMAGENS UNIDIMENSIONAIS

Até o momento vimos como os spins nucleares de uma amostra interagem com o campo magnético estático e com os pulsos de RF, dando origem aos sinais FID ou Eco. Conforme mencionada, para obter uma imagem por RM, é preciso codificar espacialmente os sinais emitidos pela amostra. Consideremos o caso em que temos um gradiente de campo em uma dimensão:

$$\boldsymbol{G}_x = \frac{\partial \boldsymbol{B}_z(\boldsymbol{r})}{\partial x} \tag{53}$$

Esse campo é somado ao campo estático $\boldsymbol{B_0}$, e, então, obtemos um campo resultante dependente da posição:

$$\boldsymbol{B}(x) = \boldsymbol{B_0} + \boldsymbol{G_x} x \tag{54}$$

e, portanto, a frequência de precessão dos spins também obedecerá a uma relação dependente da posição:

$$\boldsymbol{\omega}(x) = \gamma(\boldsymbol{B_0} + \boldsymbol{G_x} x) \tag{55}$$

Essa dependência da frequência de precessão com a posição é utilizada para mapear a densidade de prótons da amostra. Consideremos o caso de um objeto contínuo e de tamanho finito em que a densidade de magnetização após a excitação por um pulso de RF é:

$$dm(x,t) = M_0(x)\, e^{i\omega(x)t}\, e^{-t/T_2}\, dx \tag{54}$$

para a qual dx é o elemento de volume localizado em x. Se integrarmos a densidade de magnetização ao longo do objeto, obtemos o sinal da amostra:

$$S(t) = e^{i\omega_0 t} \int_{-\infty}^{+\infty} M_0(x) e^{i\gamma G x t} e^{-t/T_2} dx \tag{55}$$

Os limites de integração foram impostos como sendo $-\infty \leq x \leq +\infty$, pois a magnetização é zero fora dos limites do objeto. Desse modo, o termo $e^{i\omega_0 t}$ pode ser removido da integral. Essa equação nos diz que o sinal da amostra possui um termo oscilante na frequência de Larmor, sendo modulado por uma integral que contém toda a informação sobre a localização dos spins.

Definimos uma nova variável $\boldsymbol{k}(t) = \gamma\, \boldsymbol{G}\, t$, e a introduzimos na equação:

$$S(k(t)) = e^{-\frac{k(t)}{\gamma G_x T_2}} \int_{-\infty}^{+\infty} M_0(x)\, e^{ik(t)x}\, dx \tag{56}$$

Olhando para o termo dentro da integral, nota-se que a magnetização se relaciona com essa função através da transformada de Fourier. No entanto, o sinal $S\big(k(t)\big)$ é o produto de duas funções; logo, ao tomarmos a transformada de Fourier desse sinal, obteremos o produto ponto a ponto das transformadas de Fourier de cada função (produto de convolução).

$$\mathcal{F}\left\{\int_{-\infty}^{+\infty} M_0(x)\, e^{ik(t)x}\, dx\right\} = M_0(x) \tag{57}$$

$$\mathcal{F}\left\{e^{-\frac{k(t)}{\gamma G_x T_2}}\right\} = \frac{1}{1+(\gamma G T_2)^2 x^2} \tag{58}$$

A equação 58 é uma função do tipo Lorentziana, chamada de *Point Spread Function* (PSF), com largura a meia altura definida como:

$$\Delta x = \frac{1}{\gamma G T_2} \tag{59}$$

A equação acima fornece o tamanho mínimo possível dos pixels para que haja resolução na imagem. Portanto, podemos escrever também uma relação entre a distância entre os pixels na imagem e a máxima frequência espacial contida no sinal.

$$\delta x = \frac{1}{\gamma G t_{max}} \tag{60}$$

de modo que podemos estabelecer uma condição de boa resolução para as imagens adquiridas: a separação entre os pixels tem que ser maior do que a mínima separação possível.

$$\delta x = \frac{1}{\gamma G t_{max}} > \Delta x = \frac{1}{\gamma G T_2} \tag{61}$$

Ou seja, devemos ter que $t_{max} < T_2$. Para o caso em que $t_{max} \ll T_2$, a PSF aproxima-se de uma função delta e o sinal da densidade de magnetização pode ser reescrito como:

$$S(k(t)) = \int_{-\infty}^{+\infty} M_0(x)\, e^{ik(t)x}\, dx \tag{62}$$

Assim, para imagens unidimensionais, $M_0(x)$ é a transformada de Fourier do sinal de RM adquirido.

3.10.2 IMAGENS BIDIMENSIONAIS

A codificação de imagens em duas dimensões deve ser realizada de modo que a frequência varie com um campo dependente de duas posições $B(x, y)$. No entanto, a aplicação de gradientes em diferentes direções ao mesmo tempo resulta em uma combinação equivalente a um gradiente unidimensional, impossibilitando a codificação bidimensional da imagem. A solução é fazer com que hajam gradientes de campo em diferentes direções em tempos diferentes. Dessa forma, o campo magnético passa a ser uma função do tempo e do espaço:

$$G_x(t) = \frac{\partial B_0^z}{\partial x}\bigg|_t \tag{63a}$$

$$G_y(t) = \frac{\partial B_0^z}{\partial y}\bigg|_t \tag{63b}$$

$$G_z(t) = \frac{\partial B_0^z}{\partial z}\bigg|_t \tag{63c}$$

possibilitando escrever uma expressão para o campo magnético:

$$\boldsymbol{B}(\boldsymbol{r},t) = \boldsymbol{B_0} + \boldsymbol{r}\ \cdot \boldsymbol{G}(t) \tag{64}$$

e, consequentemente, resultando em uma expressão para frequência de precessão dos spins dependente da posição e do tempo:

$$\boldsymbol{\omega}(\boldsymbol{r},t) = \boldsymbol{\omega_0} + \gamma \boldsymbol{r} \cdot \boldsymbol{G}(t) \tag{65}$$

Assim, podemos determinar a fase acumulada por um voxel de magnetização num dado instante de tempo após a excitação:

$$\phi(\boldsymbol{r},t) = \int_0^t \omega(\boldsymbol{r},t')dt' = \omega_0 t + \boldsymbol{r}\,\gamma\ \int_0^t \boldsymbol{G}(t')\,dt' \tag{66}$$

Analogamente ao feito anteriormente, podemos definir $\boldsymbol{k}(t)$ como:

$$\boldsymbol{k}(t) = \gamma \int_0^t \boldsymbol{G}(t')\,dt' \tag{67}$$

De modo simplificado, escrevemos a fase acumulada no RG:

$$\phi(\boldsymbol{r},t) = \boldsymbol{r} \cdot \boldsymbol{k}(t) \tag{68}$$

Analogamente ao caso unidimensional, fazendo-se uso da condição $t_{max} \ll T_2$, escrevemos o sinal da imagem:

$$S\big(\boldsymbol{k}(t)\big) = \int_V\ M_0(\boldsymbol{r})\, e^{i\,\boldsymbol{r}\cdot\boldsymbol{k}(t)} dv \tag{69}$$

Portanto, para obter a imagem, é necessário conhecer o sinal $S\big(\boldsymbol{k}(t)\big)$ no domínio do espaço de fase (espaço-*k*), em que toda informação está codificada em frequência em uma direção, e em fase na outra. Finalmente, a magnetização bidimensional é obtida fazendo-se a Transformada de Fourier bidimensional nas direções de codificação de fase e frequência.

3.10.2.1 Excitação seletiva e codificação espacial: o passo a passo para obtenção de uma imagem.

Até o presente momento, todo o formalismo de formação de imagens foi desenvolvido considerando um determinado sinal vindo da amostra de interesse. Esse sinal pode vir de toda a amostra, mas, normalmente, é interessante selecionar apenas parte do objeto que se pretende mapear. Isso permite, por exemplo, que múltiplas imagens bidimensionais sejam obtidas permitindo, assim, o mapeamento tridimensional de um volume de interesse.

Uma das formas de se fazer isso é combinando um pulso de RF, denominado pulso de RF seletivo, com um gradiente de seleção. Esse pulso seletivo é um pulso de RF modulado por uma função cujo espectro de frequências apresenta uma densidade de energia dentro de certa banda bem definida. Já o gradiente de seleção, quando aplicado perpendicular ao plano que se deseja selecionar, gera uma variação linear na frequência de precessão dos spins ao longo do mesmo. Uma vez que o pulso seletivo e o gradiente de seleção são aplicados simultaneamente, somente os spins cujas frequências de ressonância correspondem ao espectro contido no pulso de RF serão excitados. A figura 17 mostra a direção do gradiente de seleção e a fatia que o pulso de RF excita.

Figura 17 - A fatia é excitada por um pulso de RF seletivo aplicado em conjunto com um gradiente de seleção.

Fonte: Elaborada pela autora.

Por definição, a largura a meia altura do perfil de excitação determina a largura Δz do plano selecionado:

$$\Delta z = \frac{\Delta\omega}{\gamma G_s} \tag{70}$$

em que G_s é a intensidade do gradiente de seleção e $\Delta\omega$ é a largura de banda do pulso de RF. Isso define a fatia ou corte na qual será realizada a imagem de interesse.

Conforme já discutido, o gradiente de fase causa uma defasagem na magnetização. Dessa forma, a aplicação do mesmo após a seleção de um corte para realização da imagem, divide a fatia excitada em regiões menores com a característica de que cada sub-região desta, na direção em que o gradiente foi aplicado, possui magnetização com a mesma fase. A figura 18 mostra a fatia selecionada na figura 17 sendo subdividida em regiões com fases bem determinadas.

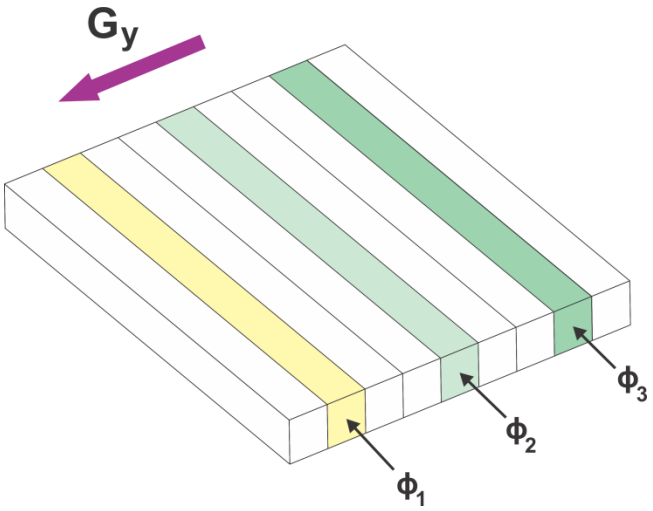

Figura 18 - Na fatia selecionada é aplicado um gradiente de fase, sendo esta subdividida em regiões com fases bem determinadas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Por fim, aplica-se o gradiente de leitura que localiza um dado conjunto de spins devido a sua frequência angular de precessão. É a partir desses elementos que a imagem é gerada. A Figura 19 mostra o gradiente de leitura completando a codificação espacial do objeto e a consequente obtenção das informações necessárias para gerar a imagem de interesse.

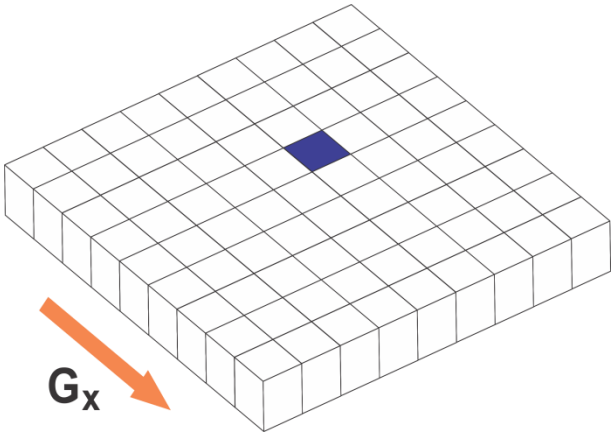

Figura 19 - A figura representa a aplicação do gradiente de leitura. O volume de elemento indicado está agora codificado, e desta forma, gera um sinal característico, pois apresenta frequência de precessão e fase bem determinadas.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.10.3 CARACTERÍSTICAS DA MRI

Um dos parâmetros importantes para que as imagens por RM sejam úteis para avaliação de um objeto de interesse não uniforme é a possibilidade de diferenciar suas diferentes regiões. Para isso, um parâmetro importante é o contraste das imagens. As imagens por RM podem possuir contrastes bem diferentes, o que torna esta técnica muito versátil. As diferenças entre os tempos de relaxação T_1 e T_2 dos tecidos sadios ou patológicos (ou ainda através de um agente de contraste), permitem obter diferentes intensidades de sinal nas imagens adquiridas.

O contraste por T_1 pode ser obtido pois a magnetização longitudinal de tecidos com diferentes valores de T_1 se recupera com taxas diferentes. Com isso, se usarmos o TR menor que o tempo necessário para a recuperação total, a magnetização de diferentes tecidos será diferente no momento da próxima excitação. Assim, assumindo que não haja diferenciação por T_2, a intensidade do sinal detectado será proporcional a relaxação longitudinal ocorrida. Nesse caso, um tecido com alto T_1 demora um tempo maior para a recuperação da sua magnetização, o que implica em um sinal menor no momento da excitação e, portanto, uma menor intensidade de sinal, aparecendo mais escuro na imagem, como ilustrado na figura 20.

No caso de tecidos com diferentes valores de T_2, é a magnetização transversal que decai com taxas diferentes. Tecidos com alto valor de T_2 têm a sua magnetização transversal decaindo mais lentamente. Com isso, no instante da obtenção do eco (TE), sua magnetização transversal ainda é alta (assumindo TE curto quando comparado com T_2), gerando sinais com altas intensidades e, consequentemente, aparecendo com mais brilho na imagem (figura 20). Esse tipo de imagens, considerando que não haja diferenciação significativa por T_1, é denominada imagem ponderada por T_2.

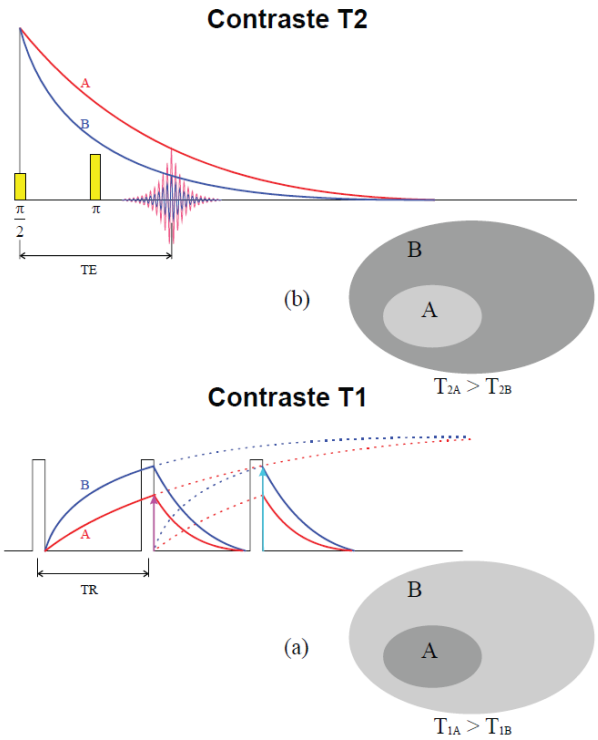

Figura 20 - O esquema mostra a forma de aquisição de imagens ponderadas por T_1 e T_2.
Fonte: PANEPUCCI (78)

O mecanismo de contraste permite distinguir, por exemplo, tecidos sadios de tecidos patológicos, que, de forma geral, possuem diferentes tempos de relaxação. Contudo, há várias condições patológicas que não alteram de forma significativa os tempos de relaxação. Nestes casos, é conveniente o uso de agentes de contraste que localmente alteram os tempos de relaxação, podendo ser utilizados para visualizar tecidos patológicos, bem como fenômenos como ativação celular.

Em MRI, a relação SNR é outro parâmetro importante na qualidade das imagens adquiridas. Mesmo em imagens onde os tecidos possuem diferentes intensidades de sinal, se a SNR não for alta o suficiente, torna-se muito difícil diferenciar um tecido do outro ou do ruído de fundo. A SNR pode ser determinada pela razão entre o sinal médio do tecido e o desvio padrão do ruído de fundo da imagem obtida, sendo diretamente proporcional à raiz quadrada do número de vezes que os dados são obtidos. Desta forma, pode-se aumentar a SNR, aumentando o número de repetições (ou de médias) do experimento.

Outro fator que altera a SNR é o tamanho do voxel. Quanto maior o voxel, maior a quantidade de prótons que emitirão sinal, e, portanto maior a sua intensidade. É importante ressaltar que o voxel é um elemento de volume dependente da espessura da fatia, além das dimensões do pixel. Por sua vez, a área do pixel depende do campo de visão (FOV, do inglês *field of view*) da imagem, que representa o comprimento físico ao longo das direções de aquisição da imagem e, também, da matriz (número de pontos em cada uma das dimensões) utilizada.

Ao mesmo tempo em que o aumento da área do pixel aumenta a SNR, ela diminui a resolução espacial da mesma, dificultando a distinção entre estruturas adjacentes. O aumento do número de repetições pode fazer com que se consiga uma boa SNR, mesmo com altas resoluções espaciais, porém haverá um aumento no tempo de aquisição, o que não é desejável para aplicações clínicas em humanos. Dessa forma, a otimização da qualidade das imagens obtidas depende de um compromisso entre os pontos mencionados durante a otimização do protocolo de aquisição.

3.10.4 SEQUÊNCIA GRADIENTE ECO

Conforme discutido, o processo de obtenção de imagens por RM requer a execução de determinados eventos, tais como aplicação de pulsos de RF e gradientes de campo, com durações bem definidas e em instantes também bem determinados. A esse conjunto de eventos, atribuímos o nome sequência de pulsos ou, simplesmente, sequência.

Diversas são as sequências utilizadas em MRI, cada qual com sua característica particular. Uma sequência bastante utilizada e de particular importância para o presente trabalho é conhecida por Gradiente Eco (GRE). (79-80)

A GRE básica possui a estrutura esquematizada na figura 21. Primeiramente um pulso de RF seletivo com ângulo de *flip* α é aplicado em conjunto com um gradiente de seleção (GSC). A defasagem dos spins é causada pela aplicação negativa do gradiente de leitura (GL), de modo que o mesmo gradiente aplicado para cima (positivo) resulta na refocalização dos spins, ou no “eco de gradiente”. A codificação espacial é obtida com base no terceiro gradiente: codificação de fase. (79-80)

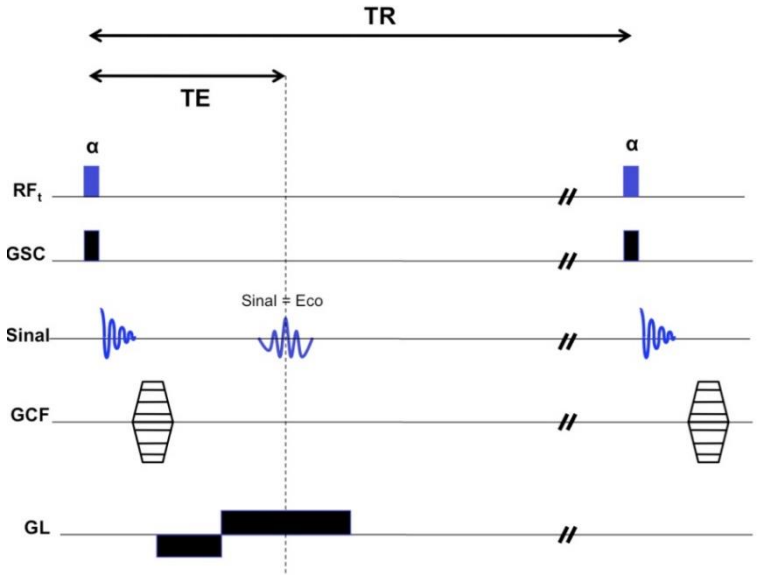

Figura 21 - Sequência de pulsos GRE.
Fonte: MAZOLLA (81)

Por conta de sua estrutura, em que apenas um único pulso de RF é aplicado, a aquisição do eco pode ser feita mais rapidamente. Como resultado disso, o tempo ao eco é geralmente mais curto para esse tipo de sequência do que para outras sequências, também utilizadas em aquisições de imagens, como a “spin eco”, por exemplo. Além disso, quando se utiliza baixos valores de ângulo de *flip*, existe a possibilidade de utilizar tempos de repetição mais curtos. A combinação de valores curtos para TR e para TE permite aquisições de imagens em tempos muito mais reduzidos, além da obtenção de imagens ponderas por $T_{1.}$ (79-81)

3.11 PRINCÍPIOS BÁSICOS DE ESPECTROSCOPIA POR RM

Como já dito anteriormente, depois de desligado o pulso de radiofrequência, a magnetização evolui na presença do campo magnético principal e sua componente transversal decai de forma exponencial. Esse sinal é denominado FID e o espectro de RM pode ser obtido através da Transformada de Fourier deste sinal.

Considerando uma amostra com várias e distintas frequências de ressonância, o sinal de RM medido será o resultado da interferência de vários decaimentos (FIDs) individuais. Entretanto, núcleos de uma mesma espécie, segundo o desenvolvimento feito até o presente momento, deveria dar lugar a componentes ressoando exatamente à mesma frequência, e, por consequência, a análise do sinal resultaria em apenas uma linha centrada nessa frequência de ressonância. Na prática, entretanto, não é isso que se observa, conforme pode ser visto no espectro de hidrogênio mostrado na figura 22.

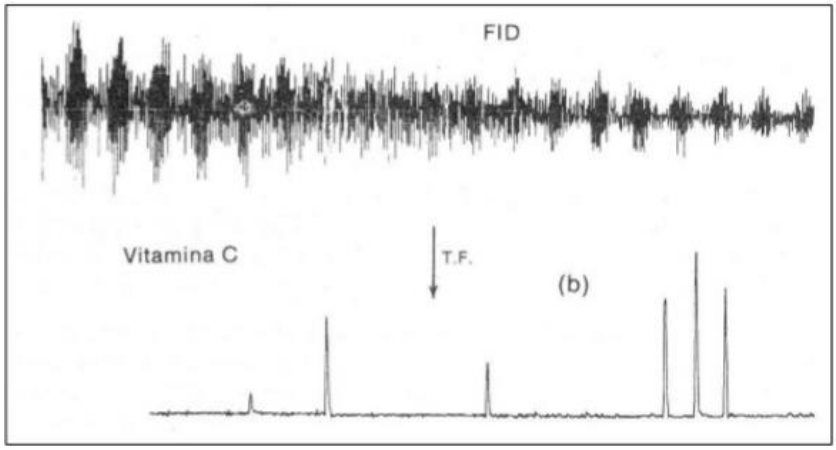

Figura 22 - Espectro da Vitamina C, que possui várias frequências ressonantes e, portanto, o FID obtido é a combinação dos FIDs individuais.

Fonte: GIL (77)

O fato de núcleos de uma mesma espécie darem origem a diferentes linhas no espectro de RM foi observado pela primeira vez no ano de 1950, pelos físicos Proctor e Yu da Universidade de Harvard. (82) Em 1951, Packard e seus colaboradores observaram a presença de três bandas no espectro RMN do 1H do etanol (83-84). A esse fenômeno foi dado o nome de desvio químico (*chemical shift*, em inglês).

O aparecimento de sinais em diferentes frequências, embora se tratando de um mesmo núcleo (mesma constante giromagnética), é uma indicação de que o campo magnético experimentado por cada um dos núcleos depende da sua vizinhança e sua interação com a mesma. A principal razão para a ocorrência de desvios químicos em RM reside nos elétrons. Estes circulam ao redor do núcleo e induzem um campo magnético local que se opõe ao campo magnético externo. Portanto, a nuvem eletrônica exerce uma blindagem magnética no núcleo, fazendo com que o campo magnético sentido pelo núcleo seja inferior ao campo externo aplicado.

Assim, o campo magnético local (B_{local}) sentido por um determinado núcleo pode ser diferente do campo externo (B_0) e sua intensidade depende da estrutura eletrônica dos átomos e moléculas vizinhas ao mesmo. Devido a isso, núcleos que estejam em ambientes químicos diferentes possuem constantes de blindagem σ diferentes. Assim, podemos definir um campo local efetivo:

$$B_{local} = (1 - \sigma)B_0 \tag{71}$$

e, consequentemente, a frequência de Larmor será escrita na forma:

$$\omega = \gamma B_{loc} = \gamma(1 - \sigma) \tag{72}$$

Passando, agora, a depender de variações na vizinhança do núcleo. Com isso, o desvio químico possibilita a identificação do grupamento que absorveu a radiação, indicando, com isso, os grupos que estão presentes na molécula.

Para a aquisição de um espectro de qualidade é necessário, inicialmente, escolher cuidadosamente a sequência de pulsos e o respectivo protocolo de aquisições, considerando, para tal, a faixa em que se encontram os valores dos tempos de relaxação dos tecidos que se deseja analisar. Para aplicações *in vivo*, é muito comum empregar localização espacial, o que ajuda a garantir a obtenção de dados sem artefatos e passível de quantificação. Além disso, diferentes regiões do organismo possuem diferentes composições e concentrações bioquímicas, e a soma de suas contribuições traria pouca informação relevante.

Assim como no caso de imagens por RM, existem diferentes implementações de sequências para a obtenção de espectros. As sequências existentes podem ser agrupadas em duas modalidades conforme a técnica de localização espacial empregada: voxel único e multivoxel. No primeiro caso, um volume de interesse é

selecionado utilizando a combinação de pulso de RF seletivos e gradientes, de maneira análoga ao já discutido anteriormente. Já no segundo caso, vários voxels são adquiridos em um único experimento, utilizando, para isso, gradientes de codificação de fase. Embora haja uma cobertura espacial maior, o que pode ser importante para avaliação de regiões (saudáveis ou patológicas) mais extensas, a aplicação de técnicas multivoxel possui algumas limitações em relação às de voxel único. (85)

A seleção da região de interesse feita pelos métodos de voxel único envolve, geralmente, a excitação de três planos ortogonais que se intersectam na posição onde o sinal será detectado. Nesse caso, o tamanho e a posição do voxel são facilmente controláveis. Dentre as várias sequências de voxel único existentes, as mais comuns no que se refere à aplicação clínica, estão a "*Point Resolved Spectroscopy*" (PRESS) e "*Stimulated-Echo Acquisition Mode*" (STEAM). (86, 87)

A técnica STEAM explora o efeito de eco estimulado, que ocorre após a aplicação de três pulsos sucessivos de 90°. A principal vantagem em relação à PRESS é a redução do TE mínimo, embora, a intensidade máxima do sinal seja, tipicamente, metade do que se obteria aplicando a PRESS no mesmo voxel e para o mesmo TE. (86) Para sistemas de gradientes fortes e rápidos, encontram-se, na literatura, relatos de espectros com TE de 1 ms. (88)

No presente trabalho utilizamos uma sequência do tipo PRESS. A aquisição PRESS é feita com uma sequência de pulsos de 90° - 180° - 180° graus, mostrado na figura 23. Cada um deles é aplicado simultaneamente com um gradiente em uma das três direções ortogonais. Note que a ordem dos gradientes que aparece no diagrama representativo da sequência PRESS na figura 23 é apenas um exemplo e pode ser alterada.

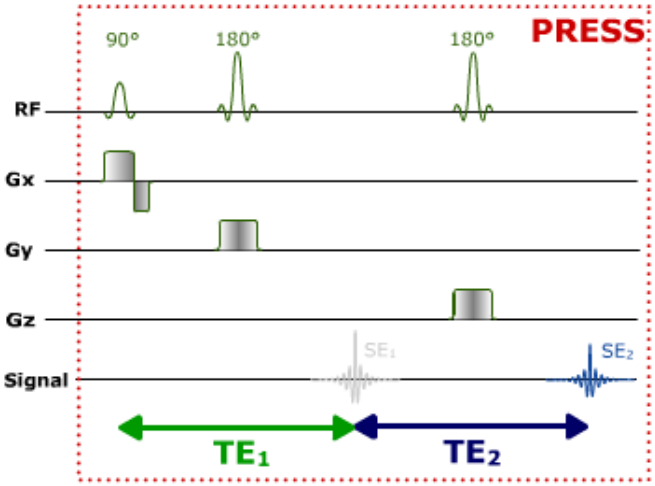

Figura 23 - Sequência de pulsos PRESS.
Fonte: IMAIOS (89)

Quando o primeiro pulso de 180° é executado depois de um tempo $\frac{TE_1}{2}$ em relação ao pulso de excitação, um eco é formado em TE_1 (magnetização transversal é produzida dentro de uma fatia perpendicular ao eixo x). A magnetização começa, então, a defasar. A aplicação do segundo pulso de 180°, transcorrido $\frac{TE_2}{2}$ após a formação do eco, irá refocalizá-la, de modo que o eco final será formado e medido instante $TE_1 + TE_2$ (que é igual ao TE).

O primeiro sinal de eco, que não é adquirido, provém de uma coluna formada na intersecção entre duas fatias ortogonais selecionadas pelo pulso de 90° e o primeiro pulso 180°. O segundo eco contém apenas o sinal do volume localizado na intersecção dos três planos definidos pelos três pulsos de RF, ou seja, é o voxel de interesse incialmente planejado pelo usuário. Todas as outras partes da amostra que foram excitadas por alguns dos pulsos, mas não pelo conjunto dos três pulsos, irão defasar e não contribuirão para o sinal. (87)

Na aquisição de sinais espectroscópicos, não se faz uso dos gradientes de leitura ou gradientes de codificação de frequências, pois a frequência é utilizada para constituir o espectro e não a posição. Além disso, a aquisição de dados, nesse caso, começa, tipicamente, no centro do eco de spins e dura várias centenas de milissegundos. Isto é necessário para possibilitar a análise de pequenas diferenças de frequência (da ordem de alguns Hertz) no desvio químico das moléculas de interesse. (87)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

As próximas sessões tratam efetivamente do desenvolvimento do trabalho. A primeira etapa do projeto envolveu as análises e estabelecimento dos protocolos de processamento de dados espectroscópicos. Para isso, fizemos uma avaliação do algoritmo que seria utilizado na quantificação de tais dados utilizando dados simulados. Avaliado os limites de confiabilidade do método para quantificação, os dados *in vivo* de MRS foram devidamente processados e a fração de gordura para cada paciente foi calculada.

Na sequência, implementamos rotinas de processamento para os dados de imagens por RM. A literatura da área mostra que os efeitos de relaxação podem comprometer a adequada determinação da fração de gordura no tecido hepático. Para avaliar a efetiva necessidade de se corrigir os dados para minimizar os efeitos de relaxação na quantificação, particularmente em dados obtido utilizando protocolos de aquisição compatíveis com aplicação clínica, foram analisados dados adquiridos utilizando sequências duplo-eco, triplo-eco e multieco (7 ecos no total).

Todo o trabalho foi feito com dados obtidos de pacientes portadores de diabetes do tipo II. Essa amostragem foi escolhida pois, conforme já discutido anteriormente, existe uma alta prevalência da NAFLD nesses pacientes. Os dados obtidos a partir das análises dos dados de RM foram comparados com dados de biópsia desses pacientes, o que possibilitou correlacionar dados não invasivos com o padrão ouro para quantificação de gordura hepática. Com isso, foi possível avaliar o potencial dos métodos baseados em RM no que se refere ao diagnóstico e avaliação da NAFLD, mesmo utilizando protocolos simples e compatíveis com a aplicação clínica.

4.1 AVALIAÇÃO DO ALGORITMO AMARES PARA QUANTIFICAÇÃO DE GORDURA

O AMARES é um algoritmo de quantificação de sinais no domínio do tempo, cuja base é o método não linear de mínimos quadrados. (90) Esse método permite uma extensa interação entre o usuário e o software durante o processamento, com a possibilidade da utilização de informação *a priori*, como o tipo de função utilizada

para o ajuste (Gaussiana ou Lorentziana), tipo de sinal (FID ou eco), intervalo de frequências, de fases etc. Essa maior flexibilidade por parte do usuário leva a uma maior acurácia, apesar de demandar uma expertise mínima por parte da pessoa que executa o processamento. (90) O algoritmo avaliado está implementado e disponível no software jMRUI (91-93), um software livre amplamente utilizado pela comunidade médico-cientifico em análises no domínio do tempo de dados de RM.

Para a avaliação do método de processamento, foram realizadas simulações de dados espectroscópicos de gordura com diferentes níveis de ruído. A seguir, serão descritos em detalhes o modelo utilizado na simulação desses dados bem como o protocolo de processamento e avaliação.

4.1.1 COMPLEXIDADE ESPECTRAL DA GORDURA

Hamilton e colegas, em 2011, conduziram um estudo a fim de caracterizar o espectro da gordura, tanto em *phantoms* como em humanos, utilizando MRS (94). Nesse trabalho, mostrou-se que a gordura possui, ao menos, seis picos espectrais distintos, com o pico mais proeminente (metileno –CH2–) localizado em 1.3ppm. Informações sobre desvio químico e amplitude relativa referente aos picos descritos estão listadas na tabela 2.

Tabela 2 - Componentes espectrais da gordura obtidas utilizando MRS.

Pico	Desvio Químico (ppm)	Fração de Gordura (%)
1	5,3	4,7
2	4,2	3,9
3	2,75	0,6
4	2,1	12,0
5	1,3	70,0
6	0,9	8,8

Fonte: HAMILTON (94)

Estes picos representam o sinal de gordura total, ou seja, todos deveriam ser considerados na quantificação de gordura para que ela seja precisa. No entanto,

análises *in vivo* mostraram que os picos 1 e 2, localizados em 5,3 ppm e 4,2 ppm, respectivamente, não são mensuráveis de forma confiável pois estão sob o pico da água, localizado em 4,7 ppm. O pico 3, localizado em 2.75 ppm, só é encontrado em indivíduos com altos níveis gordura hepática (superiores a 30%), isso ocorre porque não é comum o acúmulo de TAG poli-insaturados no fígado. Os picos 4, 5 e 6 são mais frequentemente encontrados e mensuráveis em espectros *in vivo*. (94) O espectro na gordura hepática em humanos pode ser visto na figura 23.

No mesmo estudo em que caracterizou o espectro da gordura, foram determinadas as amplitudes relativas de cada um dos picos (tabela 2), o que tornou possível estimar as amplitudes não mensuráveis dos picos 1 e 2 a partir das amplitudes de picos mensuráveis do espectro. A validação do experimento foi realizada em *phantoms* e em seguida aplicada em humanos.

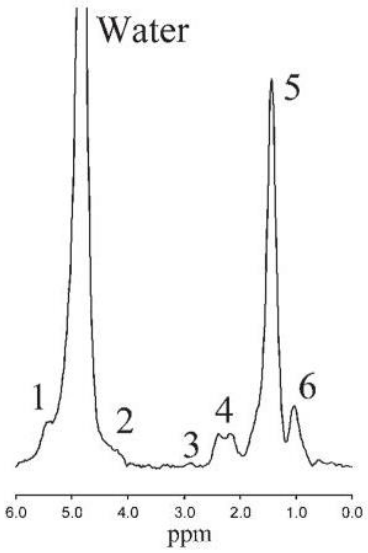

Figura 24 - Espectro de MRS da gordura hepática de um sujeito com acúmulo de gordura no fígado.
Fonte: HAMILTON (94)

Assim, há informação suficiente nos três picos mais proeminentes da gordura (4, 5 e 6), e, de acordo com o modelo proposto por Hamilton, a fração de gordura que esses três picos representam, corresponde a um valor de pouco mais que 91%. Os dois picos sob a água representam 8,6% do total da gordura existente no espectro. (94) Dessa forma, simplificar o modelo quantificando somente os picos mais proeminentes do espectro se torna uma boa aproximação. A principal justificativa para se adotar esse procedimento, que será efetivamente realizado no presente trabalho, é o fato de que componentes com baixas intensidade de sinal (e

consequente baixa SNR) apresentam valores muito variáveis quando múltiplas avaliações são feitas. Essas variações introduzem mais erro do que a estimativa indireta.

4.1.2 SIMULAÇÃO DO ESPECTRO DE RM DA GORDURA

Os espectros de gordura foram simulados com o intuito de avaliar a confiabilidade do algoritmo AMARES na quantificação da gordura e sua variação frente a diferentes taxas de ruído. As simulações foram feitas utilizando módulo "*Simulation*" do jMRUI 5.0. Esse módulo gera sinais utilizando a seguinte equação:

$$x(t) = Ae^{-\alpha t-(\beta t)^2}e^{i(2\pi f+\varphi_0)} \tag{73}$$

em que A é a amplitude do sinal, α a taxa de relaxação transversal (Hz), β o parâmetro que indica o quão gaussiana a forma do pico é (Hz), f a frequência (Hz) e φ_0 a fase (graus). Assim, é possível geral sinais cuja representação espectral seja uma linha Lorentziana, uma Gaussiana ou, ainda, uma combinação de ambas (curva do tipo Voigt).

Todos os dados foram simulados com 2048 pontos, fase nula e *dwell time* de 0,5 ms. Além disso, foram geradas linhas puramente Lorentziana, ou seja, $\beta = 0$ para todas as simulações. Os demais parâmetros utilizados para as simulações estão listados na tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros usados nas simulações do espectro de MRS da gordura.

Pico	*f* (ppm)[1]	*A* (u.a.)	α (Hz)
1	5,3	8,0	26,0
2	4,2	2,0	40,0
3	2,75	3,0	24,0
4	2,1	12,0	23,0
5	1,3	46,0	21,0
6	0,9	11,0	14,0

Fonte: Elaborada pela autora.

[1] A frequência, em Hz, efetivamente utilizada na interface da simulação foi calculada considerando um campo magnético de 3.0T.

A figura 25 mostra um espectro simulado utilizando os parâmetros mencionados.

Na mesma interface gráfica, é possível especificar a quantidade de ruído que se pretende adicionar ao sinal gerado. O ruído adicionado segue uma distribuição normal com média zero e sua amplitude é estipulada, em porcentagem, com base na maior amplitude do conjunto de picos. O ruído é aplicado sobre o FID e suas componentes reais e imaginárias são geradas independentemente de maneira a minimizar a correlação entre os mesmos.

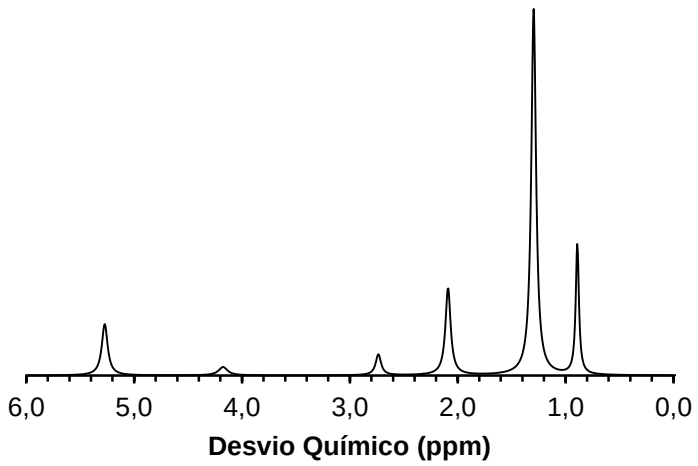

Figura 25 - Espectro de MRS simulado da gordura hepática.

Fonte: Elaborada pela autora.

Foram gerados espectros com diferentes níveis de ruído: 0%, 5%, 10%, 15%, 20% e 25%. Para cada nível de ruído, foram gerados cinco espectros independentes.

4.1.3 PROCESSAMENTO DOS DADOS SIMULADOS

Para realizar a quantificação dos dados simulados, foi utilizado, conforme mencionado, o algoritmo AMARES. Esse método possibilita interação entre o usuário e o software durante o processamento e a utilização de informação *a priori*. No nosso caso, foi definida uma base composta pelos 6 picos que compõem o espectro da gordura especificando valores iniciais para suas frequências e respectivas larguras de linha. Esses valores são usados como ponto de partida para

o algoritmo. A figura 26 mostra a interface gráfica do jMRUI com a janela de definição das informações iniciais para utilização do algoritmo AMARES para o processamento dos dados.

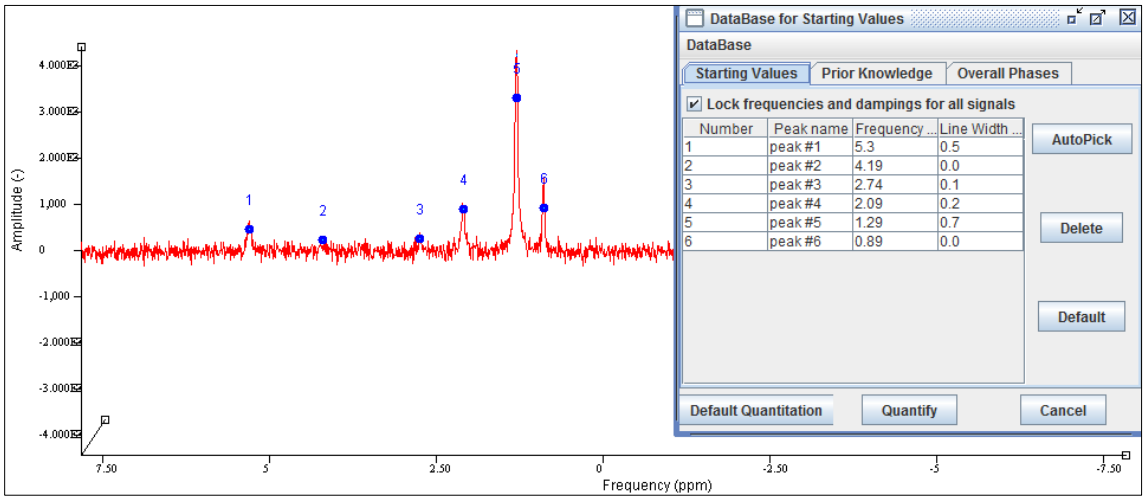

Figura 26 - Representação da quantificação utilizando o software jMRUI.

Fonte: Elaborada pela autora.

Foi definido que o método deveria estimar os seguintes parâmetros: amplitudes, larguras de linha e frequências de cada um dos picos. Isso é definido na aba “Prior Knowledge” da janela de definição das informações iniciais mostrada na figura 26. Nessa mesma aba, as fases relativas foram fixadas em zero, pois não se espera diferenças de fase entre os picos simulados, eliminando a necessidade de que o algoritmo as estime. Finalmente, a forma dos picos foi definida como Lorentziana, pois de acordo com os conceitos fundamentais de RM, a Transformada de Fourier do sinal, que é teoricamente dado por um decaimento exponencial, possui esse formato. No entanto, sabe-se que devido a efeitos de inomogeneidades de campo, “*eddy current*”, e até mesmo mobilidade fisiológica, o formato dos picos pode não ser descrito como uma única Lorentziana e isso foi levado em consideração no processamento dos dados *in vivo*, conforme será discutido mais adiante. Na aba “Overall Phases”, todas as fases (ordem 0 e 1) foram fixadas em 0 graus.

Essa base de informação *a priori* foi salva e utilizada em todos os processamentos de dados simulados subsequentes.

A partir dos resultados obtidos pela quantificação utilizando o método AMARES, foi calculada a média e o desvio padrão das amplitudes e taxa de

relaxação (α) de cada um dos picos estimados para cada nível de ruído. Esses valores foram comparados com os valores usados na simulação e a confiabilidade e reprodutibilidade do método foi avaliada para os diferentes níveis de ruído.

4.2 QUANTIFICAÇÃO DE GORDURA HEPÁTICA UTILIZANDO RM

Conforme mencionado, o foco central do trabalho foi mostrar que a RM é um excelente candidato à método diagnóstico e de quantificação de gordura em ambientes clínicos. Assim, avaliamos dados obtidos usando sequências de imagens e de espectroscopia com o intuito de estabelecer a eficácia e aplicabilidade de diferentes protocolos de aquisição no que se refere à adequada quantificação de gordura hepática de maneira não invasiva. Como referência, foram utilizados dados de biópsia hepática dos pacientes avaliados. A seguir, serão descritos, em detalhes, o grupo de pacientes e os protocolos de aquisição de imagens e espectroscopia, bem como o protocolo de processamento estabelecido e utilizado no presente trabalho.

4.2.1 PACIENTES

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Pedro Ernesto e todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Foram selecionados 80 pacientes portadores de diabetes tipo II, com idade entre 18 e 70 anos, com indicação clínica para biópsia hepática para avaliação da NAFLD.

Os critérios de exclusão foram: outras possíveis causas para doença crônica do fígado, como hepatite B ou C, histórico de alcoolismo (consumo maior do que 20g de álcool por dia), doença cardiopulmonar severa, insuficiência renal (creatinina maior que 1,5 mg/dL), ingestão de medicação que apresentasse relação com a causa de NAFLD, recusa da realização da biópsia hepática ou contraindicação para RM (implantes metálicos ou claustrofobia, por exemplo).

Os critérios para remoção do estudo incluíram a descoberta de outra etiologia para a doença hepática crônica através da biópsia ou material biopsiado insuficiente para análise histológica. No total, 10 pacientes foram removidos do estudo de forma que toda a análise foi feita com dados de apenas 70 sujeitos.

4.2.2 SISTEMA DE RM

Os dados de imagens e espectroscopia por RM utilizados nesse estudo foram adquiridos em parceria com o Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino, do Rio de Janeiro, utilizando um sistema de RM Achieva 3T (Philips Medical Systems, Holanda), equipado com gradientes capazes de gerar amplitudes de 80mT/m e 200mT/m/ms de tempo de subida. Uma bobina transmissora de corpo foi utilizada em conjunto com uma bobina receptora de abdômen de 16 canais.

4.2.3 RM: PROTOCOLOS DE AQUISIÇÃO

Todos os pacientes foram escaneados na posição supina e foram instruídos a prender a respiração no final da inspiração para as sequências adquiridas em apneia e a respirar tranquilamente durante as sequências trigadas pela respiração. Para o adequado planejamento do exame, imagens localizadoras coronais foram adquiridas na condição de máxima inspiração e máxima expiração. Além disso, imagens axiais e coronais ponderadas em T_2 foram obtidas para referência anatômica.

4.2.3.1 MRS

Os dados de MRS foram obtidos utilizando uma sequência single-voxel com voxel de 25 x 25 x 25 mm^3 localizado no segmento V do fígado, de acordo com a classificação de Couinaud, o que corresponde à região onde a biópsia foi realizada. Sequência localizadoras adquiridas em máxima expiração e inspiração foram usada para garantir que o voxel estaria dentro do fígado durante todo o ciclo respiratório.

Além disso, o voxel foi posicionado de maneira a evitar as bordas do fígado, os grandes vasos sanguíneos hepáticos e a árvore biliar.

Uma sequência PRESS foi utilizada para aquisição dos dados. Para estimativa e posterior correção de T_2, uma versão multieco foi utilizada (TE = 40ms, 50ms, 60ms, 70ms, 80ms, 90ms, 100ms e 110ms). Para minimizar os efeitos de T_1, o tempo de repetição foi ajustado para TR = 2000ms. Foram adquiridos 1024 pontos com uma largura de banda de 1kHz e uma média. Para a aquisição, nenhum tipo de supressão de água foi utilizado e os ajustes automáticos resultaram em linhas de água com larguras entre 40 e 50Hz.

4.2.3.2 MRI

Para quantificação de gordura utilizando imagens por RM foi usado uma implementação convencional, 2D, da sequência GRE. Ângulos de *flip* baixos ($\alpha = 15°$) foram utilizados em todas as aquisições para minimizar o efeito de T_1. (20) Para avaliar o impacto dos efeitos de T_2* na quantificação de gordura hepática considerando um protocolo compatível com a aplicação clínica, foram adquiridos dados utilizando uma sequência duplo-eco, uma triplo-eco e uma multieco, na qual imagens foram obtidas com 7 TEs distintos.

Todas as aquisições foram feitas com os seguintes parâmetros: TR = 180ms, ângulo de *flip* = 15°, FOV = 350 x 350 mm^2, matriz = 117 x 117, 33 cortes de 6 mm com espaçamento de 1 mm entre eles e um fator SENSE de aceleração de 2. O tempo de aquisição desses protocolos foi de 43,6s, divididos em 2 apneias de 21,8s cada.

Para a aquisição duplo-eco, foram usados TE = 1,15ms e 2,30ms. Para a triplo-eco, TE = 2,30ms, 3,45ms e 4,60ms. Já para multieco, TE = 1,15ms, 2,30ms, 3,45ms, 4,60ms, 5,75ms, 6,90ms e 8,05ms.

4.2.4 RM: PROTOCOLOS DE PROCESSAMENTO

Após a aquisição, os dados de MRI e MRS foram exportados nos formatos DICOM e Philips SPAR/SDAT, respectivamente, para posterior análise, usando os protocolos que serão descritos a seguir.

4.2.4.1 MRS

A quantificação dos dados foi realizada utilizando o algoritmo AMARES, disponível no software jMRUI 5.0, já descrito anteriormente. Antes de iniciar a quantificação, os dados foram analisados visualmente para avaliação da integridade dos mesmos e uma correção de fase de ordem zero foi realizada quando necessária. Os espectros, já com a fase ajustada, foram exportados no formato "*.mrui*" para as demais etapas do processamento. Nenhum outro pré-processamento foi realizado antes da efetiva quantificação da fração de gordura.

Para quantificação, foi criada, de maneira análoga ao realizado para os dados simulados, uma base com conhecimentos prévios para que o algoritmo pudesse realizar a quantificação do modo mais eficiente possível, gerando o menor resíduo de sinal. A base foi composta pelos 6 picos que compõem o espectro da gordura e 1 pico para o espectro da água. Conforme já mencionado, os picos deveriam possuir forma Lorentziana. Entretanto, testes durante o processo de estabelecimento do protocolo de processamento revelaram que o melhor ajuste dos espectros *in vivo* era conseguido quando os picos foram eram definidos como o somatório de duas ou mais gaussianas. Isso ocorre, principalmente, devido a efeitos como mobilidade fisiológica (vasos sanguíneos, batimentos cardíacos, respiração), inomogeneidade de campo e "*eddy currents*". Dessa forma, ao invés de especificar valores fixos para a frequência de cada uma das linhas, como havíamos feito no caso de dados simulados, foi especificado intervalos iniciais para suas frequências. A tabela 4 mostra os valores utilizados na definição da base utilizada para quantificação de gordura nos dados de MRS

Como a fase do espectro foi previamente corrigida, todas os ajustes de fase foram zerados ou desligados para o processamento. Os demais parâmetros, como largura de linha e amplitude, foram deixados a cargo da estimativa do próprio algoritmo.

Os dados possuem oito espectros (figura 27), cada um adquirido em um tempo ao eco distinto, já citado acima. Cada um dos picos mensuráveis teve a estimativa de sua área corrigida para levar em conta a relaxação T_2, fornecendo, assim, a respectiva densidade de prótons. Isso foi feito através de um ajuste monoexponencial da curva usando um método não linear de mínimos quadrados

(figura 28). Esse ajuste foi feito com auxílio do programa OriginPro v8.0 (OriginLab, Northampton, MA).

Tabela 4 - Parâmetros utilizados na definição da base utilizada para quantificação de gordura em dados *in vivo* utilizando o AMARES.

Pico	Quantidade de Gaussianas	Intervalo de Frequência (ppm)
1	2	5,167 – 5,564
2	2	4,410 – 3,935
3	2	3,011 – 2,393
4	3	2,206 – 1,857
5	3	1,762 – 1,082
6	2	1,042 – 0,754
Água	3	4,800 – 4,601

Fonte: Elaborada pela autora.

É importante mencionar que muito embora os diferentes picos de gordura possam apresentar tempos de relaxação ligeiramente diferentes, a baixa proeminência da maior parte deles impossibilita que o T_2 seja estimado individualmente. (95) Dessa forma, o tempo de relaxação da gordura foi determinado utilizando o apenas o pico 5, que apresenta SNR suficiente para análise levando em conta todos os TEs.

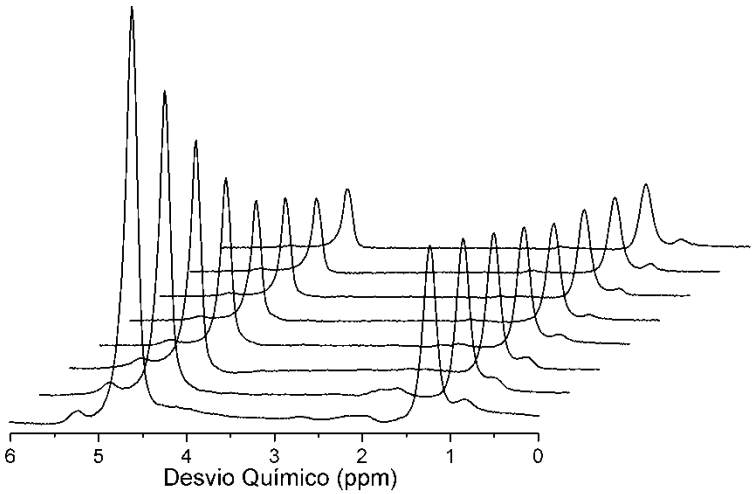

Figura 27 - Conjunto de espectros representativos adquiridos com múltiplos TEs em um paciente com esteatose moderada.

Fonte: Elaborada pela autora.

Devido à superposição dos picos 1 e 2 com o pico da água, é difícil separá-los na quantificação. Logo, suas respectivas densidades de prótons foram determinadas de modo indireto, a partir da avaliação dos picos mensuráveis, de acordo com o descrito no trabalho do Hamilton e colaboradores. (94)

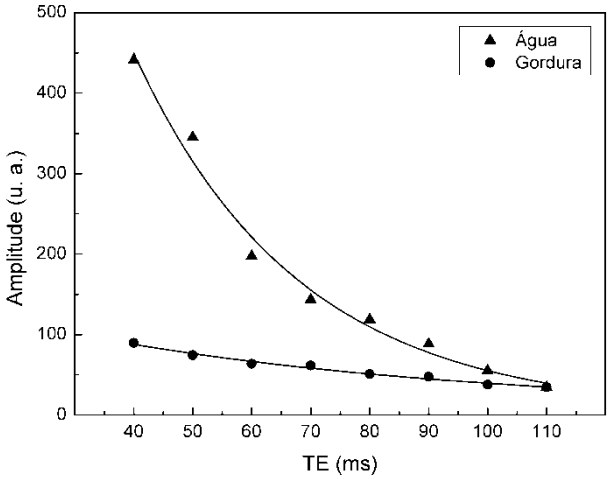

Figura 28 - Ajuste não linear para determinação da densidade de prótons da água e da gordura hepática.

Fonte: Elaborada pela autora.

A densidade de prótons total da gordura foi definida como a soma de todas as densidades de prótons individuais (estimada direta ou indiretamente) da gordura. Com isso, a fração de gordura pode ser calculada utilizando a seguinte equação:

$$FF(\%) = \frac{\rho_{gordura}}{\rho_{gordura}+\rho_{água}} \times 100 \qquad (74)$$

em que $\rho_{gordura}$ é a densidade de prótons total da gordura e $\rho_{água}$ a respectiva densidade de prótons da água.

4.2.4.2 MRI

A quantificação de gordura utilizando imagens por RM foi realizada a partir de uma sequência GRE convencional e métodos baseados na diferença de fase entre o sinal da água e o sinal da gordura. (96) Foram adotadas três abordagens distintas, com dados sendo coletados com protocolos com dois, três e sete ecos.

Inicialmente, as imagens foram analisadas visualmente para avaliação da integridade das mesmas, bem como, para confirmação acerca da ausência de artefatos que pudessem comprometer a adequada quantificação de gordura. As medidas de intensidade do sinal em cada uma das imagens foram feitas utilizando o software MIPAV (97), um software livre que permite visualizar, quantificar e analisar imagens médicas adquiridas por RM.

Do mesmo modo que os voxels na MRS foram posicionados no segmento V do tecido hepático, região onde foi realizada a biópsia, as ROIs para realizar a quantificação da gordura usando imagens por RM foram desenhadas nessa região (figura 24). No caso particular de imagens, uma das vantagens, quando comparada a MRS e à biópsia, é o fato de se poder fazer uma avaliação extensa do fígado. Entretanto, para os objetivos comparativos do presente trabalho, essa análise mais local foi necessária para garantir a consistência.

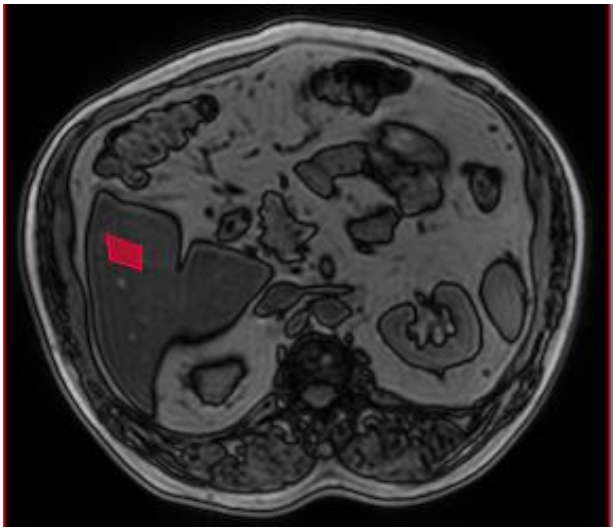

Figura 29 - Imagem representativa do fígado de um paciente mostrando o posicionamento típico da ROI definida para a determinação do percentual de gordura hepática.

Fonte: Elaborada pela autora.

O sinal de RM para uma sequência padrão GRE possui, além da dependência com tempo de relaxação transversal T_2^*, uma dependência com o tempo de relaxação longitudinal T_1, bem como com os parâmetros de imagem associados a ele, como o tempo de repetição TR e ângulo de *flip*. Os efeitos causados por esses parâmetros devem ser levados em conta ou eliminados para uma adequada determinação da fração de gordura hepática. (20,74) Nossos dados, conforme já

mencionado, foram adquiridos usando baixos ângulos de *flip* pequenos, visando minimizar os efeitos causados pelo tempo de relaxação longitudinal.

Nesse caso, o sinal obtido utilizando uma sequência GRE pode ser escrito da seguinte forma:

$$S(TE) = \left| k\alpha \sum_n \rho_n \, e^{-TE/T_{2n}^*} \, e^{2\pi i f_n TE} \right| \tag{75}$$

em que ρ_n é a densidade de prótons do tecido n e k uma constante de normalização.

No caso em que apenas dois ecos foram adquiridos, o que se configura como o método mais simples, ignoramos o efeito de T_2^*. Nesse caso, duas imagens foram adquiridas em diferentes TEs, definidos de forma tal que os sinais da água e da gordura estariam em fase (IP, do inglês *in phase*) e fora de fase (OP, do inglês *out of phase*), respectivamente. Para isso, consideramos o modelo mais simplificado de todos, no qual assume-se que a gordura e a água possuem apenas uma componente. Assim, obtemos um sinal da forma:

$$S(TE) = \left| k\alpha\rho_{água} + k\alpha\rho_{gordura} \, e^{2\pi i \Delta f TE} \right| \tag{76}$$

em que Δf é a frequência de ressonância do pico principal da gordura (único considerado nesse modelo) relativa à frequência de ressonância da água (equivalente a 3.4ppm). Observa-se que há duas componentes que descrevem o sinal, uma para a gordura e uma para a água, de modo que, pode-se definir:

$$OP = S_{água} - S_{gordura} \tag{77a}$$

$$IP = S_{água} + S_{gordura} \tag{77b}$$

Isolando-se as variáveis referentes ao sinal da água e da gordura, obtém-se:

$$\rho_{água} = \frac{IP+OP}{2} \tag{78a}$$

$$\rho_{gordura} = \frac{IP-OP}{2} \tag{78b}$$

Esse é o clássico método "*Two Point Dixon*". (71,96) Determinadas as densidades de prótons da água e da gordura, a fração de gordura no fígado foi determinada seguindo o mesmo caminho utilizado com os dados de MRS (equação (74)).

Na aquisição triplo-eco, três imagens foram adquiridas com TE = 2,30ms, 3,45ms e 4,60ms respectivamente. Para esses tempos e considerando apenas a componente principal da gordura, o sinal da água e da gordura estariam em fase, fora de fase e em fase em cada uma das aquisições. Como, nesse caso, temos duas condições equivalentes (duas imagens IP) adquiridas em tempos distintos, é possível estimar, a partir do decaimento do sinal, a taxa de relaxação transversal do tecido e levar isso em conta no momento da quantificação da fração de gordura no tecido hepático. A determinação do T_2^* pode ser feita da seguinte forma:

$$T2^* = \Delta TE \; log \frac{S_{2,3}}{S_{4,6}} \tag{79}$$

em que, $S_{2,3}$ e $S_{4,6}$ correspondem às amplitudes dos sinais das imagens IP adquiridas no tempos ao eco 2,3ms e 4,6ms, respectivamente. Esse procedimento nada mais é do que a linearização do decaimento monoexponencial previsto pela teoria de RM se assumirmos uma única componente no tecido. Assim, as densidades de prótons da água e da gordura puderam ser determinadas:

$$\rho_{água} = \frac{S_{3,45}e^{-3,45/T_2^*} + S_{2,3}e^{-2,30/T_2^*}}{2} \tag{80a}$$

$$\rho_{gordura} = \frac{S_{2,3}e^{-2,30/T_2^*} - S_{3,45}e^{-3,45/T_2^*}}{2} \tag{80b}$$

Utilizando uma notação similar, $S_{3,45}$ corresponde à amplitude do sinal da imagem OP adquirida no tempo ao eco 3,45ms. O percentual de gordura foi, então, calculado de modo similar à espectroscopia e à duplo-eco (equação (74)).

Na aquisição multieco, o sinal foi modelado novamente considerando apenas a componente principal da gordura. Entretanto, os tempos de relaxação foram determinados utilizando os dados IP e OP independentemente. Nesse caso, o valor de T_2^* para cada conjunto de dados ($T_{2\,IP}^*$ e $T_{2\,OP}^*$) foi determinado de maneira análoga ao feito com os dados de MRS, através de um ajuste não linear utilizando o método dos mínimos quadrados. Esse ajuste foi feito com auxílio do programa OriginPro v8.0 (OriginLab, Northampton, MA).

Uma vez determinados os respectivos tempos de relaxação, as densidades de prótons da água e da gordura puderam ser determinadas:

$$\rho_{água} = \frac{S_{1,15}e^{-1,15/T_{2OP}^*} + S_{2,3}e^{-2,30/T_{2_}^*IP}}{2} \tag{81a}$$

$$\rho_{gordura} = \frac{S_{2,3}e^{-2,30/T^*_{2IP}} - S_{1,15}e^{-1,15/T^*_{2OP}}}{2} \quad (81b)$$

e, mais uma vez, o percentual de gordura foi calculado de modo similar às anteriores (equação (74)).

4.3 BIÓPSIA HEPÁTICA

Biópsia subcostal do segmento V do fígado foi realizada, guiada por ultrassom, em todos os pacientes do estudo. Foi usada uma agulha de biópsia Menghini de calibre 16 Gauge para obter amostras de 2cm ou mais de comprimento. As amostras foram fixadas em solução de formol a 10%, e, em seguida, incluído em parafina. As secções foram, então, coradas com hematoxilina e eosina, tricrômico de Masson, e Azul da Prússia.

Todas as lâminas de biópsia foram examinadas prospectivamente por uma patologista com quase 30 anos de experiência. Uma análise semiquantitativa da esteatose foi feita em toda extensão do fragmento do fígado e foi realizada pelo cálculo da percentagem de hepatócitos esteatóticos no parênquima hepático. Os resultados classificados em 4 grupos de acordo com o sistema de pontuação estabelecido pela Rede de Pesquisa Clínica NASH (NASH-CRN): normal, <5%; leve, 5-33%; moderada, 33-66%; e grave, >66%. (98) As medidas de esteatose foram graduadas em incrementos de 5% para avaliação mais precisa.

A biópsia foi realizada em um intervalo máximo de três meses após as aquisições de RM. Esse procedimento foi realizado após as aquisições de imagens e espectroscopia para evitar que os efeitos do procedimento invasivo (por exemplo, sangramento, edema etc.) pudessem comprometer a avaliação por RM.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Primeiramente, foram realizados testes de normalidade em todos os conjuntos de dados, utilizando o teste Shapiro-Wilk, permitindo, assim, escolher o melhor teste estatístico para análise de correlação. A análise de correlação é importante, pois fornece, de modo simplificado, o grau de relacionamento entre as

variáveis estudadas. No nosso trabalho, veremos que os dados não formam uma nuvem comportada de distribuição normal e, devido a isso, utilizou-se a correlação de Spearman. Esse é um método não paramétrico que usa somente os postos, e não faz quaisquer suposições sobre o conjunto de dados. O coeficiente de Spearman não é sensível a assimetrias na distribuição, nem à presença de *outliers*, não exigindo, portanto, que os dados provenham de duas populações normais. Foram comparados os resultados de fração de gordura determinados pela MRS e MRI (duplo-eco, triplo-eco, e multieco) com os dados de biópsia hepática, utilizando a correlação Spearman. Essas análises foram realizadas utilizando o software OriginPro v8.0 (OriginLab, Northampton, MA).

Em seguida, curvas "*Receiver Operating Characteristic*", ou curvas ROC, foram calculadas de modo a definir valores que predigam a sensibilidade e especificidade de cada técnica. Para realizar um teste de diagnóstico, considera-se duas populações: a de indivíduos doentes e a de indivíduos saudáveis (grupo controle). Nas nossas análises, os grupos esteatóticos foram divididos de acordo com o resultado obtido na biópsia, atualmente considerado o padrão ouro da quantificação de gordura hepática: esteatose leve (5-33%), moderada (33-66%) e severa (>66%).

As curvas ROC para cada uma das modalidades baseadas em RM foram realizadas utilizando uma plataforma online. (100) As área sob as curvas foram calculadas utilizando o método de Obuchowski (101) e os valores de corte de especificidade e sensibilidade para cada uma das técnicas foi determinado utilizando a maximização do índice *J* de Younden (102) na curva ROC suavizada. As curvas ROC foram comparadas estatisticamente entre si utilizando um teste bicaudal.

Todas as análises estatísticas foram consideradas significantes para $p < 0{,}05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

As sessões a seguir trazem os principais resultados obtidos durante o desenvolvimento desse trabalho e suas respectivas interpretações. Para manter a consistência e facilitar a organização, esse capítulo foi escrito seguindo uma estrutura de tópicos similar à utilizada na apresentação dos métodos.

5.1 AVALIAÇÃO DO ALGORITMO AMARES PARA QUANTIFICAÇÃO DE GORDURA

Conforme mencionado anteriormente, a avaliação do método de processamento foi realizada utilizando dados simulados de espectroscopia por RM. Esses dados foram gerados utilizando o modelo que descreve a complexidade espectral da gordura hepática. A cada conjunto de sinais foi adicionado um nível de ruído, de maneira a avaliar a eficiência do algoritmo em diferentes condições. A figura 30 mostra um exemplo dos dados simulados considerando os diferentes níveis de ruído.

Conforme esperado, quanto maior o nível de ruído introduzido no sinal, maior a dificuldade de visualizar os picos com menor amplitude. Com ruído de apenas 5%, já fica difícil visualizar o pico 2. Para níveis maiores de ruído, apenas os picos 4, 5 e 6 podem ser visualmente detectados. Em casos extremos, como o obtido quando um ruído de 25% é inserido, apenas o pico 5 pode ser visualizado de maneira robusta.

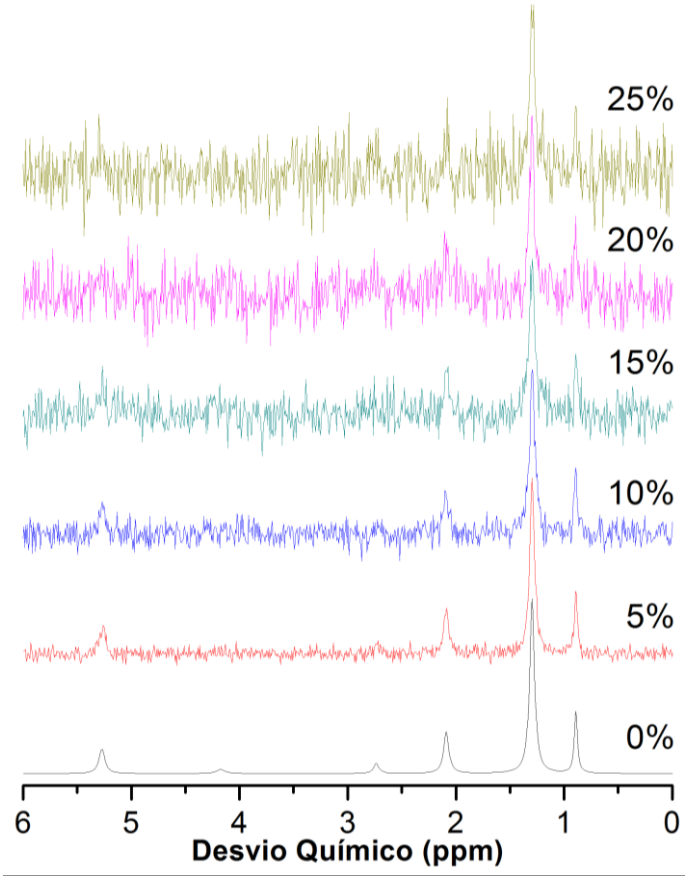

Figura 30 - Dados simulados para representar a espectro de RM da gordura hepática com diferentes níveis de ruído.

Fonte: Elaborada pela autora.

Utilizando o AMARES, foi realizada a quantificação de cada um dos picos simulados para os diferentes níveis de ruído. A análise estatística não mostrou diferença significativa entre os valores obtidos na estimativa da amplitude dos picos presentes no dado simulado e os valores utilizados na simulação para nenhum nível de ruído.

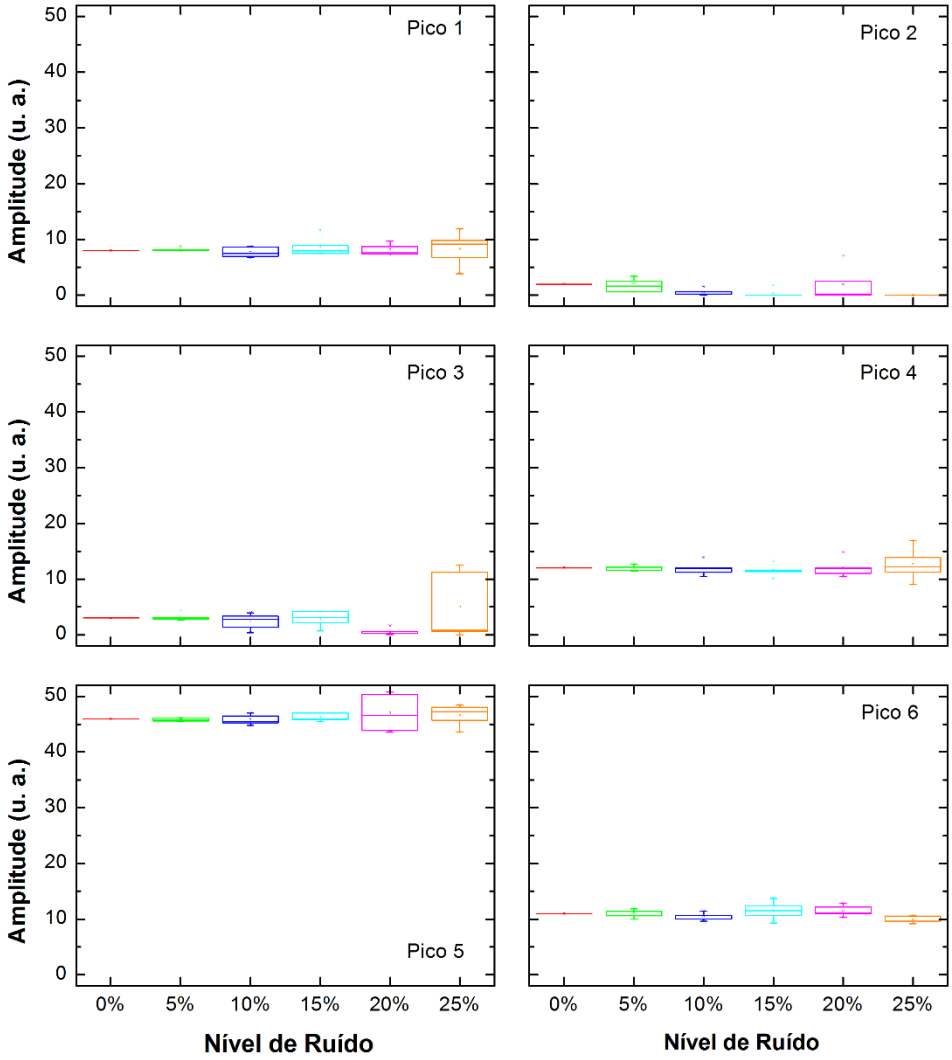

Figura 31 - Amplitudes dos FIDs obtidos para cada uma das componentes do sinal de gordura simulado obtidas utilizando o algoritmo AMARES.

Fonte: Elaborada pela autora.

A figura 31 mostra os valores das amplitudes do FID obtidos para cada uma das componentes do sinal de gordura considerando os diferentes níveis de ruído simulados. No caso do sinal sem ruído, o método é exato na determinação dos valores das amplitudes. Nos demais casos, quando consideradas as amplitudes obtidas, os dados sugerem que o método AMARES é bastante eficiente na quantificação apropriada de cada componente até uma determinada SNR. Quando consideramos o pico 2, por exemplo, com 15% de ruído o método já não é capaz de encontrar o pico em algumas tentativas, retornando, portanto, valor nulo para amplitude. A pouca variabilidade mostrada nesse resultado mostra que de fato o método não converge para essa SNR. Ainda com relação a esse pico, para níveis maiores, como 25%, o método não consegue encontrar o pico nenhuma vez. Isso

entretanto, é bastante compreensível uma vez que a análise visual da figura 30 já revela a dificuldade em visualizar esse pico com ruído de apenas 5%.

Problemas similares podem ser observado através da análise dos resultados obtidos para o pico 3 para níveis de ruído acima de 20%. No caso do ruído de 20%, o método novamente não consegue convergir em algumas tentativas, retornando valores nulos para amplitude. Já no caso de 25% de ruído, o problema é ligeiramente diferente e os valores obtidos flutuam aleatoriamente, introduzindo uma enorme variabilidade no resultado comprometendo a confiabilidade no método. Mais uma vez, esse são casos extremos em que a SNR dos picos avaliados é, inclusive, menor do que 1, e não devem comprometer a avaliação do método de processamento para o caso mais geral.

À parte dos casos extremos, o método se mostrou bastante robusto na estimativa das amplitudes referente aos picos simulados. A adequada quantificação de um determinado sinal de RM depende da apropriada medida da amplitude, o que depende diretamente da estimativa dos parâmetros de relaxação do sinal. Muito embora a baixa variabilidade encontrada na análise dos dados de amplitude sugira que as estimativas da taxa de relaxação transversal (R_2) estejam sendo feita adequadamente pelo método, é interessante avaliar os valores obtidos. A figura 32 mostra os valores obtidos para R_2 para cada um dos picos considerando os diferentes níveis de ruído simulados.

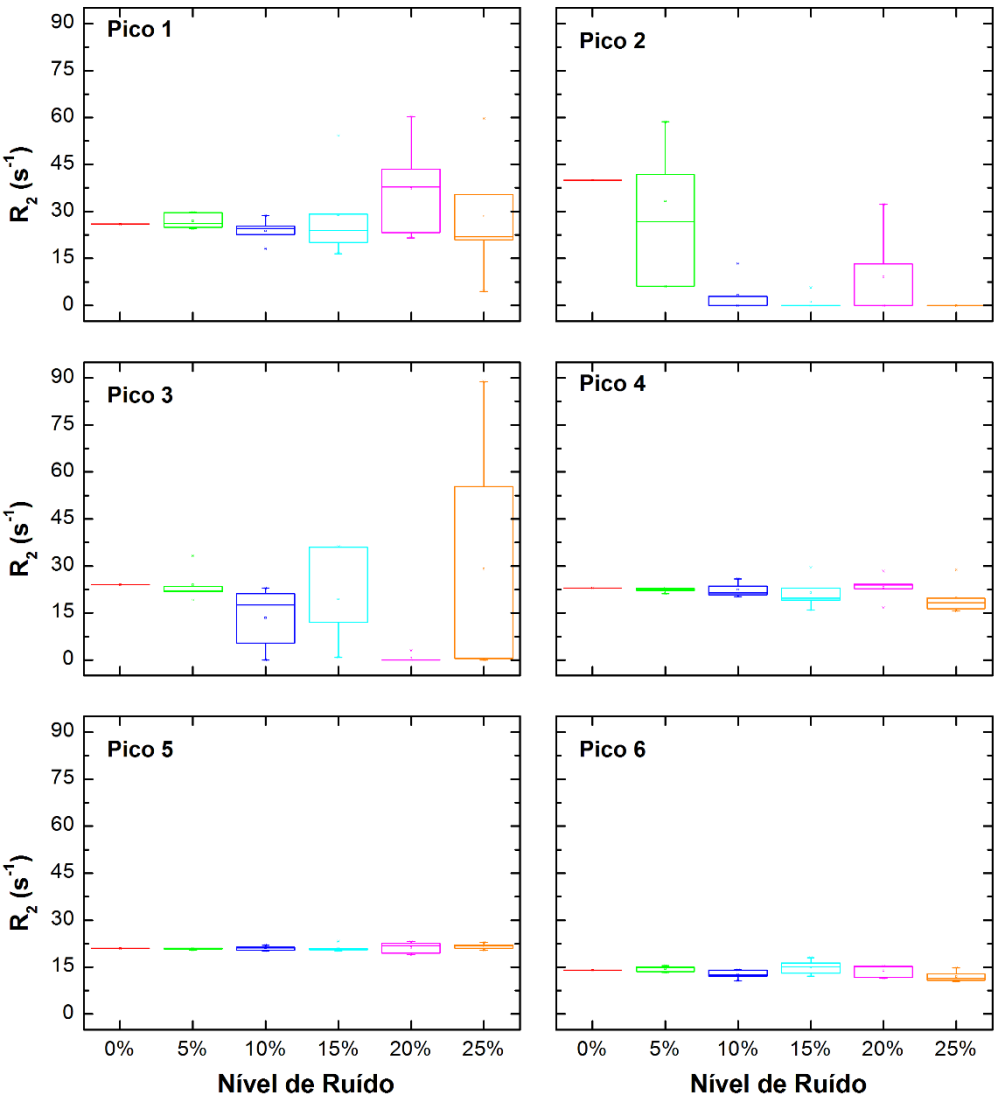

Figura 32 - Taxas de relaxação transversal dos picos simulados obtidas utilizando o algoritmo AMARES.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como esperado, comportamento similar àquele observado para a análise das amplitudes obtidas pode ser visto no caso dos valores de R_2. Nesse caso, entretanto, as variabilidades observadas no caso das estimativas de amplitudes ficam ainda mais acentuadas, como é o caso, por exemplo, da estimativa obtida para o R_2 do pico 3 quando foi utilizado um nível de ruído de 25%. Mais uma vez, o método parece ser confiável e, principalmente, reprodutível para avaliação de picos com SNR suficientemente alta.

Se considerarmos o fato de que dados *in vivo* de MRS apresentam SNR equivalente àquelas encontradas nos sinais com níveis de ruído de 5% a 15%, dependendo do protocolo de aquisição e do campo magnético utilizado no exame,

podemos considerar que o AMARES é confiável e reprodutível no que se refere à quantificação da gordura hepática, principalmente considerando seus picos principais, que apresentam maior amplitude e, consequentemente, maior SNR. Esses são, de fato, os picos que nos interessam no trabalho pois, como a própria literatura mostra, a gordura hepática só pode ser sistematicamente determinada de maneira robusta considerando os picos 4, 5 e 6 (os picos 1 e 2 estão debaixo do pico da água, o que compromete sua adequada quantificação e o pico 3 só é detectável *in vivo* em pacientes com elevados percentuais de gordura no fígado).

5.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA

A análise histológica, que será utilizada como padrão ouro para comparação no que se refere à esteatose, foi usada para classificar os pacientes dentro dos diferentes grupos esteatóticos. A análise mostrou uma prevalência da doença (pacientes com mais de 5% de gordura hepática) de 91% (64 pacientes). Dentre esses pacientes, a esteatose leve foi detectada em 32 pacientes, a moderada em 11 e a severa em 21 pacientes.

Conforme esperado pelo que se conhece da literatura, nossa população, composta por pacientes portadores de diabetes tipo II mostrou uma alta prevalência de esteatose. A distribuição desses pacientes dentro dos diferentes estágios da doença não foi homogênea entretanto, com maior incidência de pacientes com esteatose leve. Isso já era inicialmente esperado uma vez que esses pacientes foram incluídos no estudo ainda em fase de avaliação e diagnóstico da doença.

O número pequeno de controles (apenas 6 pacientes sem esteatose) representa uma das limitações do presente estudo, principalmente no que se refere às análises estatísticas. Entretanto, como o critério de inclusão envolvia indicação clínica para biópsia hepática para avaliação da NAFLD e a avaliação comparativa exigia que uma biópsia hepática fosse feita, não foi possível utilizar controles específicos para o presente projeto. Em vista disso, toda a análise e discussão dos resultados será feita levando em conta essa característica amostral.

5.3 QUANTIFICAÇÃO DE GORDURA HEPÁTICA UTILIZANDO RM

A figura 33 mostra espectros representativos obtidos em pacientes pertencentes aos 4 diferentes grupos do estudo (ausência de esteatose, também considerado controle, esteatose leve, moderada e severa). Esses dados foram adquiridos com TE = 40ms e todos os espectros foram normalizados usando o pico da água (centrado em 4,7ppm) como referência. É possível observar claramente a variação das quantidades relativas de gordura em cada um dos dados.

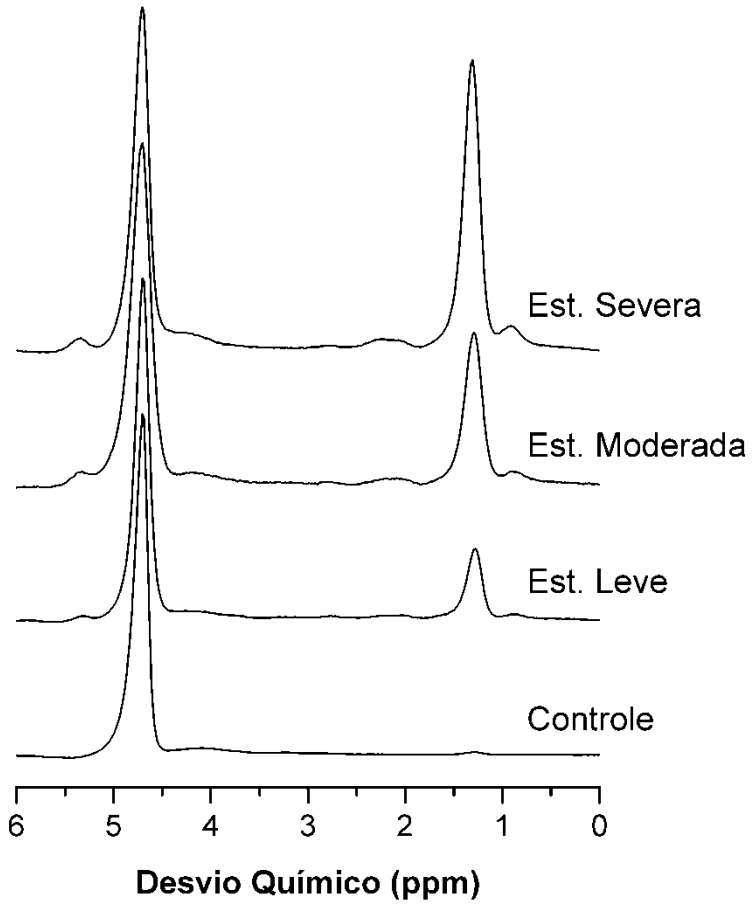

Figura 33 - Espectros representativos obtidos no fígado de pacientes dos diferentes grupos avaliados (controle, esteatose leve, moderada e severa).

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir desses dados, é possível verificar que a SNR típica dos dados obtidos é compatível com àquela para a qual o algoritmo de processamento foi considerado reprodutível e confiável. Além disso, é possível comprovar a dificuldade de se estimar a gordura utilizando alguns picos, como os dois que se encontram ao redor

do pico da água e o pico 3, que nem mesmo para altos níveis de gordura aparece de maneira expressiva.

Após a avaliação e validação do algoritmo AMARES e do protocolo de processamento utilizando a interface do jMRUI, realizamos o processamento dos dados de MRS obtidos em pacientes. A figura 34 mostra um espectro de RM representativo obtido com TE = 40ms no fígado de um paciente e o respectivo resultado do ajuste feito pelo método de processamento.

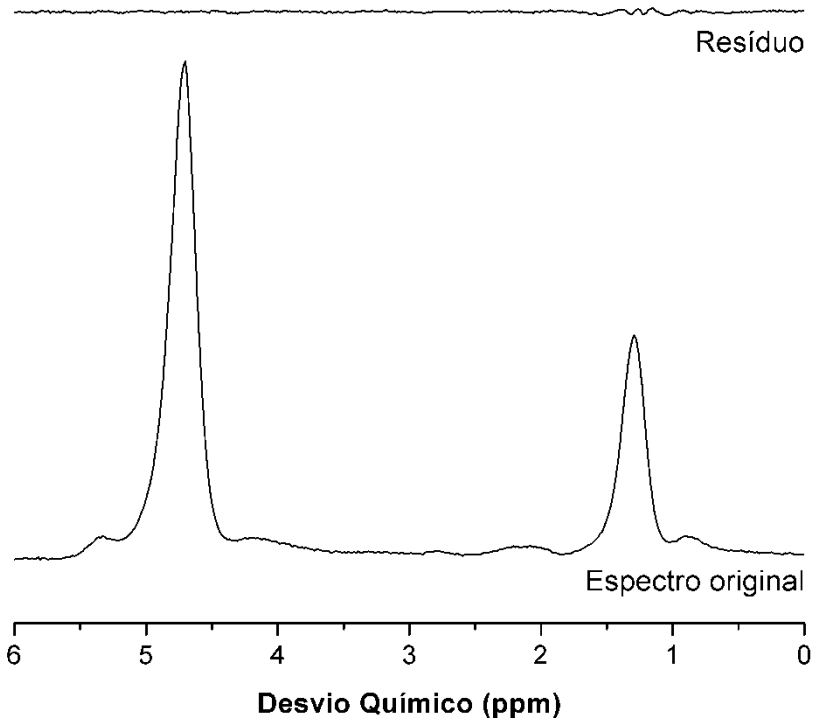

Figura 34 - Espectro representativo obtido no fígado de um paciente e o respectivo resíduo do sinal após o processamento utilizando o método AMARES.

Fonte: Elaborada pela autora.

É possível ver pelo resíduo, definido como sendo a diferença entre o sinal estimado pelo método e o sinal original, que o ajuste realizado é bastante eficiente para a SNR típica dos dados analisados no presente trabalho. Essa mesma estimativa foi feita para os diferentes tempos ao eco e as quantidades de água e gordura, em cada um dos casos, foi estimada após a correção para os efeitos da relaxação.

Apenas de maneira representativa, podemos listar os valores obtidos para os dados mostrados na figura 33. Nesse caso, os valores de gordura hepática foram

estimados, utilizando MRS, em 25%, 13%, 5% e 0,5% para esteatose severa, moderada, leve e controle, respectivamente. Já a análise histológica atribuiu, para os mesmos pacientes, 90%, 55%, 30%, 0%, respectivamente. É interessante notar que, apesar de consistentes entre si, os valores obtidos em cada uma das técnicas são bastante distintos. Isso se deve ao fato de que as análises baseadas em RM e histologia são fundamentalmente diferentes e quantificam a gordura hepática utilizando métricas muito distintas.

A análise histológica providencia informação acerca da distribuição da gordura dentro dos lobos hepáticos fornecendo uma análise semiquantitativa da esteatose. Basicamente, o que se faz é contar o número de células que apresentam gordura depositada e determinar o percentual das mesmas com relação ao número de células que não apresentam gordura depositada. Nesse caso, a quantidade efetiva de gordura em cada hepatócito, ou mesmo no conjunto analisado não é levada em conta. Já no caso da RM, o que se está estimando é a densidade de prótons presentes em cada um dos constituintes de interesse, seja, nesse caso, a água ou a gordura. Assim, um conjunto de hepatócitos com pequenas vesículas de gordura acumuladas apresenta sinal diferente do mesmo número de hepatócitos com grandes vesículas de gordura acumuladas em si. Isso confere à RM um caráter muito mais quantitativo em termos de obtenção da real fração de gordura existente no tecido hepático e justifica a grande variação nos valores obtidos quando comparados com a biópsia hepática.

Essas mesmas considerações se aplicam a MRI. Assim como no caso de MRS, os valores obtidos através do processamento dos dados de imagem refletem a densidade de prótons da água e da gordura presentes no tecido avaliado. No caso particular de imagens, uma maior concentração de gordura no tecido hepático resulta em uma maior diferença na intensidade de sinal quando comparamos uma imagem IP com um OP. Exemplo disso pode ser visto na figura 35 que mostra duas imagens obtidas consecutivamente nas condições IP e OP, respectivamente, para pacientes com diferentes frações de gordura hepática.

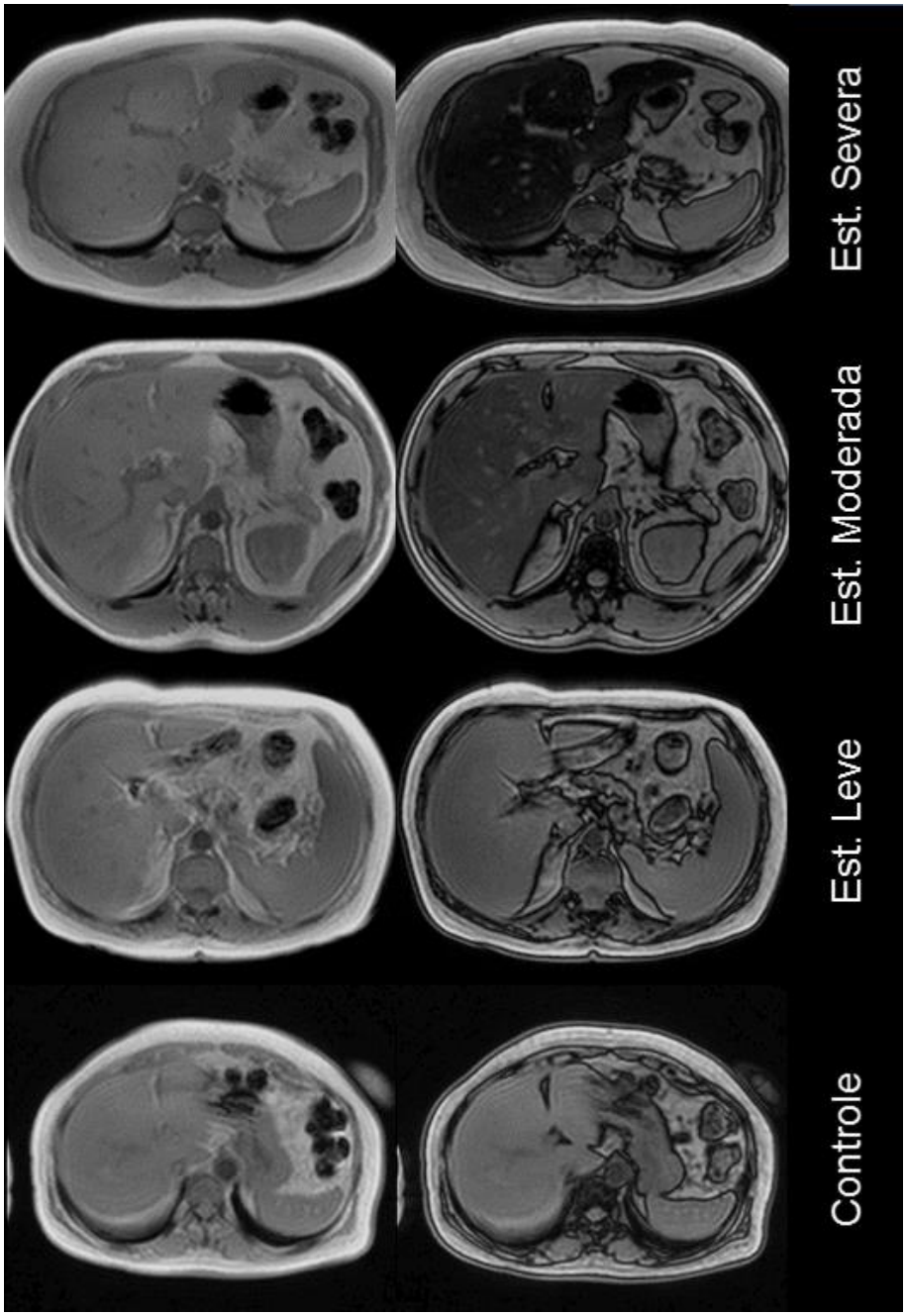

Figura 35 - Imagens IP (coluna da esquerda) e OP (coluna da direita) representativas obtidas no fígado de pacientes dos diferentes grupos avaliados (controle, esteatose leve, moderada e severa).

Fonte: Elaborada pela autora.

Analisando o caso do controle, por exemplo, percebe-se que o tecido hepático apresenta intensidade sinal muito similar em ambas as imagens. Isso ocorre devido ao fato de que com um baixo percentual de gordura no tecido, as imagens IP e OP são equivalentes entre si e a diferença de sinal depende, principalmente, dos efeitos de relaxação presentes devido aos diferentes TEs usados na aquisição de ambas as imagens.

Já quando uma alta quantidade de gordura está presente no fígado, como é o caso dos dados mostrados na primeira fileira da figura 35, o sinal do tecido hepático na imagem OP é muito menor que o obtido na imagem IP. Conforme já discutido anteriormente, isso ocorre pois em um dos casos, o IP, ambas as componentes de sinais (água e gordura) estão em fase e se somam para compor a intensidade final da imagem, enquanto na outra condição, a OP, esses mesmos sinais estão com defasagem de 180º e, portanto, a intensidade final da imagem é proporcional à diferença entre eles. Em um caso extremo em que um determinado tecido hepático apresentasse composição igualmente distribuída entre água e gordura, ou seja 50% de cada um dos constituintes, o sinal OP, considerando nosso modelo simplificado, tenderia para zero.

Como já mencionado, a quantificação de gordura por imagens foi realizada utilizando dados adquiridos com três protocolos distintos: duplo, triplo e multieco. O primeiro conjunto de dados é avaliado fazendo-se uso de um modelo bastante simplificado, sem considerar os efeitos de relaxação. O segundo foi avaliado utilizando uma correção para os efeitos de relaxação com apenas dois pontos em sua estimativa. Já para o terceiro conjunto de dados, múltiplos pontos são utilizados para realizar a estimativa dos efeitos de relaxação e uma correção mais precisa para o decaimento determinado por T_2^* pode ser realizada.

Inicialmente, uma avaliação exploratória foi realizada sobre os dados obtidos utilizando RM (MRS e MRI) para verificar a distribuição e características estatísticas dos mesmos. O intuito dessa análise inicial era de determinar a forma e os testes mais apropriados para avaliação estatística desses dados.

A figura 36 mostra gráficos de probabilidade normal dos dados obtidos para cada uma das modalidades de RM. Nota-se claramente um desvio de todos os conjuntos de dados da linha tracejada, que representa uma distribuição normal. Isso ocorre mais acentuadamente para dados que representam valores menores de gordura hepática. Em todos os casos, foram obtidos valores de $p < 5\text{x}10^{-5}$, permitindo concluir que estatisticamente nenhum dos dados segue uma distribuição normal.

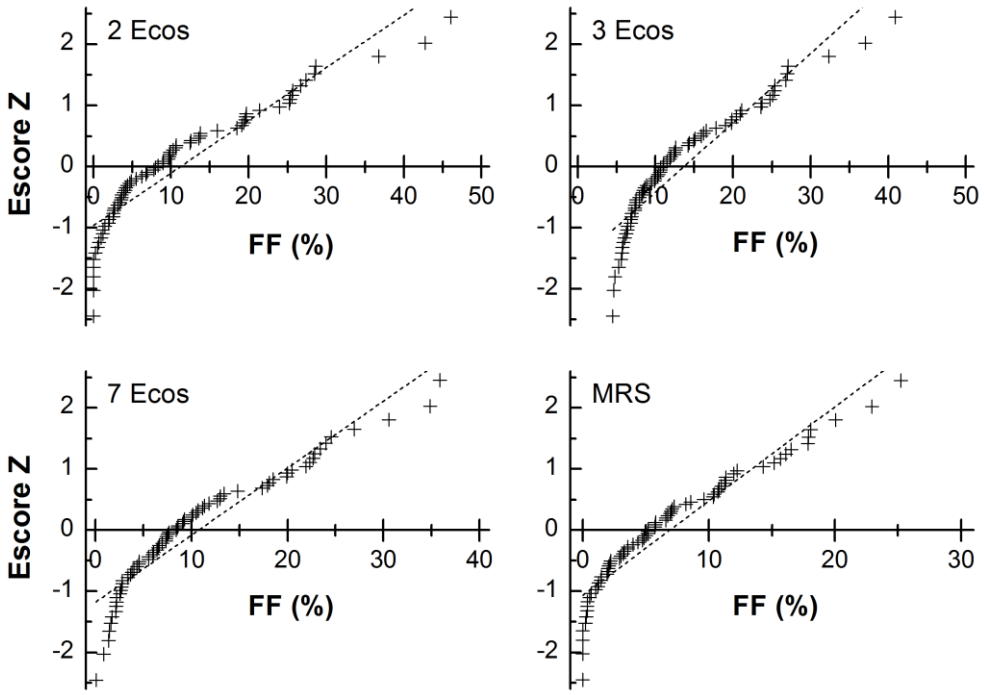

Figura 36 - Distribuição dos dados obtidos utilizando técnicas de RM. A linha tracejada representa uma distribuição normal dos dados.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como a análise dos dados revelou uma distribuição não normal, as correlações entre os dados de biópsia e as quantificações obtidas utilizando RM foram realizadas utilizando a correlação de Spearman. Nesse caso, considera-se uma relação monotônica entre os dados; isso quer dizer que os dados apresentam uma relação entre si, mas não, necessariamente, a uma taxa constante.

A figura 37 mostra a dispersão dos dados obtidos através da quantificação de gordura utilizando MRS em relação ao padrão-ouro (biópsia hepática). É possível notar claramente uma relação linear positiva entre ambas as variáveis avaliadas, o que revela que os valores obtidos de maneira não invasiva estão de acordo com aquilo observado invasivamente. A elipse traçada mostra o limite de 95% de precisão na estimativa do coeficiente de correlação.

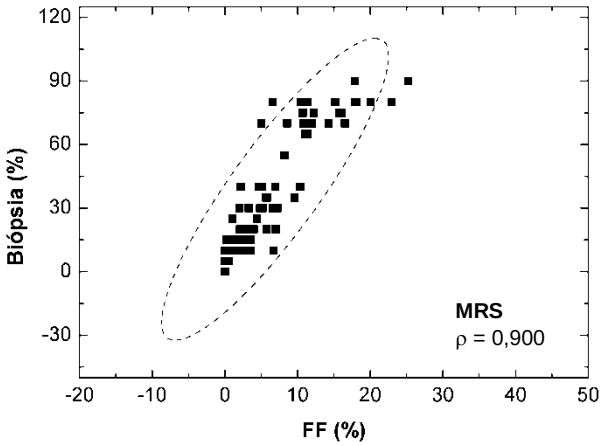

Figura 37 - Correlação entre os dados de fração de gordura hepática obtida com biósia hepática e MRS. O coeficiente de correlação Spearman (ρ) está listado no próprio gráfico.

Fonte: Elaborada pela autora.

De maneira mais quantitativa, podemos avaliar o coeficiente de correlação Spearman (ρ). Para o caso da MRS, o valor obtido foi de 0,900 ($p < 0,05$) o que mostra uma forte correlação positiva entre os dados avaliados.

Em particular, é interessante notar que alguns poucos pontos (4 no caso específico dos dados de MRS) se encontram fora da elipse estimada. Isso mostra uma variabilidade nesses pontos maior do que o limiar estabelecido como significativo. Nesse caso, essa maior variabilidade sugere que a correlação entre biópsia hepática e MRS é maior para a avaliação de esteatose leve e moderada do que pra esteatose severa, uma vez que essa dispersão só foi encontrada nos dados de pacientes com o maior grau de esteatose.

Esse mesmo comportamento foi encontrado no caso das análises realizadas nos dados de MRI, conforme se pode ver na figura 38. Muito embora isso pudesse sugerir uma deficiência das técnicas de RM na avaliação desses pacientes, o baixo número de casos detectados e os altos coeficientes de correlação estimados demonstram que a técnica fornece informação equivalente à obtida de maneira invasiva sem maiores prejuízos ao paciente.

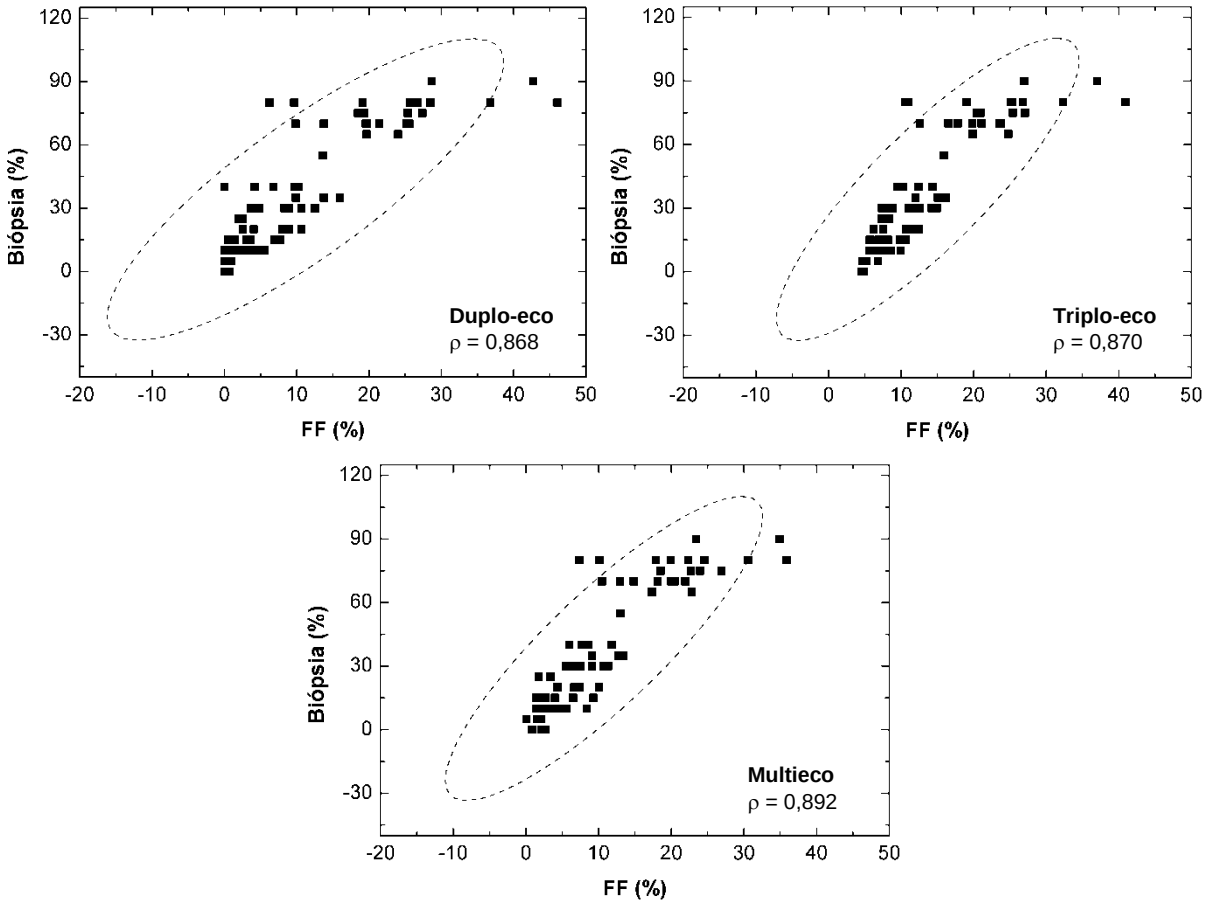

Figura 38 - Correlação entre os dados de fração de gordura hepática obtida com biósia hepática e MRI (duplo-eco, triplo-eco e multieco). O coeficiente de correlação Spearman (ρ) obtido em cada um dos casos está listado no respectivo gráfico.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os dados de MRI também apresentaram alto grau de correlação positiva com a informação obtida através da biópsia hepática. Para a avaliação utilizando a técnica duplo-eco, $\rho = 0{,}868$ ($p < 0{,}05$), para a triplo-eco, $\rho = 0{,}870$ ($p < 0{,}05$) e para a multieco, $\rho = 0{,}892$ ($p < 0{,}05$). Muito embora os coeficientes de correlação apresentem ligeiras variações entre os diferentes conjuntos de dados, considerando os limiares estatísticos, esses valores não apresentam diferença significativa.

Considerando todos os dados obtidos de forma não invasiva, uma correlação mínima de 87% foi encontrada quando confrontados com os dados de biópsia, demonstrando o potencial da RM para quantificação de gordura hepática. Outro ponto importante a ser considerado é o fato de que as aquisições que deram origem aos dados avaliados foram realizadas em ambiente clínico, com protocolos compatíveis com essa aplicação. Isso é um ponto crucial em nossa análise que sugere que qualquer serviço de radiologia pode se beneficiar deste método não

invasivo para avaliação dos percentuais de gordura de seus pacientes, com alto grau de confiabilidade.

A mediana da fração de gordura para cada um dos métodos de RM avaliados foi determinada para os diferentes graus de esteatose, determinado pela biópsia hepática (tabela 5). Considerando as diferentes abordagens não invasivas, os valores obtidos para a fração de gordura variaram de 2,9 a 7,9 para esteatose leve, 5,4 a 11,1 para moderada e 14,3 a 25,2 para severa. Dentre as diferentes aquisições de RM, a MRS forneceu os menores valores para a fração de gordura em todos os casos enquanto a técnica triplo-eco tende a fornecer o maior valor. A exceção foi para o caso da avaliação de pacientes com esteatose severa, em que a fração de gordura mediana obtida pela técnica duplo-eco foi ligeiramente superior ao valor da triplo-eco.

Tabela 5 - Medianas obtidas para os diferentes graus de esteatose, determinados pela biópsia, para as medidas feitas utilizando as diferentes técnicas de RM. IQR: intervalo interquartil.

	Grau de Esteatose		
	Leve	**Moderada**	**Severa**
Mediana (IQR) Duplo-eco	3,6 (5,2)	8,3 (13,3)	25,2 (8,3)
Mediana (IQR) Triplo-eco	7,9 (3,8)	11,1 (9,5)	23,6 (7,8)
Mediana (IQR) Multieco	5,5 (4,6)	8,6 (10,5)	20,5 (6,1)
Mediana (IQR) MRS	2,9 (3,6)	5,4 (8,4)	14,3 (7,0)

Fonte: Elaborada pela autora.

Essa comparação entre os valores estimados pelas diferentes técnicas de RM pode ser melhor visualizada na figura 39. Nota-se que a técnica duplo-eco é aquela que apresenta, para todos os grupos de pacientes, o maior intervalo interquartil (IQR). Por outro lado, a MRS é a que apresenta, na maior parte dos casos, o menor IQR.

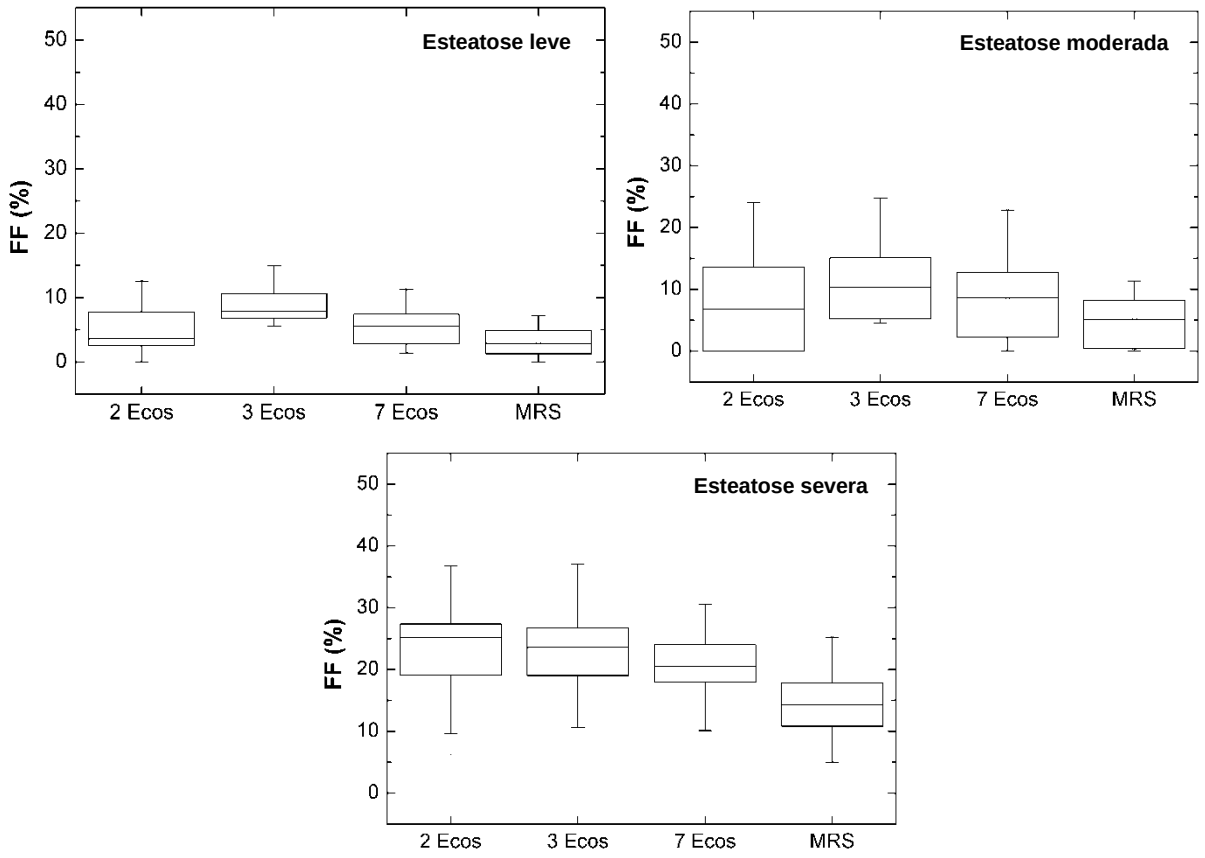

Figura 39 - Fração de gordura estimada pelos diferentes métodos de RM para cada um dos grupos de pacientes avaliado.

Fonte: Elaborada pela autora.

Conforme mencionado anteriormente, os valores absolutos da fração de gordura obtidos utilizando RM não são diretamente comparáveis com aqueles obtidos pela biópsia, uma vez que as grandezas são estimadas a partir de abordagens conceitualmente diferentes. Quando olhamos exclusivamente para os dados de RM, entretanto, as estimativas são feitas utilizando os mesmos conceitos, o que, em princípio, deveria resultar em valores equivalentes entre si. Entretanto, nossos dados revelam que existe uma variação.

Particularmente no caso de MRI, muito embora o modelo teórico utilizado seja o mesmo, as estimativas são feitas a partir de correções (ou ausência de correção, como no caso da duplo-eco) para efeitos que sabidamente comprometem a adequada quantificação da fração de gordura, como é o caso da relaxação transversal, de maneira distinta.

A duplo-eco, método mais simplificado, negligencia os efeitos do tempo de relaxação transversal e assume que a diferença entre as imagens em fase (IP) e

fora de fase (OP) são devidas, unicamente, as frequências de cada uma das componentes (água e gordura). Uma ocorrência comum, já relatada em outros estudos e percebida no trabalho, é o fato que o decaimento T_2^* faz com que a intensidade de sinal do último eco seja inferior à intensidade do primeiro eco. Portanto, quando a imagem IP é adquirida por último, ao calcular a fração de gordura, pode-se encontrar valores negativos (espúrios) ou valores subestimados. Isso pode explicar a maior dispersão observada nos dados obtidos com essa técnica.

Considerando a técnica triplo eco, já é possível realizar correção para o tempo de relaxação T_2^* a partir das duas imagens adquiridas em fase (IP). Escolhe-se as imagens em fase pois a estimativa de taxa de relaxação a partir de imagens OP pode não fornecer valores confiáveis para altos valores de gordura, já que há uma anulação do sinal quase que completa. Apesar de não significativo estatisticamente, o resultado apresentado pela triplo-eco se mostra ligeiramente mais elevado na maioria dos casos, o que pode representar uma superestimação da fração de gordura intra-hepática. Isso já foi reportado anteriormente, primeira por Hussain (103) em análises de phantoms (padrão de comparação foi MRS), e posteriormente Irwan (104), aplicando a técnica em humanos, comparando os dados de MRI com biópsia. No entanto, ambos têm distintas explicações para o ocorrido: o primeiro afirma que os valores superestimados surgem devido aos diferentes tempos de relaxação entre a água e a gordura, e o segundo afirma que ocorrem devido a efeitos de T_1. Uma explicação alternativa considera o fato de que dois pontos não fornecem o melhor ajuste para o decaimento monoexponencial, podendo introduzir erros sistemáticos na quantificação, o que aponta para um melhor desempenho da técnica multieco.

Como já mencionado, a abordagem multieco também permite correções para o tempo de relaxação transversal T_2^*. Nesse caso, entretanto, pode-se utilizar mais pontos para tentar melhorar a estimativa do decaimento exponencial, o que representa uma vantagem quando comparada com a triplo-eco. Com base nisso, o modelo mais completo, e que deveria fornecer valores mais próximos do valor real da gordura presente no tecido hepático, deveria ser privilegiado. Ou seja, olhando apenas sob essa perspectiva, a técnica multieco deveria ser a escolhida para avaliação da gordura hepática em ambientes clínicos. Entretanto, os dados de correlação revelam que todas as técnicas fornecem informações equivalentes quando comparados com a biópsia. Sob essa perspectiva, o efeito dos tempos de

relaxação, muito embora críticos para uma adequada quantificação, podem ser desconsiderados para uma avaliação semiquantitativa da gordura hepática, o que poderia ser suficiente para avaliações longitudinais de pacientes em tratamento. Além disso, o modelo adotado no presente trabalho ainda não é o mais completo e isso foi feito, novamente, no sentido de simplificar o processo considerando a perspectiva de aplicação em ambiente clínico. Em nosso caso, assumimos um único decaimento para a água e a gordura, além de não considerar o sinal da gordura como um somatório dependente das frequências cada uma de suas componentes, similar ao feito com os dados de MRS.

Ainda no que se refere aos efeitos de relaxação, os protocolos de aquisição foram ajustados para minimizar o efeito de T_1 o que poderia levar a uma subestimação dos valores de fração de gordura hepática. No caso das imagens, isso foi feito ajustando os tempos de repetição da sequência em combinação com os ângulos de *flip* usados para aquisição. No caso da MRS, entretanto, esse ajuste foi feito exclusivamente aumentando o TR. Para tornar o protocolo viável para aquisição em ambiente clínico, esse aumento foi realizado levando em conta o compromisso com o tempo total do exame e o valor utilizado pode não ser suficiente para eliminar completamente essa contribuição. Isso poderia justificar o fato de todos os resultados obtidos com MRS serem menores do que os obtidos com MRI.

Quando consideramos nossos dados de MRI, é importante mencionar uma limitação inerente ao método IP/OP. Quando são usadas apenas imagens de magnitude, como é nosso caso, existe uma ambiguidade no que se refere à quantificação de frações de gordura acima de 50%. Nas imagens OP, a intensidade do sinal se mantem a mesma, por exemplo, quando há 30% de gordura e 70% de água ou 70% de gordura e 30% de água. Assim, para tecidos que sejam compostos predominantemente por gordura, o método utilizando apenas imagens de magnitude não é o mais recomendado. Existem técnicas adicionais que contornam essa limitação, como a supressão da gordura, para determinação sem ambiguidade do conteúdo de água, ou que fazem uso de informações antes não utilizadas como as relativas à fase da imagem. Nesse trabalho não houve ocorrências de pacientes com infiltração de gordura hepática superior à 50%, e, clinicamente falando, dificilmente são encontrados esses pacientes.

Quando comparamos os dados de MRI com MRS, as diferenças mais significativas podem, também, ser explicadas pois as estimativas são feitas

considerando modelos físicos distintos. No caso da espectroscopia, todos os picos da gordura são incluídos na avaliação, enquanto para o caso de imagens, consideramos apenas uma componente. Essa simplificação no modelo utilizado para as imagens foi adotada no sentido de simplificar o processamento proposto para ambientes clínicos, mas pode incorrer em erros para a quantificação absoluta. Nesse aspecto, os dados de MRS são mais representativos do valor real da quantidade de gordura presente no parênquima hepático.

Por outro lado, as aquisições de MRS utilizadas no presente trabalho foram feitas com respiração livre. Isso significa que cada codificação foi realizada em uma posição ligeiramente diferente do fígado. Isso pode gerar efeitos indesejados nos dados finais, como alargamento das linhas do espectro, por exemplo, que, dificilmente, podem ser corrigidos. Isso compromete a avaliação quantitativa dos dados de uma maneira imprevisível. Situação pior pode ocorrer se, durante o ciclo respiratório, ocorrer de a informação ser coletada de regiões em que estejam presentes algum dos grandes vasos hepáticos. Isso comprometeria totalmente a avaliação e, devido às características da própria aquisição dos dados de MRS, seria impossível prever tal acontecimento antes do efetivo processamento dos dados. No presente trabalho, nenhum dado precisou ser descartado por baixa qualidade nos dados espectroscópicos, mas as aquisições foram acompanhadas por técnicos com alto grau de treinamento em aquisição de MRS, o que não é regra em serviços de radiologia. Por essa razão, a MRS deve ser analisada com muito critério quando a ideia é a utilização em ambientes clínicos.

Para auxiliar na avaliação dos diferentes métodos, curvas ROC foram construídas com intuito de avaliar a sensibilidade e especificidade de cada um dos classificadores de esteatose para os diferentes graus da doença (figuras 40, 41 e 42).

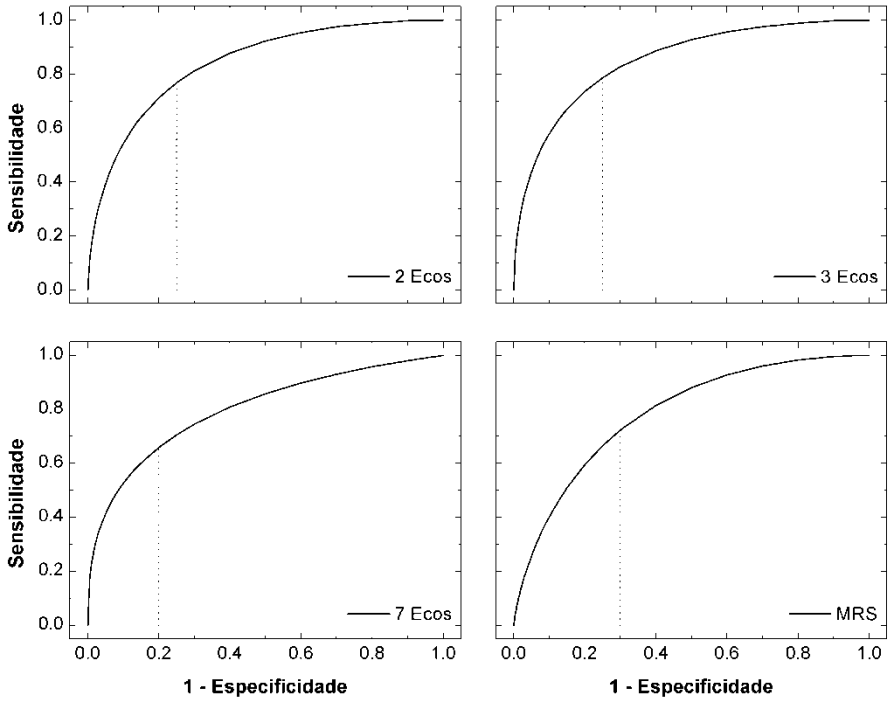

Figura 40 - Performance diagnóstica para esteatose leve das sequências de MRI e MRS utilizando histopatologia como referência. A linha pontilhada mostra o valor de corte para especificidade e sensibilidade estimado.

Fonte: Elaborada pela autora.

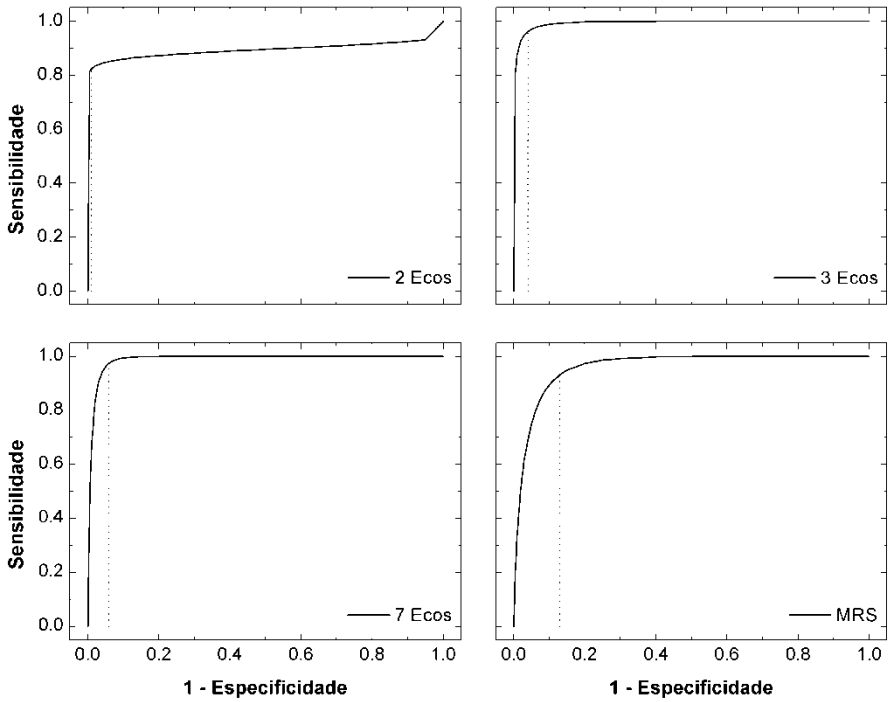

Figura 41 - Performance diagnóstica para esteatose moderada das sequências de MRI e MRS utilizando histopatologia como referência. A linha pontilhada mostra o valor de corte para especificidade e sensibilidade estimado.

Fonte: Elaborada pela autora.

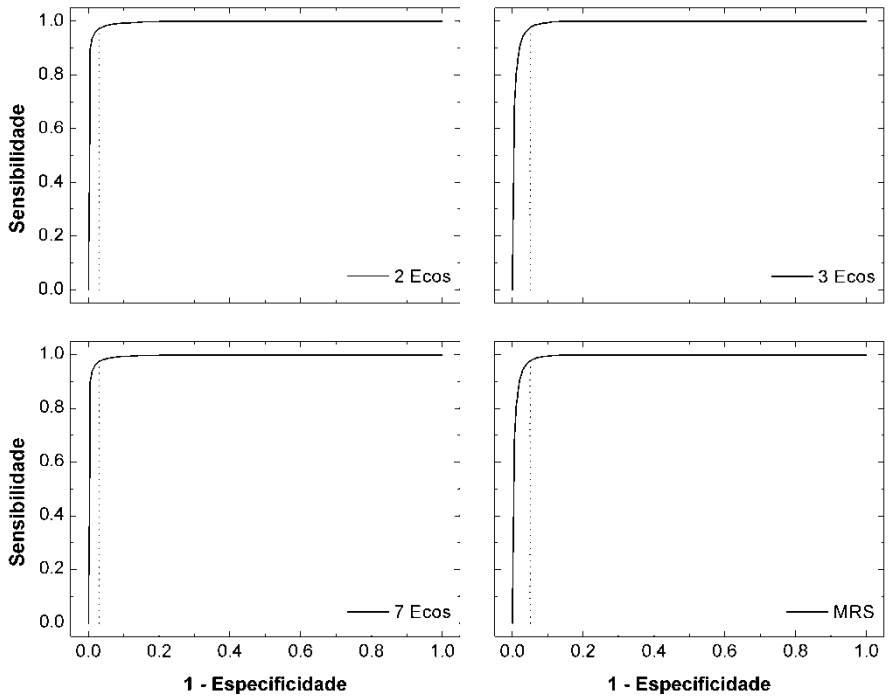

Figura 42 - Performance diagnóstica para esteatose severa das sequências de MRI e MRS utilizando histopatologia como referência. A linha pontilhada mostra o valor de corte para especificidade e sensibilidade estimado.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os valores de sensibilidade, especificidade e área sob a curva (AUC, do inglês *area under the curve*) para as diferentes técnicas avaliadas estão mostradas na tabela 6. As curvas ROC foram comparadas duas a duas e nenhuma significância estatística foi encontrada em nenhum dos casos ($p > 0,16$).

É possível notar pela figura 40 e pelos dados da tabela 6 que a performance diagnóstica de todos os métodos no caso de esteatose leve não pode ser considerado satisfatório, com sensibilidade máxima menor que 78%, especificidade máxima abaixo de 70% e probabilidade de diagnóstico correto menor que 85%. É preciso, entretanto, lembrar que devido ao desenho do experimento e da necessidade de se avaliar todos os sujeitos através da biópsia hepática, o número de controles no estudo acabou sendo muito baixo, o que compromete a análise estatística. Isso é particularmente crítico na avaliação do grupo com esteatose leve, em que a diferenciação é mais tênue. Dessa forma, muito embora os dados possam sugerir uma menor eficiência em termos de performance diagnóstica dos métodos não invasivos para avaliação da gordura hepática, esse resultado deve ser

interpretado com cautela e mais dados são necessários para corroborar esse achado.

Tabela 6 - Performance diagnóstica para esteatose das sequências de MRI e MRS utilizando histopatologia como referência. AUC: área sob a curva.

	Grau de Esteatose		
	Leve	**Moderada**	**Severa**
Duplo-eco			
Sensibilidade	0.768	0.824	0.974
Especificidade	0.750	0.990	0.970
AUC	0.840	0.894	0.997
Triplo-eco			
Sensibilidade	0.787	0.962	0.978
Especificidade	0.750	0.960	0.950
AUC	0.851	0.994	0.992
Multieco			
Sensibilidade	0.659	0.975	0.975
Especificidade	0.800	0.940	0.970
AUC	0.800	0.988	0.997
MRS			
Sensibilidade	0.724	0.932	0.978
Especificidade	0.700	0.870	0.950
AUC	0.784	0.960	0.992

Fonte: Elaborada pela autora.

Já para os pacientes com esteatose moderada ou severa, as curvas ROC demonstraram uma alta performance diagnóstica para todos os métodos. Muito embora os valores de especificidade e sensibilidade, assim como da AUC, apresentem pequenas variações, nenhuma foi significativa a ponto de privilegiar um determinado método.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A esteatose hepática não alcoólica se caracteriza pelo acúmulo excessivo de gordura nas células do fígado em indivíduos que consomem pouco ou não consomem bebidas alcóolicas. Sua prevalência está associada à obesidade e resistência à insulina e vem aumentando a nível global, com expectativa de se tornar a doença crônica hepática de maior predominância em várias partes do mundo. Apesar de ser considerada uma doença benigna, a esteatose pode evoluir para doenças mais graves como cirrose, fibrose avançada, esteato hepatite (com ou sem fibrose) ou carcinoma. Entretanto, é potencialmente reversível, mesmo em quadros mais graves, o que reforça a urgência de se desenvolver métodos confiáveis para detecção e avaliação, inclusive ao longo de tratamento, do quadro clínico da NAFLD.

No presente estudo foram realizadas comparações de diversas técnicas não invasivas de quantificação da fração de gordura hepática, incluindo MRS, MRI duplo-eco, MRI triplo-eco, MRI multieco, utilizando a biópsia como padrão de referência. Foram avaliados pacientes portadores de diabetes tipo II, que apresentam alta prevalência de esteatose hepática não alcoólica, além de grande variabilidade nos percentuais de gordura. Em nosso estudo, 64 pacientes apresentaram acúmulo de gordura hepática acima do valor de corte de 5%, determinado pela biópsia hepática, o que representa 91% da população observada, confirmando a esperada alta prevalência da doença em diabéticos. Essa alta prevalência, associada ao desenho experimental do estudo impuseram uma limitação ao mesmo. A necessidade de se incluir apenas pacientes com indicação para biópsia hepática fez com que o número de controles avaliados fosse bastante reduzido, impactando, em alguns casos, as análises estatísticas.

Conforme mencionado, as análises baseadas em RM e histologia são fundamentalmente diferentes e quantificam a gordura hepática utilizando métricas muito distintas, o que impossibilita a comparação direta dos valores absolutos obtidos em cada uma das técnicas. Por essa razão, foram utilizadas análises de correlação para avaliar a consistência entre as informações obtidas. Todos os métodos avaliados apresentaram alto grau de correlação positiva (> 87%) com os dados obtidos de maneira invasiva, o que revela que os valores obtidos utilizando RM estão de acordo com aquilo observado pela biópsia hepática. Considerando que

todas as aquisições foram realizadas em ambiente clínico, com protocolos compatíveis com essa aplicação, nossos resultados sugerem que qualquer serviço de radiologia poderia se beneficiar deste método não invasivo para avaliação dos percentuais de gordura de seus pacientes.

A avaliação da gordura hepática utilizando RM exige uma série de cuidados no que se refere ao estabelecimento dos protocolos de aquisição e processamento de modo a minimizar o efeito de fatores confundidores que possam comprometer a análise adequada. Vários desses pontos foram endereçados no presente trabalho, com ênfase para os efeitos dos tempos de relaxação. Entretanto, é sempre importante lembrar que tudo isso foi feito mantendo o foco em nosso objetivo principal que era avaliar o potencial da técnica para aplicação em ambientes clínicos. Sob essas condições, as análises estatísticas mostraram que as diferentes técnicas (MRI e MRS) são equivalentes e potenciais candidatas para substituir a biópsia hepática de maneira não invasiva. Entretanto, entre elas e considerando as condições experimentais utilizadas, é difícil dizer qual seria a melhor opção apenas com base na estatística.

Se considerarmos apenas o modelo utilizado para processamento dos sinais, a MRS apresenta vantagens com relação a MRI, uma vez que um modelo mais complexo e realista da gordura foi adotado na avaliação. Entretanto, quando se considera as complicações associadas à aquisição dos dados, bem como todo o potencial de comprometimento na qualidade dos mesmos se a aquisição não for realizada por um profissional especialista na área, nota-se que essa decisão não deve ser tomada sem maiores reflexões. Além disso, o processamento desses dados também não é trivial nem prático, o que, mais uma vez, se revela desfavorável para aplicação em ambientes clínicos convencionais. Fora esses aspectos técnicos, é importante lembrar que uma das maiores críticas à biópsia hepática, além do fato de ser invasiva, é a questão de ser pontual, o que pode comprometer a avaliação de fígados de pacientes que possuam esteatose focal. Esse mesmo problema ocorre com a MRS, cujos dados são obtidos a partir de um voxel posicionado em uma única região do fígado. Abordagens multivoxel podem ser interessantes para tentar solucionar esse problema, mas, até o presente momento, a dificuldade na implementação e execução desses protocolos limita a aplicação para medidas robustas de gordura hepática.

Com base nisso, acreditamos que uma abordagem utilizando imagens por RM é mais interessante para utilização em ambientes clínicos, permitindo, inclusive, que uma avaliação global do parênquima hepático seja feita. Novamente, os dados estatísticos nos impedem de decidir, apenas com base em nossas análises objetivas, qual seria a melhor opção. Um ponto importante é que mesmo o protocolo mais simples, que seria o denominado duplo-eco, é capaz de fornecer informações que já podem ser suficientes para diagnóstico ou avaliação longitudinal de pacientes com esteatose. Nesse caso, é utilizado um protocolo bastante simples e o processamento poderia ser feito em qualquer estação de trabalho fornecida pelo próprio fabricante do equipamento de RM. Essa abordagem, definitivamente, encontraria aplicação em qualquer serviço básico de radiologia e já traria informação adicional à avaliação normalmente realizada pelo radiologista, que se foca, exclusivamente em observação visual.

Entretanto, no sentido de evoluir para dados efetivamente quantitativos, é importante migrar para protocolos mais complexos de aquisição e processamento. E nesse sentido, nossa sugestão seria, de fato, a utilização de uma técnica multieco. No presente trabalho, testamos um modelo ainda simplificado para o processamento desses dados em que assumimos um único decaimento para a água e a gordura, além de não considerar o sinal da gordura como um somatório dependente das frequências cada uma de suas componentes, similar ao feito com os dados de MRS. Essa estratégia foi adotada pois, apesar de mais complexa, sua realização não demanda ferramentas específicas para realização e poderia ser feita em qualquer computador com softwares básicos e gratuitos. Muito embora esse método não seja, ainda, o mais recomendado caso uma quantificação seja necessária, nossos dados sugerem grande potencial e acurácia no diagnóstico da esteatose.

Além disso, considerando as perspectivas futuras de nosso grupo, pretendemos desenvolver uma ferramenta independente que realize a quantificação da gordura hepática utilizando dados de MRI. Para que o modelo completo possa ser utilizado, é importante que o maior número de pontos temporais seja adquirido, o que minimiza a chance de erros nas estimativas dos parâmetros necessários para uma quantificação adequada. Nesse sentido, e considerando que existe a perspectiva de desenvolvimento de uma ferramenta que possa ser distribuída livremente para qualquer clínica ou pesquisador interessado, nossa conclusão é de que uma implementação multieco tem vantagens frente às concorrentes quando o

enfoque é a quantificação da gordura e não apenas uma avaliação qualitativa ou semiquantitativa.

Em suma, nossos dados sugerem que a RM se apresenta, de fato, como uma excelente candidata para avaliar, de forma não invasiva, a fração de gordura hepática, mesmo quando se considera as limitações impostas por um ambiente clínico convencional. Nesses casos, limitações como tempo máximo de exame e qualificação técnica dos operadores restringem os protocolos àqueles mais rápidos e bem menos elaborados. Após avaliarmos dados adquiridos nessas condições com protocolos montados de maneira simples chegamos à conclusão que as informações obtidas, ainda que com protocolos de processamento também bastante simplistas, são equivalentes àquelas obtidas pela biópsia. Isso sugere que essas novas metodologias podem começar a migrar para ambientes clínicos sem depender das sequências complexas e dos processamentos exóticos que estão descritos na literatura mais atual.

REFERÊNCIAS

1 RINELLA, M. E. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. **Journal of the American Medical Association,** v. 313, n. 22, p. 2263-2273, June 2015.

2 SANYAL, A. J. AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology,** v. 123, n. 5, p. 1705-1725, Nov. 2002.

3 MCCULLOUGH, A. J. The clinical features, diagnosis and natural history of nonalcoholic fatty liver disease. **Clinical Liver Disease** v. 8, n. 3, p. 521-533, Aug. 2004.

4 ANGULO, P. Nonalcoholic fatty liver disease. **New England Journal of Medicine,** v. 346, n. 16, p. 1221-1231, Apr. 2002.

5 MOFRAD, P. S.; SANYAL, A. J. Nonalcoholic fatty liver disease. **Medscape General Medicine,** v. 5, n. 2, p. 14, Apr. 2003.

6 LOOMBA, R.; SANYAL, A. J. The global NAFLD epidemic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology,** v. 10, n. 11, p. 686-690, Nov. 2013.

7 BLACHIER, M.et al. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. **Journal of Hepatology,** v. 58, n. 3, p. 593-608, Mar. 2013.

8 VERNON, G.; BARANOVA, A.; YOUNOSSI, Z. M. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics,** v. 34, n. 3, p. 274-285, Aug. 2011.

9 COTRIM, H. P.et al. Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. Clinical and histological profile. **Annals of Hepatology,** v. 10, n. 1, p. 33-37, Jan-Mar. 2011.

10 LUPSOR, M.; BADEA, R. Imaging diagnosis and quantification of hepatic steatosis: is it an accepted alternative to needle biopsy? **Romanian Journal of Gastroenterology,** v. 14, n. 4, p. 419-425, Dec. 2005.

11 ADAMS, L. A.; ANGULO, P. Treatment of non-alcoholic fatty liver disease. **Postgraduate Medical Journal,** v. 82, n. 967, p. 315-322, May 2006.

12 FEDERICO, A.; TRAPPOLIERE, M.; LOGUERCIO, C. Treatment of patients with non-alcoholic fatty liver disease: current views and perspectives. **Digestive and Liver Disease,** v. 38, n. 11, p. 789-801, Nov. 2006.

13 ANGULO, P. Treatment of nonalcoholic fatty liver disease. **Annals of Hepatology,** v. 1, n. 1, p. 12-9, Jan-Mar. 2002.

14 REEDER, S. B.et al. Quantitative assessment of liver fat with magnetic resonance imaging and spectroscopy. **Journal of Magnetic Resonance Imaging,** v. 34, n. 4, p. 729-749, Oct. 2011.

15 ZHANG, T. S.et al. Global publication trends and research hotspots of nonalcoholic fatty liver disease: a bibliometric analysis and systematic review. **Springerplus,** v. 4, p. 776, 2015.

16 HAMER, O. W.et al. Fatty liver: imaging patterns and pitfalls. **Radiographics,** v. 26, n. 6, p. 1637-1653, Nov-Dec. 2006.

17 VUPPALANCHI, R.; CHALASANI, N. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: Selected practical issues in their evaluation and management. **Hepatology,** v. 49, n. 1, p. 306-317, Jan. 2009.

18 SCHWENZER, N. F.et al. Non-invasive assessment and quantification of liver steatosis by ultrasound, computed tomography and magnetic resonance. **Journal of Hepatology,** v. 51, n. 3, p. 433-445, Sep. 2009.

19 SPRINGER, F.et al. Liver fat content determined by magnetic resonance imaging and spectroscopy. **World Journal of Gastroenterology,** v. 16, n. 13, p. 1560-6, Apr. 2010.

20 YOKOO, T.et al. Nonalcoholic fatty liver disease: diagnostic and fat-grading accuracy of low-flip-angle multiecho gradient-recalled-echo MR imaging at 1.5 T. **Radiology,** v. 251, n. 1, p. 67-76, Apr. 2009.

21 DOOLEY, J.et al. **Sherlock's diseases of the liver and biliary system**. 12th ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2011.

22 RUTKAUSKAS, S.et al. Clinical and anatomical basis for the classification of the structural parts of liver. **Medicina** (Kaunas)**,** v. 42, n. 2, p. 98-106, 2006.

23 WEBMD. 2016. Disponível em: <http://www.webmd.com/>. Acesso em: 20 jan. 2016.

24 NUNES, P. P.; MOREIRA, A. L. **Fisiologia hepática.** Porto: Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 2007. Disponível em: <http://www.doencasdofigado.com.br/fisiologia%20hepatica.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2015.

25 FURUTA, T.et al. Hepatic segments and vasculature: projecting CT anatomy onto angiograms. **Radiographics,** v. 29, n. 7, p. 1-22, Nov. 2009.

26 SIBULESKY, L. Normal liver anatomy. **Clinical Liver Disease,** v. 2, p. S1-S3, 2013.

27 REDDY, J. K.; RAO, M. S. Lipid metabolism and liver inflammation. II. fatty liver disease and fatty acid oxidation. **American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology,** v. 290, n. 5, p. G852-G858, May 2006.

28 LOUVET, A.; MATHURIN, P. Alcoholic liver disease: mechanisms of injury and targeted treatment. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology,** v. 12, n. 4, p. 231-242, Apr. 2015.

29 MINCIS, M.; MINCIS, R. Doença hepática alcoólica. **Revista Brasileira de Medicina,** v. 62, n. 10, p. 427-433, jun. 2005.

30 MINCIS, M.; MINCIS, R. Esteatose e esteato-hepatite não alcoólicas. **Revista Brasileira de Medicina,** v. 63, n. 11, p. 564-570, 2006.

31 CONTOS, M. J.; SANYAL, A. J. The clinicopathologic spectrum and management of nonalcoholic fatty liver disease. **Advances in Anatomic Pathology,** v. 9, n. 1, p. 37-51, Jan. 2002.

32 MOFRAD, P.et al. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. **Hepatology,** v. 37, n. 6, p. 1286-92, June 2003.

33 MARQUEZINE, G. F.; MANCINI, M. Diabetes mellitus. **Revista Brasileira de Medicina,** v. 65, n. 1/2, p. 5-12, 2008.

34 MANCINI, M.; MEDEIROS, M. M. A. Diabetes mellitus. **Revista Brasileira de Medicina,** v. 62, n. 4, p. 115-126, 2005.

35 LAS CASAS, F. R. et al. Avaliação do risco coronário: importância das apolipoproteínas. **Revista Brasileira de Medicina,** v. 64, n. 4, p. 182-189, 2006.

36 FRITH, J.et al. Non-alcoholic fatty liver disease in older people. **Gerontology,** v. 55, n. 6, p. 607-613, Nov. 2009.

37 ROMEO, S. et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. **Nature Genetics,** v. 40, n. 12, p. 1461-1465, Dec. 2008.

38 KALLWITZ, E. R.et al. Ethnicity and nonalcoholic fatty liver disease in an obesity clinic: the impact of triglycerides. **Digestive Diseases and Sciences,** v. 53, n. 5, p. 1358-1363, May 2008.

39 SANYAL, A. J. et al. Nonalcoholic fatty liver disease in patients with hepatitis C is associated with features of the metabolic syndrome. **The American Journal of Gastroenterology** v. 98, n. 9, p. 2064-2071, Sep. 2003.

40 BASARAN, C. et al. Fat-containing lesions of the liver: cross-sectional imaging findings with emphasis on MRI. **American Journal of Roentgenology,** v. 184, n. 4, p. 1103-1110, Apr. 2005.

41 DECARIE, P. O.et al. Fatty liver deposition and sparing: a pictorial review. **Insights into Imaging,** v. 2, n. 5, p. 533-538, Oct. 2011.

42 KARCAALTINCABA, M.; AKHAN, O. Imaging of hepatic steatosis and fatty sparing. **European Journal of Radiology,** v. 61, n. 1, p. 33-43, Jan. 2007.

43 SODER, R. B.; BALDISSEROTTO, M. Esteatose hepática na obesidade infantil: investigação por imagem. **Scientia Medica,** v. 19, p. 4, p.202-208, out-dez. 2009.

44 SATKUNASINGHAM, J.et al. Liver fat quantification: comparison of dual-echo and triple-echo chemical shift MRI to MR spectroscopy. **European Journal of Radiology,** v. 84, n. 8, p. 1452-1458, Aug. 2015.

45 MACHADO, M. V.; CORTEZ-PINTO, H. Non-invasive diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. A critical appraisal. **Journal of Hepatology,** v. 58, n. 5, p. 1007-1019, May 2013.

46 WELLS, P. N. Ultrasonics in clinical diagnosis. **The Scientific Basis of Medicine Annual Reviews**. 1966. p. 38-53

47 SANTOS, A. A. **Classificação da esteatose hepática usando imagens ecográficas**. 2012. 108 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2012.

48 RABBANI, H. et al. Speckle noise reduction of medical ultrasound images in complex wavelet domain using mixture priors. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering,** v. 55, n. 9, p. 2152-2160, Sept. 2008.

49 REEDER, S. B.; SIRLIN, C. B. Quantification of liver fat with magnetic resonance imaging. **Magnetic Resonance Imaging Clinics of North America,** v. 18, n. 3, p. 337-357, Aug. 2010.

50 MCCULLOUGH, E. C.; PAYNE, J. T. X-ray-transmission computed tomography. **Medical Physics,** v. 4, n. 2, p. 85-98, Mar-Apr. 1977.

51 GOLDMAN, L. W. Principles of CT: multislice CT. **Journal of Nuclear Medicine Technology,** v. 36, n. 2, p. 57-68, June 2008. doi: 10.2967/jnmt.107.044826.

52 KIM, S. H.; KAMAYA, A.; WILLMANN, J. K. CT perfusion of the liver: principles and applications in oncology. **Radiology,** v. 272, n. 2, p. 322-344, Aug. 2014.

53 GOLDMAN, L. W. Principles of CT: radiation dose and image quality. **Journal of Nuclear Medicine Technology,** v. 35, n. 4, p. 213-225, Dec. 2007.

54 FEDERLE, M. P.; BLACHAR, A. CT evaluation of the liver: principles and techniques. **Seminars in Liver Disease,** v. 21, n. 2, p. 135-145, May 2001.

55 GOLDMAN, L. W. Principles of CT and CT technology. **Journal of Nuclear Medicine Technology,** v. 35, n. 3, p. 115-128, Sept. 2007.

56 JOHNS, H. E.et al. Physics of CT scanners: principles and problems. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics,** v. 3, p. 45-51, 1977. doi: 10.1016/03603016(77)90225-5.

57 LENS VAN RIJN, R. A. General principles of CT scanning. **Journal Belge de Radiologie,** v. 59, n. 3, p. 201-211, May-June 1976.

58 PETERSILKA, M.et al. Technical principles of dual source CT. **European Journal of Radiology,** v. 68, n. 3, p. 362-368, Dec. 2008.

59 BRENNER, D. J.; HALL, E. J. Computed tomography--an increasing source of radiation exposure. **New England Journal of Medicine,** v. 357, n. 22, p. 2277-2284, Nov. 2007.

60 SPELIC, D. C. Nationwide evaluation of x-ray trends. **Journal of the American College of Radiology,** v. 5, n. 2, p. 146-148, Feb. 2008.

61 DUMAN, D. G.et al. Computed tomography in nonalcoholic fatty liver disease: a useful tool for hepatosteatosis assessment? **Digestive Diseases and Sciences,** v. 51, n. 2, p. 346-351, Feb. 2006.

62 BRAVO, A. A.; SHETH, S. G.; CHOPRA, S. Liver biopsy. **New England Journal of Medicine,** v. 344, n. 7, p. 495-500, Feb. 2001.

63 JOY, D.; SCOTT, B. B. To perform or not to perform liver biopsy: an alternative view. **Gut,** v. 52, n. 4, p. 610, Apr. 2003.

64 JOY, D.; THAVA, V. R.; SCOTT, B. B. Diagnosis of fatty liver disease: is biopsy necessary? **European Journal of Gastroenterology & Hepatology,** v. 15, n. 5, p. 539-543, May 2003.

65 KLATSKIN, G.; CONN, H. O. **Histopatology of the liver.** Oxford: Oxford University Press, 1993.

66 VUPPALANCHI, R. et al. Effects of liver biopsy sample length and number of readings on sampling variability in nonalcoholic Fatty liver disease. **Clinical Gastroenterology and Hepatology,** v. 7, n. 4, p. 481-486, Apr. 2009.

67 LONGO, R.et al. Fatty infiltration of the liver. quantification by 1H localized magnetic resonance spectroscopy and comparison with computed tomography. **Investigative Radiology,** v. 28, n. 4, p. 297-302, Apr. 1993.

68 HAMILTON, G.et al. Effect of PRESS and STEAM sequences on magnetic resonance spectroscopic liver fat quantification. **Journal of Magnetic Resonance Imaging,** v. 30, n. 1, p. 145-152, July 2009.

69 HU, H. H. et al. ISMRM workshop on fat-water separation: insights, applications and progress in MRI. **Magnetic Resonance in Medicine,** v. 68, n. 2, p. 378-388, Aug. 2012.

70 DIXON, W. T. Simple proton spectroscopic imaging. **Radiology,** v. 153, n. 1, p. 189-194, Oct. 1984.

71 MA, J. Dixon techniques for water and fat imaging. **Journal of Magnetic Resonance Imaging,** v. 28, n. 3, p. 543-558, Sept. 2008.

72 GLOVER, G. H.; SCHNEIDER, E. Three-point Dixon technique for true water/fat decomposition with B0 inhomogeneity correction. **Magnetic Resonance in Medicine,** v. 18, n. 2, p. 371-383, Apr. 1991.

73 REEDER, S. B.et al. Iterative decomposition of water and fat with echo asymmetry and least-squares estimation (IDEAL): application with fast spin-echo imaging. **Magnetic Resonance in Medicine,** v. 54, n. 3, p. 636-644, Sept. 2005.

74 BYDDER, M.et al. Relaxation effects in the quantification of fat using gradient echo imaging. **Journal of Magnetic Resonance Imaging,** v. 26, n. 3, p. 347-359, Apr. 2008.

75 PURCELL, E. M.; TORREY, H. C.; POUND, R. V. Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. **Physical Review,** v. 69, n. 1-2, p. 37-38, 1946.

76 BLOCH, F.; HANSEN, W. W.; PACKARD, M. The Nuclear Induction Experiment. **Physical Review,** v. 70, n. 7-8, p. 474-485, 1946.

77 GIL, V. M. S.; GERALDES, C. F. G. C. **Ressonância Magnética Nuclear:** fundamentos, métodos e aplicações. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002.

78 PANEPUCCI, H. C.; TANNUS, A. **Magnetic resonance imaging:** tutorial I. São Carlos: Instituto de Física de São Carlos, 2001. Disponível em: <http://cinapce2010.ifsc.usp.br/ciermag/media/img_articles/texts/tutorf2.pdf>. Acesso 15 jan. 2016.

79 ELSTER, A. D. Gradient-echo MR imaging: techniques and acronyms. **Radiology,** v. 186, n. 1, p. 1-8, Jan. 1993.

80 HAACKE, E. M. et al. **Magnetic resonance imaging:** physical principles and sequence design. New York: John Wiley & Sons, 1999.

81 MAZZOLA, A. A. Ressonância magnética: princípios de formação da imagem e aplicações em imagem funcional. **Revista Brasileira de Física Médica,** v. 3, n. 1, p. 117-129, 2009.

82 PROCTOR, W. G.; YU, F. C. The dependence of a nuclear magnetic resonance frequency upon chemical compound. **Physical Review,** v. 77, n. 5, p. 717-717, 1950.

83 PACKARD, M. E.; ARNOLD, J. T. A Fine structure in nuclear induction signals from ethyl alcohol. **Physical Review,** v. 83, n. 1, p. 210-211, 1951.

84 ARNOLD, J. T.; PACKARD, M. E. Variations in absolute chemical shift of nuclear induction signals of hydroxyl groups of methyl and ethyl alcohol. **Journal of Chemical Physics,** v. 19, n. 12, p. 1608-1609, 1951.

85 MANDAL, P. K. In vivo proton magnetic resonance spectroscopic signal processing for the absolute quantitation of brain metabolites. **European Journal of Radiology,** v. 81, n. 4, p. e653-e664, Apr. 2012.

86 MOONEN, C. T. et al. Comparison of single-shot localization methods (STEAM and PRESS) for in vivo proton NMR spectroscopy. **NMR in Biomedicine,** v. 2, n. 5-6, p. 201-208, Dec. 1989.

87 KLOSE, U. Measurement sequences for single voxel proton MR spectroscopy. **European Journal of Radiology,** v. 67, n. 2, p. 194-201, Aug. 2008.

88 TKAC, I.et al. In vivo 1H NMR spectroscopy of rat brain at 1 ms echo time. **Magnetic Resonance in Medicine,** v. 41, n. 4, p. 649-656, Apr. 1999.

89 IMAIOS. 2016. Disponível em: <https://www.imaios.com>. Acesso em: 03 jan. 2016.

90 VANHAMME, L.; VAN DEN BOOGAART, A.; VAN HUFFEL, S. Improved method for accurate and efficient quantification of MRS data with use of prior knowledge. **Journal of Magnetic Resonance,** v. 129, n. 1, p. 35-43, Nov. 1997.

91 NARESSI, A.et al. Java-based graphical user interface for MRUI, a software package for quantitation of in vivo/medical magnetic resonance spectroscopy signals. **Computers in Biology and Medicine,** v. 31, n. 4, p. 269-286, July 2001.

92 NARESSI, A.et al. Java-based graphical user interface for the MRUI quantitation package. **Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine,** v. 12, n. 2-3, p. 141-152, May 2001.

93 STEFAN, D.et al. Quantitation of magnetic resonance spectroscopy signals: the jMRUI software package. **Measurement Science & Technology,** v. 20, n. 10, Oct. 2009.

94 HAMILTON, G.et al. In vivo characterization of the liver fat (1)H MR spectrum. **NMR in Biomedicine,** v. 24, n. 7, p. 784-790, Aug. 2011.

95 HERNANDO, D.; LIANG, Z. P.; KELLMAN, P. Chemical shift-based water/fat separation: a comparison of signal models. **Magnetic Resonance in Medicine,** v. 64, n. 3, p. 811-822, Sept. 2010.

96 BLEY, T. A.et al. Fat and water magnetic resonance imaging. **Journal of Magnetic Resonance Imaging,** v. 31, n. 1, p. 4-18, Jan. 2010.

97 MCAULIFFE, M. MIPAV. 2015. Disponível em: <http://mipav.cit.nih.gov/>. Acesso em: 02 jan. 2016.

98 KLEINER, D. E. et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology,** v. 41, n. 6, p. 1313-1321, June 2005.

99 ESTATCAMP, E. **Software Action**. São Carlos: Estatcamp - consultoria em estatística e qualidade, 2014.

100 ENG, J. **ROC analysis:** web-based calculator for ROC curves. Baltimore: Johns Hopkins University, 2014. Disponível em: <http://www.jrocfit.org>. Acesso em: 15 jan. 2016.

101 OBUCHOWSKI, N. A. An ROC-type measure of diagnostic accuracy when the gold standard is continuous-scale. **Statistics in Medicine,** v. 25, n. 3, p. 481-493, Feb. 2006.

102 YOUDEN, W. J. Index for rating diagnostic tests. **Cancer,** v. 3, n. 1, p. 32-35, 1950.

103 HUSSAIN, H. K.et al. Hepatic fat fraction: MR imaging for quantitative measurement and display--early experience. **Radiology,** v. 237, n. 3, p. 1048-1055, Dec. 2005.

104 IRWAN, R.; EDENS, M. A.; SIJENS, P. E. Assessment of the variations in fat content in normal liver using a fast MR imaging method in comparison with results obtained by spectroscopic imaging. **European Radiology,** v. 18, n. 4, p. 806-813, Apr. 2008.