UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA E INFORMÁTICA

FERNANDO FERNANDES PAIVA

**QUANTIFICAÇÃO DA PERFUSÃO SANGUÍNEA
CEREBRAL UTILIZANDO *ARTERIAL SPIN LABELING*:
APLICAÇÕES EM MEDIDAS DE TERRITÓRIOS
VASCULARES E EM IMAGENS FUNCIONAIS**

São Carlos
2008

FERNANDO FERNANDES PAIVA

**QUANTIFICAÇÃO DA PERFUSÃO SANGUÍNEA
CEREBRAL UTILIZANDO *ARTERIAL SPIN LABELING*:
APLICAÇÕES EM MEDIDAS DE TERRITÓRIOS
VASCULARES E EM IMAGENS FUNCIONAIS**

Tese 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 Doutor em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada.
Orientador: Prof. Dr. Alberto Tannús

**São Carlos
2008**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DO PRESENTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, A FONTE.

Paiva, Fernando Fernandes

Quantificação da perfusão sanguínea cerebral utilizando arterial spin labeling: aplicações em medidas de territórios vasculares e em imagens funcionais / Fernando Fernandes Paiva; orientador: Alberto Tannús -- São Carlos, 2008.
150 p.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Física. Área de Concentração: Física Aplicada) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. Ressonância Magnética. 2. *Arterial Spin Labeling*. 3. Fluxo Sanguíneo Cerebral. I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernando Fernandes Paiva

Tese apresentada ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Física Aplicada.

Aprovado em: 06/06/2008

Comissão Julgadora

Prof. Dr. Alberto Tannus

Instituição: IFSC/USP

Assinatura

Prof. Dr. Tito José Bonagamba

Instituição: IFSC/USP

Assinatura

Prof. Dr. Roberto José Maria Covolan

Instituição: UNICAMP

Assinatura

Prof. Dr. Dráulio Barros de Araújo

Instituição: FFCLRP/USP

Assinatura

Prof. Dr. Afonso Henriques Souza da Costa e Silva

Instituição: NINDS/NIH

Assinatura

À Mirella, minha esposa, e à Camillinha,
minha princesinha, que, ao final de cada dia,
me fazem compreender a verdadeira razão
de acordar na manhã seguinte.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, os meus mentores, Prof. Dr. Alberto Tannús e Dr. Afonso C. Silva, pela possibilidade me ofereceram de ampliar meu conhecimento e minha formação acadêmica e científica. Ao Prof. Alberto, que desde 1999, ano em que aceitou o desafio de me orientar em um projeto de iniciação científica, tem acompanhado todos os momentos da minha vida acadêmica, reitero o meu profundo agradecimento por todo o conhecimento e confiança que sempre depositou em mim. Confiança esta que também recebi por parte do Afonso que, em meados de 2005, recebeu-me em seu laboratório e, desde então, tem contribuído de forma ímpar para a minha formação na área de estudos de perfusão cerebral utilizando a técnica de *arterial spin labeling*. Enfim, a eles, o meu sincero MUITO OBRIGADO!!!

Ao Dr. George C. Nascimento por todo suporte na parte de desenvolvimento e implementação do hardware utilizado no presente trabalho e pela grande amizade construída nos últimos anos. Valeu Picareta!!!

À Dra. Erica C. Henning com quem tive a gratificante experiência de colaborar nos estudos de modelos animais em patologias, discutindo e realizando algumas etapas do presente projeto.

Ao Dr. S. Lalith Talagala por todo apoio dispensado nos experimentos realizados no sistema dedicado a estudos com humanos. Agradeço também à Jeannette Black e à Reneé Hill pela assistência dispensada durante o meu treinamento para operar o sistema e a aquisição dos dados no NMRF3T.

Ao Dr. Nicholas Bock por todos os momentos de tensão, stress, desapontamento e, finalmente, de gratificação que encaramos junto durante os

primeiros experimentos realizados com sagüis na CMU. Isto sem contar os providenciais *happy hours* no *Rock Bottom* e, em particular, o antológico no *Flanagan's Harp & Fiddle*.

À Bojana Stefanovic, Yoshiyuki Hirano, Junjie Liu e Ara Kocharyan, colegas de laboratório no NIH que, competentemente, mantiveram nosso ambiente de trabalho sempre sadio. Às técnicas Lisa Zhang, Sachy Sato e Julie Mackel por todo auxílio dispensado na preparação e realização dos experimentos utilizando animais.

À Kathy Ireland-Pardini, Judy Ireland, Ana Paz e Nhuyen Quach por toda a prestação dispensada durante minha estada no NIH.

Ao pessoal do Grupo de Imagens por Ressonância Magnética do IFSC: Dr. Edson L. G. Vidoto, Dr. Mateus J. Martins, Daniel Papoti, João G. da Silva, José Carlos Gazziro, Odir A. Canevarollo e Nilzelí AP. Nery pela amizade e dedicação durante todos esses anos de convivência.

Ao grande amigo Fábio Boracini da Silva por todos os bons momentos e pela amizade desde a época da graduação. Valeu Zé!!! Aos amigos Frank Kruger e Maren Strenziok pelos bons momentos durante nosso convívio em Bethesda e pelo *tour* excepcional que me proporcionaram em Berlin.

À Candinha que, desde nossa chegada aos EUA, nos atura invadindo sua casa periodicamente demonstrando, sempre, uma disponibilidade louvável e uma amizade singular.

Aos meus pais, Valdecir e Nirma, por quem tenho extrema admiração, pela formação e ensinamentos que sempre me transmitiram e por todo o respeito e confiança que sempre tiveram em mim.

À FAPESP, ao IFSC – USP e ao *Graduate Partnerships Program* do NIH sem os quais este trabalho não poderia ser realizado.

“Brick walls are there for a reason: they let us
prove how badly we want things.”

Randy Pausch

RESUMO

Arterial spin labeling é uma técnica completamente não invasiva que permite o monitoramento quantitativo da perfusão cerebral e, juntamente com outras técnicas de ressonância magnética, tem se estabelecido como uma excelente ferramenta para estudos relacionados à hemodinâmica e problemas vasculares cerebrais. Dentre as possíveis implementações da técnica, a abordagem contínua, combinada a uma bobina de marcação dedicada, apresenta algumas vantagens com relação à relação sinal-ruído e à deposição de potência de RF. No presente trabalho, estas vantagens foram exploradas na implementação de uma metodologia que permite a obtenção de mapas quantitativos de fluxo sanguíneo cerebral, bem como dos territórios vasculares das principais artérias suprindo o cérebro. Os resultados obtidos em humanos e animais revelam a robustez e aplicabilidade da técnica em estudos da hemodinâmica cerebral. Aplicações em hipertensão comprovam que a técnica é capaz de fornecer informações que podem auxiliar na compreensão de diferentes patologias. A implementação da variante dinâmica da técnica ASL demonstra a versatilidade da metodologia fornecendo ferramentas para uma maior compreensão das características espaciais e temporais da hemodinâmica cerebral. Os resultados demonstram isto tanto em condições de fluxo sanguíneo basal como em hiperemia causada por estímulos funcionais.

Palavras-chave: Ressonância magnética. Arterial spin labeling. Fluxo sanguíneo cerebral.

ABSTRACT

Arterial spin labeling techniques allow to obtain quantitative maps of perfusion non-invasively. Along with other MRI techniques, it has proven useful for diagnosis of a variety of cerebrovascular diseases. Amongst the available basic implementations, the continuous approach employing a dedicated labeling RF coil has the advantages of presenting high signal-to-noise ratio and lower RF power deposition. In the present work, these advantages were explored in order to implement a methodology to obtain quantitative maps of cerebral blood flow and the vascular territories of the major cerebral feeding arteries. Human and animal results reveal the robustness and applicability of the technique in cerebral hemodynamic studies. Applications in hypertension show that the technique can provide complimentary information to improve the understanding of neurovascular diseases. The dynamic ASL technique shows the method versatility for studying the spatial and temporal characteristics of cerebral hemodynamics. The results unravel that both under basal and functional hyperemia conditions.

Keywords: Magnetic resonance. Arterial spin labeling. Cerebral blood flow.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de transição entre os possíveis níveis de energia para um núcleo com spin $\frac{1}{2}$ ilustrando a diferença de população entre os níveis na condição de equilíbrio térmico.	34
Figura 2: Movimento de precessão de um núcleo com momento magnético μ na presença de um campo magnético B_0	36
Figura 3: Retorno das componentes de magnetização longitudinal e transversal à condição de equilíbrio após um pulso de excitação.	39
Figura 4: Ilustração esquemática do caminho percorrido pela água presente no sangue arterial para a realização das trocas entre o compartimento vascular e o tecido, trocas estas que ocorrem no nível dos capilares.	46
Figura 5: Diagrama mostrando as duas abordagens pulsadas da técnica ASL. Em ambos os casos a situação de marcação (esq.) e controle (dir.) estão representadas.	49
Figura 6: Diagrama da abordagem contínua da técnica ASL. Os esquemas de aquisição que dão origem às imagens marcadas (esq.) e de controle (dir.) estão representados.	52
Figura 7: a) Esquema da bobina de marcação indicando as dimensões físicas. Os espaços entre as placas de cobre representam elementos capacitivos. b) Diagrama do circuito utilizado na construção da bobina de marcação.	59
Figura 8: Fotos da bobina de marcação utilizada nos experimentos com animais.	60
Figura 9: Imagens representativas na região do pescoço obtidas após a utilização de diferentes potências de RF para a realização da marcação dos spins. Da esquerda para a direita, as imagens representativas correspondem a potências de marcação de 0, 0.1, 0.5, e 5.0 W, respectivamente. As carótidas internas estão destacadas nas imagens. b) Dependência do grau de marcação com relação à potência de RF utilizada para marcação dos spins arteriais.	62
Figura 10: Tempos de relaxação longitudinal (T_1) medidos em diferentes regiões do cérebro do rato em um sistema de 7T (esq.), bem como a especificação das regiões de interesse selecionadas para a realização das medidas. ..	64
Figura 11: a) Imagens coronais anatômicas e b) as respectivas imagens de perfusão do cérebro do rato obtidas utilizando ASL.	65
Figura 12: Esquema da metodologia que permite a obtenção de territórios vasculares posicionando a bobina de marcação sobre a artéria de interesse.	72
Figura 13: Imagens axiais de controle (em cima) e os respectivos mapas de perfusão (em baixo) obtidos utilizando uma bobina de marcação unilateral. Imagens	

obtidas com *spin-echo* EPI utilizando os seguintes parâmetros: TR / TE / período de marcação / PLD = 4 s / 22 ms / 3 s / 0.5 s. Como esperado para um cérebro típico, o sinal de perfusão obtido após a marcação do sangue fluindo em apenas uma das carótidas se concentra no hemisfério ipsilateral. A subtração total no hemisfério contralateral serve como demonstração de ausência de MTC (ZAHARCHUK *et al.*, 1999).72

Figura 14: a) Ilustração esquemática do perfil de excitação ao longo do eixo longitudinal de uma bobina de transmissão/recepção convencional. A marcação seletiva das artérias de interesse é realizada combinando este decaimento na eficiência da bobina com um plano oblíquo de marcação. b) Posicionamento do plano de marcação baseado nos dados obtidos de um angiograma da região do pescoço. A imagem do cérebro foi adicionada apenas para efeitos ilustrativos. O plano de marcação intersecta a artéria selecionada aproximadamente 80 mm abaixo do centro da bobina enquanto as artérias contralaterais são intersectadas a aproximadamente 160 mm do centro da bobina. c) Imagens de perfusão obtidas em um voluntário saudável após a marcação das circulações direita e esquerda, respectivamente (primeira e segunda linha). Respectivas imagens anatômicas estão mostradas na terceira linha. Uma boa demarcação dos territórios de perfusão da circulação anterior pode ser notada, exceto pela contaminação causada pela perfusão da circulação posterior (WERNER *et al.*, 2004).75

Figura 15: a) Posicionamento dos planos de marcação de maneira a determinar os territórios da carótida interna esquerda (verde), direita (vermelho) e da circulação posterior (azul) baseado no angiograma da região do COW (GOLAY *et al.*, 2005). b) Posicionamento dos planos de marcação utilizado na abordagem em que duas aquisições (azul e roxo), ambas incluindo a circulação posterior, substituem as três aquisições (vermelha, verde e azul) do método anterior (ZIMINE, I. *et al.*, 2006).76

Figura 16: Representação esquemática dos esquemas de marcação seletiva que combinam pulsos de RF e saturação dos planos de imagem para a obtenção dos territórios vasculares de perfusão. a) Um pulso de inversão sagital unilateral inverte os spins na carótida selecionada. Um pulso de saturação, seguido por um gradiente de defasagem, é aplicado para destruir os efeitos do pulso de inversão na região da imagem. b) Um pulso de inversão sagital unilateral é seguido por um pulso de inversão seletivo que inverte o esquema de marcação na região localizada abaixo do plano de aquisição. Um pulso de saturação, seguido por um gradiente de defasagem, é, então, aplicado para destruir os efeitos do pulso de inversão na região da imagem.79

Figura 17: a) Ilustração do esquema utilizando um plano de marcação girante com centro de rotação posicionado sobre a artéria de interesse para, seletivamente, marcar a artéria de interesse. Um gradiente girante G combinado a um pulso de RF de frequência modulada define a posição de marcação como sendo sobre uma das artérias, enquanto as áreas adjacentes observam um comportamento ressonante variando com modulação senoidal. A área sombreada ilustra a cobertura do plano de

<p>marcação dinâmico. b) Imagens dos territórios de perfusão adquiridos em um voluntário saudável. Imagens anatômicas com contraste por T_1 (primeira linha) e os respectivos territórios de perfusão da MCA direita (segunda linha) e esquerda (terceira linha), bem como da ACA (quarta linha). Os territórios de perfusão estão claramente delineados, exceto pela região onde o mecanismo de marcação intersecta a região da imagem, aparecendo como bandas escuras nos mapas de perfusão (WERNER <i>et al.</i>, 2005).</p>	80
<p>Figura 18: Perfil da resposta espacial de uma distribuição uniforme de spins sujeito a um pulso bidimensional seletivo. Apesar de o pulso apresentar um perfil de alta eficiência focalizado no cilindro central, lóbulos laterais perturbam a magnetização seguindo, neste caso, um padrão esférico.</p>	82
<p>Figura 19: Imagens EPI típicas obtidas de um voluntário saudável (em cima) e os respectivos mapas de perfusão obtidos como resultado da marcação realizada com pulsos bidimensionais da ICA direita (no meio) e esquerda (embaixo) (DAVIES; JEZZARD, 2003).</p>	84
<p>Figura 20: a) Esquema para marcação do sangue fluindo apenas na artéria de interesse. b) Angiograma obtido na região do pescoço do animal mostrando as carótidas e as artérias vertebrais, utilizadas no planejamento do esquema de marcação seletiva.</p>	86
<p>Figura 21: Imagens coronais de perfusão típicas do cérebro de um rato SD obtidas utilizando a) $\theta = \pm 45^\circ$ e b) $\theta = \pm 60^\circ$, respectivamente.</p>	90
<p>Figura 22: a) Imagens coronais anatômicas e b) de perfusão do cérebro de um rato SD usando $\theta = 0^\circ$. Imagens de perfusão correspondendo aos territórios de perfusão das carótidas c) esquerda e d) direita, adquiridas usando, respectivamente, $\theta = -60^\circ$ e $\theta = +60^\circ$.</p>	91
<p>Figura 23: Diferenças percentuais no sinal obtido de ROIs definidas em regiões de matéria branca e cinzenta do cérebro em ambos os hemisférios conforme o ângulo de marcação aumenta. As barras de erro representam o desvio padrão do sinal. Uma atenuação significativa no sinal de perfusão do hemisfério esquerdo pode ser observada para $\theta > 30^\circ$.</p>	95
<p>Figura 24: a) Imagens axiais anatômicas do cérebro de um voluntário e b) suas respectivas imagens de perfusão global adquiridas usando $\theta = 0^\circ$. c) Imagens de perfusão do hemisfério direito, correspondendo ao território de perfusão da carótida direita, adquiridas utilizando $\theta = 60^\circ$ e d) do hemisfério esquerdo, correspondendo ao território de perfusão da carótida esquerda, adquiridas utilizando $\theta = -60^\circ$.</p>	97
<p>Figura 25: Diferença percentual média no sinal das matérias branca e cinzenta nos hemisférios esquerdo e direito nas situações em que $\theta = 0^\circ$, correspondendo à perfusão global do cérebro, e $\theta = \pm 60^\circ$, correspondendo aos territórios direito e esquerdo foram utilizados (* $p < 0.01$).</p>	99

- Figura 26: Mapa colorido dos territórios de perfusão cerebral obtidos em um voluntário típico mostrando os territórios supridos pela ICA esquerda (verde) e direita (vermelho). A circulação posterior (azul) pode ser obtida na fase de pós-processamento de acordo com a Eq. [42]. A região central do cérebro contém contribuições da circulação esquerda e direita, as quais estão representadas em amarelo. 102
- Figura 27: a) Imagens coronais típicas obtidas em ratos hipertensos. b) Mapa de perfusão global correspondente e territórios vasculares correspondendo à circulação c) esquerda e d) direita. 110
- Figura 28: Variações nos territórios vasculares em ratos saudáveis e hipertensos determinadas utilizando ASL e angiografia. Respectivos MIPs (colunas esquerda e do meio) e representação em cores dos mapas dos territórios de perfusão (coluna da direita) salientando a assimetria observada. 113
- Figura 29: Conjunto dos diferentes tipos de dominâncias observados em ambos os grupos de animais. 115
- Figura 30: Variação regional dos valores de CBF medidos em ratos saudáveis e hipertensos. As ROIs foram definidas de forma a englobar todo o cérebro, apenas o córtex motor ou o putâmen. Em todos os casos, os valores obtidos para os ratos SHR foram significativamente maiores que os para ratos SD ($p < 0.01$). 116
- Figura 31: Valores basais de CBF medidos em ratos saudáveis e hipertensos e suas respectivas respostas à indução de hipercapnia utilizando 5% e 10% de CO_2 . Em todos os casos, os valores obtidos para os ratos SHR foram significativamente maiores que os obtidos para ratos SD ($p < 0.01$). 117
- Figura 32: Mudanças percentuais nos valores de CBF quando comparados aos valores basais após a indução da hipercapnia utilizando 5% e 10% de CO_2 . Quando 5% de CO_2 foi utilizado para indução da hipercapnia, ambos os grupos apresentaram aumento nos valores de CBF equivalente. Entretanto, os valores de CBF aumentaram significativamente mais com relação aos níveis basais nos ratos SD do que nos ratos SHR quando 10% de CO_2 foi utilizado ($p < 0.01$). 118
- Figura 33: Simulação da resposta do tecido a três frequências distintas da função de marcação, após atingir o estado estacionário. As simulações foram realizadas utilizando os seguintes parâmetros: $T_{1\text{app}} = 1.75 \text{ s}$, $\tau = 0.25 \text{ s}$, $\text{CBF} = 150 \text{ ml/100g/min}$ and $\alpha_0 = 0.90$. Definiram-se as seguintes frequências para a função de marcação: a) 0.20Hz, b) 0.10Hz e c) 0.05Hz. As linhas pontilhadas representam a função de marcação (escala à direita) e as linhas sólidas mostram a resposta do tecido em unidades arbitrárias (escala à esquerda). d) Gráfico com a escala ampliada na região de máxima amplitude em cada uma das situações. Pode-se notar que frequências de marcação diferentes modulam a amplitude da resposta do tecido, enquanto o atraso com relação a função de marcação é constante e governado pelo tempo de trânsito. 125

- Figura 34: a) Dados originais, após a correção da linha de base, obtidos utilizando DASL. b) Componentes reais (esquerda) e imaginárias (direita) da FT dos dados e c) as respectivas componentes obtidas da FT do *fitting* utilizando o modelo expressado pela Eq. [45]. d) Espectro de frequências dos dados filtrados com base nas frequências permitidas pelo modelo DASL. Além da redução significativa do ruído, o pico em 1 Hz, introduzido devido à frequência respiratória, também foi filtrado. e) Dados filtrados mostrando uma redução significativa do ruído.130
- Figura 35: Mapas obtidos a partir dos dados adquiridos utilizando DASL. a) Mapa de CBF, apresentando alta SNR. b) Mapa de T_{1app} , no qual também se pode notar a alta SNR e c) Mapa de tempo de trânsito, mais ruidoso em função do tempo de trânsito em ratos ser comparável à resolução temporal da técnica utilizada.....132
- Figura 36: Variação regional dos valores de CBF medidos em ratos SD. As ROIs foram definidas de forma a englobar todo o cérebro, apenas o córtex motor ou o putâmen. Valores obtidos utilizando uma sequência CASL convencional também estão listados.132
- Figura 37: Variação regional dos valores de a) T_{1app} e b) τ medidos em ratos SD. Em ambos os casos, as ROIs foram definidas de forma a englobar o córtex motor ou o putâmen.133
- Figura 38: a) Mapa de *t-score* mostrando a resposta funcional BOLD à estimulação bilateral das patas dianteiras. Regiões robustas de ativação podem ser vistas em ambos os hemisférios. b) Evolução temporal do sinal obtido na região de ativação em um experimento combinando DASL e fMRI. A hemodinâmica funcional aparece superimposta à resposta DASL. c) Média de todos os ciclos DASL, obtidos após a filtragem dos dados. Os períodos nos quais os estímulos foram apresentados estão indicados pela barras horizontais embaixo da resposta hemodinâmica.135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de CBF (ml/100g/min) obtidos para ratos SD utilizando $\theta = 0^\circ$, -60° e $+60^\circ$	92
Tabela 2: Diferença no sinal de perfusão global ($\theta = 0^\circ$) e respectivos valores de CBF e SNR.....	98
Tabela 3: Valores de CBF (ml/100g/min) obtidos para ambos os grupos de ratos, SD e SHR, utilizando $\theta = 0^\circ$, -60° e $+60^\circ$	111
Tabela 4: Parâmetros fisiológicos obtidos em condição basal e sob hipercapnia. ..	116

LISTA DE ABREVIATURAS

ACA	<i>Anterior Cerebral Artery</i>
AIF	<i>Arterial Input Function</i>
ASL	<i>Arterial Spin Labeling</i>
AVC	<i>Acidente Vascular Cerebral</i>
BOLD	<i>Blood Oxygenation Level Dependent</i>
CASL	<i>Continuous ASL</i>
CBF	<i>Cerebral Blood Flow</i>
CBV	<i>Cerebral Blood Volume</i>
CCA	<i>Common Carotid Artery</i>
COW	<i>Circle of Willis</i>
CT	<i>Computed Tomography</i>
DASL	<i>Dynamic Arterial Spin Labeling</i>
DSC	<i>Dynamic Susceptibility Contrast</i>
EPI	<i>Echo Planar Imaging</i>
EPISTAR	<i>EPI and Signal Targeting with Alternating Radio Frequency</i>
ETCO ₂	<i>End-Tidal CO₂</i>
FAIR	<i>Flow-Sensitive Alternating Inversion Recovery</i>
fMRI	<i>Functional MRI</i>
FT	<i>Fourier Transform</i>
HDR	<i>Hemodynamic Response</i>
HR	<i>Heart Rate</i>
IACUC	<i>Institutional Animal Care and Use Committee</i>
ICA	<i>Internal Carotid Artery</i>
LICA	<i>Left ICA</i>
MCA	<i>Middle Cerebral Artery</i>
MIP	<i>Maximum Intensity Projections</i>
MRI	<i>Magnetic Resonance Imaging</i>
MTC	<i>Magnetization Transfer Contrast</i>
MTT	<i>Mean Transit Time</i>
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NINDS	<i>National Institute of Neurological Disorders and Stroke</i>

PASL	<i>Pulsed ASL</i>
PET	<i>Positron Emission Tomography</i>
PLD	<i>Post Labeling Delay</i>
POST	<i>Posterior Circulation</i>
RF	<i>Rádio Frequência</i>
RICA	<i>Right ICA</i>
RM	<i>Ressonância Magnética</i>
ROI	<i>Region of Interest</i>
RR	<i>Respiration Rate</i>
SAR	<i>Specific Absorption Rate</i>
SD	<i>Sprague-Dawley</i>
SHR	<i>Spontaneously Hypertensive</i>
SHRSP	<i>Spontaneously Hypertensive Stroke Prone</i>
SNR	<i>Signal to Noise Ratio</i>
SPECT	<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i>
SPO ₂	<i>Saturation of Peripheral Oxygen</i>
STAIR	<i>Stroke Therapy Academic Industry Roundtable</i>
VA	<i>Vertebral Artery</i>

SUMÁRIO

1 Introdução	17
2 Perfusão Cerebral	21
2.1 Definição e modelos teóricos para análise da perfusão	22
2.1.1 Cinética dos traçadores difusíveis	23
2.1.2 Cinética dos traçadores intravasculares	25
2.2 Métodos de imagem de perfusão.....	26
2.2.1 CT.....	26
2.2.2 SPECT	28
2.2.3 PET	29
2.2.4 MRI.....	30
3 Ressonância Magnética	31
3.1 Propriedades do núcleo atômico.....	32
3.2 Equações de Bloch.....	37
3.3 Relaxação	38
3.4 Imagens de perfusão por RM	40
3.4.1 RM utilizando agentes de contraste	41
3.4.2 RM utilizando contraste endógeno	43
4 Arterial Spin Labeling	45
4.1 PASL	48
4.2 CASL	51
5 CASL: Implementação e Otimização.....	55
5.1 O sistema de imagens por RM	57
5.1.1 Sistema para animais.....	57
5.1.2 Sistema para humanos	58
5.2 Bobina de marcação.....	59
5.3 Grau de marcação	61
5.4 Mapas de T_1.....	63
5.5 Mapas de perfusão	64
5.6 Considerações gerais	66
6 Territórios Vasculares	67

6.1 Estado da arte	70
6.1.1 Bobina de marcação dedicada	71
6.1.2 Marcação seletiva de regiões confinadas espacialmente	73
6.1.3 Pulsos de RF bidimensionais.....	82
6.1.4 Considerações gerais	84
6.2 Metodologia.....	85
6.3 Métodos e resultados.....	88
6.3.1 Estudos em animais.....	88
6.3.2 Estudos em humanos	92
6.4 Considerações gerais	103
7 Aplicações em Patologia: Hipertensão.....	105
7.1 Métodos e resultados.....	107
7.2 Considerações gerais	118
8 ASL Dinâmica	121
8.1 DASL	122
8.2 Métodos e resultados.....	126
8.3 Considerações gerais	135
Considerações Finais	137
Referências	142

1 Introdução

Perfusão ou fluxo sanguíneo cerebral (CBF, do inglês *Cerebral Blood Flow*) é um dos principais indicativos de viabilidade de um determinado tecido. Desde o final do século XIX, o CBF tem sido utilizado como marcador de atividade neuronal em estudos cognitivos e clínicos (LIU; BROWN, 2007). Além disso, o CBF pode ser combinado a parâmetros fisiológicos para revelar a neurobiologia complexa das funções cerebrais em condições saudáveis e patológicas. Desta forma, compreender os níveis de CBF e a hemodinâmica cerebral é de fundamental importância, uma vez que reduções severas da perfusão cerebral podem causar danos neuronais significativos nas áreas afetadas. Pesquisas têm se focado na busca por métodos para medida da perfusão cerebral, principalmente àqueles que permitem a quantificação de mudanças locais do fluxo sanguíneo, bem como daquelas ocorridas ao longo do tempo.

Arterial spin labeling (ASL) é uma técnica completamente não invasiva que permite o monitoramento quantitativo da perfusão cerebral durante um período de tempo tão longo quanto necessário. Sua característica não invasiva permite que medidas sejam repetidas inúmeras vezes com uma resolução temporal limitada

exclusivamente pela relação sinal-ruído (SNR, do inglês *Signal to Noise Ratio*) necessária para garantir uma boa precisão na determinação dos valores de CBF. Desta forma, ASL tem se provado, juntamente com outras técnicas de ressonância magnética (RM), uma excelente ferramenta para estudos relacionados à hemodinâmica e problemas vasculares cerebrais (WINTERMARK *et al.*, 2005).

Logo após a inserção da técnica de ASL como uma ferramenta para obtenção de mapas de perfusão global do cérebro, surgiu a proposta de utilizar ASL para, de maneira seletiva, marcar o sangue fluindo através de artérias específicas (DETRE *et al.*, 1994). Os territórios de perfusão vascular podem fornecer informação complementar aos dados obtidos a partir de técnicas angiográficas, principalmente no que se refere à quantificação do estado de perfusão do tecido, e podem ser importantes tanto em aplicações prognósticas como diagnósticas.

Nosso interesse por esta temática, em particular no que se refere à utilização de metodologias baseada em ASL, teve origem no início de 2003 quando o programa CInAPCe da FAPESP começou a tomar forma. A realização de experimentos utilizando ASL demanda a infra-estrutura prevista no orçamento proposto e aprovado pela FAPESP para o nosso grupo, o que inclui, entre outras coisas, um espectrômetro de RM com tecnologia diferente daqueles desenvolvidos localmente em nosso instituto. Dado o atraso na implementação efetiva do centro, causado por questões administrativas internas da FAPESP, buscamos alternativas que viabilizassem a realização do projeto em um tempo que fosse compatível à demanda do Programa de Pós Graduação, alternativa esta concretizada em julho de 2005, através de uma parceria firmada entre o Prof. Dr. Alberto Tannús e o Dr. Afonso C. Silva, chefe da *Cerebral Microcirculation Unit*, parte do *Laboratory of Functional and Molecular Imaging*, no *National Institute of Neurological Disorders*

and Stroke (NINDS) do *National Institutes of Health* (NIH). Através desta parceria, o presente trabalho de doutorado se configurou de forma que as atividades acadêmicas foram realizadas no IFSC – USP, enquanto a parte experimental foi realizada, em sua plenitude, no NIH.

Desta forma, esta tese busca cobrir os aspectos teóricos e experimentais relacionados à quantificação global do CBF utilizando a técnica ASL, bem como sua utilização na determinação dos territórios de perfusão cerebral. Diferentes implementações da abordagem contínua da técnica e as respectivas aplicações cobertas no presente trabalho, bem como a base teórica necessária para a compreensão das mesmas, foram expostas em oito capítulos.

Seguindo esta introdução, o segundo capítulo aborda, em linhas gerais, a perfusão cerebral, com principal ênfase em sua definição e respectivos modelos teóricos utilizados para sua análise. Este capítulo traz, também, uma visão geral dos métodos de imagem propostos para medidas de fluxo sanguíneo, enfatizando suas respectivas vantagens e desvantagens.

O capítulo seguinte trata dos aspectos teóricos do fenômeno RM, incluindo uma descrição quântica formal, e sua equivalência clássica. A contextualização e descrição das equações fenomenológicas de Bloch é seguida por uma abordagem das diferentes técnicas de imagem de perfusão utilizando RM.

O quarto capítulo descreve a técnica ASL e suas diferentes formas de implementação, enfatizando as principais diferenças, vantagens e desvantagens de cada uma. A teoria envolvida na quantificação do CBF a partir das imagens de RM é demonstrada.

Na sequência, o quinto capítulo traz a descrição detalhada da implementação da abordagem contínua da técnica ASL realizada no presente trabalho. Este capítulo

inclui uma descrição dos sistemas de RM utilizados nos experimentos com humanos e animais, respectivamente, bem como uma descrição do hardware necessário para a realização dos experimentos. A caracterização de parâmetros necessários para a quantificação do CBF e os primeiros mapas de perfusão obtidos também são apresentados neste capítulo.

O sexto capítulo introduz o conceito de territórios vasculares e apresenta uma visão geral dos métodos baseados em ASL propostos, até o presente momento, para delineação dos mesmos. Seguindo, o método implementado no presente trabalho é apresentado de maneira detalhada, acompanhado dos resultados obtidos em experimentos realizados com animais e humanos.

O sétimo capítulo trata da aplicação dos conceitos e da metodologia implementada no presente trabalho, descrita nas seções anteriores, em um modelo animal de patologia. Animais que apresentam hipertensão crônica foram estudados e sua morfologia vascular foi caracterizada. Parâmetros como a reatividade vascular ao CO₂ e suas respectivas relações com o CBF compõem o rol de resultados apresentados.

O oitavo e último capítulo descreve a implementação de uma variante da técnica ASL, conhecida como ASL dinâmica (DASL, do inglês *Dynamic ASL*), que permite a determinação de três parâmetros necessários à quantificação do CBF em uma mesma seção experimental, além de possibilitar medidas de CBF com alta resolução temporal. A metodologia foi utilizada na obtenção de parâmetros hemodinâmicos basais, bem como na avaliação da hemodinâmica funcional cerebral e os resultados obtidos concluem o escopo desta tese.

2 Perusão Cerebral

A perfusão cerebral indica o volume de sangue que irriga um determinado volume de tecido cerebral por unidade de tempo. Uma vez que a capacidade de armazenamento energético do cérebro é bastante limitada, é necessário que o fluxo sanguíneo seja contínuo de maneira a suprir a demanda de glicose e oxigênio para a devida realização da glicólise aeróbica. Inúmeras são as variáveis que interferem nos níveis de CBF. A perfusão cerebral pode, por exemplo, aumentar localmente em resposta ao aumento da atividade cerebral, podendo, também, variar em função de determinadas condições patológicas, como, por exemplo, um acidente vascular cerebral (AVC). Compreender os níveis de CBF e suas variações é fundamental, uma vez que reduções severas da perfusão cerebral podem causar danos neuronais significativos nas áreas cerebrais afetadas.

Desde o final do século XIX, as pesquisas sobre este tema têm se concentrado especialmente na busca por métodos de medida da perfusão cerebral, principalmente àqueles que permitem a quantificação de mudanças locais do fluxo sanguíneo, bem como daquelas ocorridas ao longo do tempo. A seguir, serão

discutidos modelos teóricos para análise da perfusão cerebral, bem como algumas das técnicas de imagem que foram desenvolvidas para este fim.

2.1 Definição e modelos teóricos para análise da perfusão

Na literatura, os termos fluxo sanguíneo e perfusão constantemente se alternam na definição de fluxo através de um único vaso sanguíneo ou do volume de sangue suprindo um determinado volume de tecido por unidade de tempo. Neste estudo, definiremos perfusão como sendo o volume de sangue fluindo através dos capilares por volume de tecido por unidade de tempo, sendo expressa em ml/100g/min. Uma vez que as trocas metabólicas e de gases são feitas nos capilares, a presente definição engloba tanto a descrição hemodinâmica como a funcional da perfusão (LE BIHAN, 1992).

Como mencionado anteriormente, a importância vital da perfusão para a integridade dos tecidos cerebrais inspirou a busca por métodos que permitissem sua medida e, principalmente, sua quantificação. Basicamente, as medidas de perfusão dependem de três fatores: a) a disponibilidade de um agente de contraste ou traçador; b) um método de detecção e c) um modelo através do qual o CBF possa ser estimado, qualitativa ou quantitativamente, a partir da análise do comportamento do traçador.

Tipicamente, três são os tipos distintos de traçadores: microesferas, traçadores difusíveis e traçadores intravasculares. As microesferas são pequenas partículas (10-30 μ m), marcadas com corantes específicos, que são aprisionadas nos capilares durante a primeira passagem após a injeção. Este aprisionamento nos capilares é funcionalmente equivalente à extração completa do traçador pelo tecido suprido. Desta forma, as microesferas atuam de forma semelhante aos traçadores

difusíveis. Entretanto, os verdadeiros traçadores difusíveis são, tipicamente, moléculas inertes pequenas, injetadas na forma líquida ou inaladas na forma gasosa. Essas moléculas atravessam a barreira dos capilares e atingem uma concentração de equilíbrio com o tecido. Existem, ainda, os traçadores intravasculares, constituídos por moléculas maiores que não atravessam a parede capilar, permanecendo, portanto, no sistema vascular. Boa parte dos traçadores intravasculares só pode ser qualificada como tal quando o tecido em questão é o tecido cerebral. Isto ocorre uma vez que a barreira hematoencefálica proíbe determinados traçadores de se difundir pelo tecido cerebral, muito embora esses mesmos traçadores consigam atravessar a parede capilar em tecidos de diferentes órgãos.

Após a administração do traçador, as mudanças de sinal no tecido de interesse são analisadas com base no modelo de perfusão adotado. Essencialmente, dois modelos para quantificação da perfusão foram desenvolvidos ao longo dos anos: cinética dos traçadores difusíveis e cinética dos traçadores intravasculares.

2.1.1 Cinética dos traçadores difusíveis

O conceito de traçadores difusíveis foi introduzido por Zuntz in 1897, durante seus estudos sobre a absorção do nitrogênio no sangue e nos tecidos em alta pressão atmosférica. Zuntz assumiu que o nitrogênio se misturaria instantaneamente com o sangue nos pulmões e, uma vez no sangue, se misturaria imediatamente com o tecido. Desta forma, a concentração de nitrogênio no tecido seria igual à concentração no sangue venoso e a difusão não seria, portanto, um fator limitante na troca de um gás inerte (ou traçador) entre o sangue e o tecido. Além disso,

assumiu que todo o sangue realiza troca com o tecido e todos os tecidos no corpo foram considerados como constituindo um único compartimento. Esses argumentos, somados ao princípio de conservação de massa, constituíram a base para que Kety e Schmidt formalizassem o modelo de traçadores difusíveis em 1948 (KETY; SCHMIDT, 1948).

De acordo com este modelo, a quantidade de gás inerte (Q_i) absorvida pelo tecido por unidade de tempo é igual à diferença entre a quantidade de gás trazida ao tecido pelo sangue arterial e a levada pelo sangue venoso, o que dá origem à equação para troca de gases inertes a seguir:

$$\frac{dQ_i}{dt} = \mathfrak{T}_i (C_a - C_v) \quad [1]$$

sendo $\mathfrak{T}_i$ a perfusão em um determinado tecido “ i ”, e C_a e C_v as concentrações de gás (ou traçador) nas redes arteriais e venosas, respectivamente. Considerando que o volume sanguíneo no tecido é desprezível quando comparado ao volume de tecido (V_i) e que o compartimento venoso e do tecido estão em equilíbrio instantâneo, tem-se que:

$$C_i = \frac{Q_i}{V_i} = \lambda_i C_v \quad [2]$$

sendo λ_i o coeficiente de partição sangue-tecido. Com isto, a Eq. [1] pode ser reescrita da seguinte forma:

$$\frac{dC_i}{dt} = -\frac{\mathfrak{T}_i}{\lambda_i V_i} (C_i - \lambda_i C_a) \quad [3]$$

cuja solução, considerando uma concentração de traçador constante na rede arterial, revela um comportamento exponencial para a descrição da cinética do traçador.

2.1.2 Cinética dos traçadores intravasculares

O modelo de análise de traçadores intravasculares também se baseia na conservação de massa e teve início com a proposição do princípio do volume central:

$$\mathfrak{V} = \frac{V}{MTT} \quad [4]$$

sendo MTT (do inglês, *Mean Transit Time*) o tempo de trânsito médio. Muito embora o princípio do volume central seja válido independentemente do traçador utilizado para inferir a perfusão do tecido, as medidas da fração do volume e do MTT não são triviais para todas as situações. Para traçadores difusíveis, por exemplo, múltiplos compartimentos teriam que ser considerados, cada qual com seu respectivo MTT. Já no caso de traçadores intravasculares, um único compartimento é suficiente para descrever o sistema, uma vez que o volume relevante é o próprio volume sanguíneo e o MTT é o tempo médio para qualquer partícula atravessar os vasos sanguíneos de um determinado tecido. Conseqüentemente, os parâmetros necessários para a determinação da perfusão são, por si só, os parâmetros hemodinamicamente relevantes. A validade do princípio do volume central foi demonstrada em 1954 por Méier e Zierler (MEIER; ZIERLER, 1954), sendo que Zierler propôs, alguns anos depois, uma alternativa prática para determinação do volume sanguíneo, MTT e, conseqüentemente, da perfusão, através da injeção de traçadores intravasculares. Considerando que a dispersão das partículas, a perfusão e o volume são constantes

durante a medida, que não haja reservatórios de sangue estagnado, que o fluxo do marcador seja representativo do fluxo sanguíneo e que não haja recirculação do traçador antes da passagem da última partícula pelo sistema, Zierler mostrou que a área sob a curva representando a concentração do traçador na saída do sistema após uma injeção instantânea representa o volume sanguíneo, enquanto o primeiro momento da curva em questão representa o MTT. Com base nesses dois parâmetros, a perfusão pode, então, ser determinada. Zierler mostrou também que uma injeção com duração finita resulta em uma superestimação do MTT, uma vez que o MTT da injeção se soma diretamente ao MTT do tecido em consideração. Desta forma, a obtenção da curva representativa do tecido pode ser obtida através da deconvolução entre a curva obtida em resposta à injeção do traçador e a curva que descreve a própria injeção, também conhecida com função de entrada arterial (AIF, do inglês *Arterial Input Function*).

2.2 Métodos de imagem de perfusão

As medidas de perfusão requerem basicamente um traçador, um modelo para quantificação a partir da cinética do traçador e um método de detecção que permita o monitoramento da passagem do traçador através do tecido de interesse. Na presente seção, serão expostas as técnicas de imagem que permitem, com a resolução espacial necessária, a detecção dos traçadores em diferentes órgãos e, em particular, no cérebro.

2.2.1 CT

A tomografia computadorizada (CT, do inglês *Computed Tomography*) é uma técnica que utiliza uma reconstrução do tipo *back-projection* para a obtenção de

imagens bi- ou tridimensionais a partir da irradiação de raios-X em diferentes ângulos. A injeção de contrastes que atenuam o feixe de raios-X permite, por exemplo, medidas de perfusão utilizando a referida técnica. Essencialmente, dois métodos foram propostos utilizando, respectivamente, xenônio e iodo.

O xenônio é um gás estável comumente administrado via inalação (WINKLER *et al.*, 1977). O gás é livremente difusível e a perfusão pode ser quantificada utilizando a teoria de traçadores cinéticos (DRAYER *et al.*, 1978; GUR *et al.*, 1982; KALENDER *et al.*, 1991). As principais desvantagens deste método é o tempo relativamente longo de aquisição, o que requer boa cooperação do sujeito, a reduzida confiabilidade em casos de capacidade pulmonar reduzida, bem como a natureza farmacológica ativa do gás de xenônio, o que afeta o fluxo sanguíneo cerebral.

Já os agentes de contraste baseados em iodo são tipicamente intravasculares, exigindo, portanto, uma aquisição CT imediata para o monitoramento da passagem do traçador. A curva de evolução do traçador pode ser analisada utilizando o princípio do volume central e os mapas de perfusão, MTT e volume sanguíneo podem, a partir daí, ser determinados (AXEL, 1980; , 1983; WINTERMARK *et al.*, 2001). A aquisição relativamente mais curta se apresenta como uma vantagem sobre a técnica que utiliza xenônio. Entretanto, o risco de efeitos adversos devido aos agentes de contraste com base em iodo, embora pequeno, é a principal desvantagem do método (JAGER, 2000).

Nos últimos anos, evoluções tecnológicas culminaram no advento de equipamentos de CT que passaram a permitir a aquisição de imagens de múltiplos planos, cobrindo regiões anatômicas maiores, e com mais alta resolução espacial e

temporal (RYDBERG *et al.*, 2000), tornando a técnica ainda mais competitiva no que se refere à obtenção de imagens de perfusão.

2.2.2 SPECT

Como o próprio nome diz, SPECT (do inglês *Single Photon Emission Computed Tomography*) se baseia na emissão de um único fóton. A técnica se resume à injeção de um traçador radioativo, após a qual o fóton emitido é detectado por uma câmera giratória para raios gama. Comumente, três núcleos diferentes são usados como traçador para medidas de perfusão cerebral. Além dos tradicionais xenônio e iodo, o tecnécio também é utilizado na constituição de compostos que servem como traçadores.

Embora o SPECT utilizando ^{133}Xe permita a realização de medidas de perfusão, a velocidade necessária para a detecção do mesmo compromete a resolução espacial. Além disso, neste caso, a baixa energia dos raios gama compromete a qualidade das imagens (CATAFAU, 2001).

Dos compostos marcados com iodo e tecnécio, o ^{123}I -IMP, o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO e o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ECD são os mais utilizados para as medidas de fluxo sanguíneo (CATAFAU, 2001). A vantagem desses traçadores sobre o ^{133}Xe é a maior resolução e qualidade da imagem, uma vez que o tempo disponível para aquisição das imagens é maior. Além disso, imagens podem ser obtidas até duas horas após a injeção do traçador, uma vez que ocorre uma retenção estável do mesmo no tecido. Entretanto, a rápida absorção do traçador, bem como sua limitada difusão, não permite a quantificação dos valores de perfusão.

Em geral, a resolução espacial obtida através da técnica SPECT é bastante baixa, o que representa uma significativa desvantagem quando comparada às demais técnicas aqui discutidas.

2.2.3 PET

Assim como no caso de SPECT, a tomografia por emissão de pósitrons (PET, do inglês *Positron Emission Tomography*) também se baseia na emissão de raios gama. Entretanto, neste caso, os raios gama não são emitidos diretamente. Ao invés disso, pósitrons são emitidos e, através de uma reação conhecida por aniquilação, dão origem a dois fótons, com energias aproximadas de 511keV, emitidos em direções opostas. Esta energia, somada à detecção coincidente dos dois fótons emitidos, faz com que PET apresente uma resolução espacial maior quando comparada com SPECT (HOFFMAN; COLEMAN, 1992).

Uma grande variedade de traçadores pode ser utilizada para a obtenção de imagens de perfusão utilizando PET, destacando-se, por exemplo, o H_2^{15}O , e o C^{15}O_2 . O primeiro é injetável, enquanto o segundo é administrado via inalação. Com o C^{15}O_2 , a análise dos dados pode seguir uma abordagem baseada em um estado estacionário, de forma que se torna necessário apenas a determinação de uma única AIF para que seja possível quantificar o CBF. Já no caso do H_2^{15}O , uma amostragem completa da AIF é necessária. O modelo de traçadores cinéticos pode, então, ser combinado com o princípio do volume central para quantificar a perfusão após a injeção do traçadores mencionados. Entretanto, sabe-se que a água apresenta algumas limitações de difusão no cérebro (EICHLING *et al.*, 1974;

RAICHLE *et al.*, 1983) e, portanto, para uma quantificação precisa, é necessária a correção do modelo para incluir esta extração limitada.

2.2.4 MRI

As técnicas de imagens por RM (MRI, do inglês *Magnetic Resonance Imaging*) formam a base para os métodos de medida *in vivo* de perfusão desenvolvidos mais recentemente (ROSEN *et al.*, 1989; ROSEN *et al.*, 1990; DETRE *et al.*, 1992; WILLIAMS *et al.*, 1992). No caso de RM, a medida de perfusão pode ser feita utilizando tanto agentes de contraste exógenos como endógenos. Dentre as vantagens das técnicas de RM, destaca-se a segurança que a irradiação de rádio frequência representa quando comparada com as técnicas discutidas anteriormente. Além disso, os traçadores utilizados em RM são mais seguros e a resolução espacial obtida é melhor ou, nos piores casos, semelhante à obtida com as técnicas concorrentes.

Nas seções seguintes, serão abordados os princípios básicos do fenômeno de RM e as principais técnicas desenvolvidas, utilizando imagens por RM, para medidas de perfusão.

3 Ressonância Magnética

Ressonância magnética é uma técnica baseada nas propriedades magnéticas do núcleo atômico. Quando submetido a um campo magnético externo, o núcleo pode ser observado pela absorção e emissão de radiação eletromagnética. Em 1945, Purcell, Torrey e Pound (PURCELL *et al.*, 1946), no MIT, e Bloch, Hansen e Packard (BLOCH *et al.*, 1946), em Stanford, simultaneamente, mas, independentemente, descreveram o fenômeno de RM. Em reconhecimento, Purcell e Bloch dividiram, em 1952, o prêmio Nobel da Física.

Até então, RM era, simplesmente, uma técnica para determinação de momentos magnéticos nucleares de diferentes núcleos. Entretanto, em 1950, RM começa a se tornar uma das mais poderosas técnicas de espectroscopia com a descoberta de que núcleos de uma mesma molécula absorvem energia em diferentes frequências de ressonância (PROCTOR; YU, 1950).

Duas décadas depois de sua descoberta, a técnica de RM sofre sua principal evolução com a introdução da RM pulsada combinada com transformadas de Fourier (FT, do inglês *Fourier Transform*) (ERNST; ANDERSON, 1966). Já em 1973, Lauterbur e Mansfield, independentemente, descreveram os primeiros resultados de

imagens *in vivo* por RM. Aplicando um campo magnético dependente da posição, juntamente com o campo magnético estático, eles foram capazes de reconstruir a distribuição espacial dos spins em forma de uma imagem. Por esta contribuição extremamente relevante, principalmente no que se refere à utilização de MRI em ambiente clínico, Lauterbur e Mansfield dividiram o Prêmio Nobel de Medicina de 2003.

Nas seções a seguir, serão discutidos alguns princípios básicos da teoria de RM com ênfase nos conceitos mais fundamentais necessários à compreensão do presente trabalho. Na sequência, serão expostos os principais métodos desenvolvidos utilizando imagens por RM para medidas de perfusão.

3.1 Propriedades do núcleo atômico

Grande parte dos núcleos atômicos possui momento angular intrínseco, também denominado spin, o que os leva a se comportar, basicamente, como um giroscópio. Como este núcleo também possui carga elétrica, um campo magnético é produzido na direção do seu eixo de rotação. Este comportamento magnético de um conjunto de átomos é denominado magnetismo nuclear e é caracterizado pelo momento magnético, μ , que só pode assumir determinados valores impostos pela quantização do momento angular (L), ou seja:

$$\mu = \gamma L = \gamma \hbar S \quad [5]$$

sendo γ a razão giromagnética, que é única para cada núcleo e reflete a força das propriedades magnéticas das espécies nucleares, $\hbar$ a unidade natural do momento angular, dada por $\frac{h}{2\pi}$, em que h é a constante de Planck, e S o spin nuclear.

Os principais constituintes do núcleo atômico são os prótons e os nêutrons e ambos possuem spin $\frac{1}{2}$. Como o spin resultante do núcleo é dado pela soma vetorial desses constituintes, tem-se que núcleos com números ímpares de prótons e nêutrons possuem spin resultante inteiro. Já os que têm números pares de prótons e nêutrons possuem spin resultante nulo e aqueles que apresentam número par de um dos constituintes, e ímpar do outro, possuem spin resultante semi-inteiro, que são os que, efetivamente, interessam em RM.

Em particular, núcleos com spin $\frac{1}{2}$ recebem atenção especial, pois apresentam distribuição de carga com simetria esférica, cujas propriedades são similares às de dipolos magnéticos. Quando um núcleo é colocado na presença de um campo magnético estático, B_0 , a interação entre este campo e o momento magnético faz com que ocorra um desdobramento dos níveis de energia do núcleo. Esta interação é descrita pelo seguinte operador hamiltoniano, conhecido por hamiltoniano de interação Zeeman:

$$H = -\mu B_0 \quad [6]$$

Usando a Eq. [5] e definindo, como geralmente se faz, o sistema de coordenadas de tal forma que o campo estático aponte na direção z (direção de quantização), tem-se:

$$H = -\gamma \hbar S_z B_0 \quad [7]$$

cujos autovalores, dados pela Eq. [8], fornecem as possíveis energias para o sistema.

$$E = -m \gamma \hbar B_0, m = S, S-1, \dots, -S \quad [8]$$

Desta forma, para um sistema com spin $\frac{1}{2}$, existem dois estados possíveis, um paralelo e outro antiparalelo ao campo externo, cujos níveis de energia são, respectivamente, dados por:

$$E_- = -\frac{1}{2}\gamma \hbar B_0 \quad [9]$$

$$E_+ = \frac{1}{2}\gamma \hbar B_0 \quad [10]$$

Segundo a estatística de Boltzmann, existe uma predisposição do sistema, quando em equilíbrio térmico, em acomodar uma parcela maior de spins no estado de mais baixa energia, ou seja, paralelo ao campo. Nesta condição, a razão que reflete a distribuição dos spins é dada por:

$$\frac{N_p}{N_a} = \exp\left(\frac{\gamma \hbar B_0}{K_b T}\right) \quad [11]$$

sendo N_p e N_a , respectivamente, o número de núcleos com spins alinhados paralela e antiparalelamente ao campo externo, K_b é a constante de Boltzmann e T é a temperatura do sistema (Figura 1).

Figura 1: Esquema de transição entre os possíveis níveis de energia para um núcleo com spin $\frac{1}{2}$ ilustrando a diferença de população entre os níveis na condição de equilíbrio térmico.

Valores típicos de campo ($\sim 1\text{T}$ em ambientes clínicos) e temperatura ($\sim 310\text{K}$ em seres humanos) revelam que a razão da população entre os possíveis estados no caso do hidrogênio (^1H), por exemplo, é, aproximadamente, 1.00000659, o que demonstra que imagens de RM são adquiridas de uma parcela bastante pequena do número total de spins.

Retomando as equações [9] e [10] nota-se que, para que haja transição de nível de energia no sistema em questão, é necessário que seja fornecido ao mesmo uma energia dada por:

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 \quad [12]$$

Entretanto,

$$\Delta E = h \nu = \hbar \omega_0 \quad [13]$$

Combinando as equações [12] e [13], tem-se:

$$\omega_0 = \gamma B_0 \quad [14]$$

que é a chamada condição de ressonância para que haja transição entre os níveis de energia. Esta frequência, conhecida como frequência de Larmor, é de fundamental importância em RM.

O tratamento adotado até aqui é bastante rigoroso, mas o fato de a constante de Planck desaparecer na Eq. [14] sugere que um tratamento clássico possa ser adotado. A descrição clássica do fenômeno de RM tem a vantagem de ilustrar, com maior clareza, o comportamento dos spins (Figura 2).

Figura 2: Movimento de precessão de um núcleo com momento magnético μ na presença de um campo magnético B_0 .

Classicamente, quando um núcleo é colocado na presença de um campo magnético externo e estático, o momento magnético sofre um torque, τ , que tenta alinhá-lo à direção do campo, dado por:

$$\tau = \mu \times B_0 \quad [15]$$

A equação de movimento é obtida igualando-se o torque à taxa de variação do momento angular, ou seja:

$$\tau = \frac{dL}{dt} \quad [16]$$

Usando as equações [5] e [15], podemos reescrever a Eq. [16]:

$$\frac{d\mu}{dt} = \mu \times (\gamma B_0) \quad [17]$$

que é a equação que descreve um movimento de precessão uniforme do momento magnético em torno do campo externo com frequência, ω_0 , dada por:

$$\omega_0 = \gamma B_0 \quad [18]$$

Desta forma, recuperamos, utilizando um tratamento clássico, a Eq. [14] que nos fornece a frequência de Larmor.

Pode-se notar, com base na Eq. [17], que o tratamento clássico adotado sugere um método bem simples de analisar o fenômeno de ressonância magnética de núcleos atômicos, considerando um núcleo isolado precessionando em torno de um campo estático. Entretanto, na prática, existe um número grande de núcleos da mesma espécie e, como visto anteriormente, uma ligeira diferença na quantidade dos que precessionam alinhados paralela e antiparalelamente ao campo externo. Desta forma, é interessante estudá-los através do seu comportamento macroscópico, dado pela resultante da soma vetorial dos momentos magnéticos de todos esses núcleos, que dá origem a uma componente longitudinal de magnetização, descrita por:

$$M_0 = \sum_i \mu_i \quad [19]$$

Por outro lado, embora os prótons precessionem em torno do campo estático com a mesma frequência, eles não precessionam de forma coerente. Em outras palavras, a orientação desses prótons está randomicamente distribuída ao redor do seu eixo de precessão, o que resulta numa magnetização transversal nula.

3.2 Equações de Bloch

Na seção anterior, tratamos da evolução do dipolo magnético livre. Entretanto os momentos magnéticos nucleares contidos na matéria estão sujeitos à agitação térmica, bem como à flutuação do campo magnético local devido aos momentos magnéticos nucleares vizinhos, fazendo com que a magnetização total da matéria em questão sofra alterações em sua dinâmica além daquela determinada pelo

campo estático externo. Assim, torna-se necessário corrigir a Eq. [17] para que esses efeitos sejam incorporados.

Com base nisto, em 1946, Bloch propôs o seguinte modelo fenomenológico para a dinâmica da magnetização (BLOCH *et al.*, 1946):

$$\frac{dM(t)}{dt} = M(t) \times \gamma B(t) - \frac{M_x(t)\hat{i} + M_y(t)\hat{j}}{T_2} + \frac{M_0 - M_z(t)}{T_1}\hat{k} \quad [20]$$

sendo M_0 o módulo da magnetização, $M(t)$, em equilíbrio, M_x , M_y e M_z as componentes x, y e z da magnetização e T_1 e T_2 , respectivamente, os tempos de relaxação longitudinal e transversal.

3.3 Relaxação

Supondo que um pulso de rádio frequência (RF) de excitação atue sobre uma magnetização de equilíbrio $M = M_0\hat{k}$, com um campo estático, $B(t) = B_0\hat{k}$, a magnetização imediatamente após a perturbação é $M(t=0) = M_0\hat{j}'$, definida em um referencial girante com a frequência de Larmor. Com esta condição inicial, a Eq. [20] pode ser resolvida, resultando nas seguintes equações:

$$\begin{aligned} M_x'(t) &= M_0 e^{-\frac{t}{T_2}} \\ M_y'(t) &= M_0 e^{-\frac{t}{T_2}} \\ M_z'(t) &= M_0 \left(1 - e^{-\frac{t}{T_1}} \right) \end{aligned} \quad [21]$$

da qual se pode verificar que a magnetização decai exponencialmente devido a dois processos distintos de relaxação. O primeiro deles recebe o nome de relaxação

longitudinal ou relaxação spin-rede e é caracterizado pelo tempo de relaxação longitudinal ou T_1 , que é, por definição, o tempo para que 63% da componente longitudinal da magnetização retorne à condição de equilíbrio (Figura 3). Este processo de relaxação reflete o fato de que a magnetização, uma vez trazida ao plano transversal pelo pulso de RF, retorna lentamente à condição de equilíbrio térmico se alinhando ao campo principal. Isto ocorre devido à dissipação de energia dos núcleos no seu próprio meio atômico e molecular, ou seja, a rede. O segundo processo de relaxação, que atua no sistema de forma bem mais rápida que o primeiro, recebe o nome de relaxação transversal ou spin-spin e é caracterizado pelo tempo de relaxação transversal ou T_2 (Figura 3). Neste caso, uma vez no plano transversal, os núcleos começam a perder coerência de fase devido à interações com núcleos vizinhos e, desta forma, a magnetização transversal é continuamente reduzida, decaindo, rapidamente, a zero.

Figura 3: Retorno das componentes de magnetização longitudinal e transversal à condição de equilíbrio após um pulso de excitação.

Na realidade, a defasagem dos momentos magnéticos, que resulta na diminuição da componente transversal da magnetização, é uma combinação dos efeitos da interação entre núcleos vizinhos com os efeitos de inhomogeneidade do

campo estático. Portanto, o decaimento efetivamente observado é caracterizado por uma nova grandeza denominada T_2^* (T_2 estrela) e que, normalmente, é consideravelmente menor que T_2 .

Os valores dos tempos de relaxação T_1 e T_2 dependem, basicamente, da espécie nuclear e da composição química do tecido e, tipicamente, $T_1 > T_2 > T_2^*$.

Expostos os conceitos básicos do fenômeno de RM, a parte de formação de imagens e maiores detalhes, por exemplo, sobre técnicas espectroscópicas, serão deixados a cargo do leitor e podem ser consultados na vasta literatura da área.

3.4 Imagens de perfusão por RM

O CBF pode ser determinado a partir da análise da cinética de um agente marcador, enquanto o mesmo se encontra em estado de perfusão no cérebro. Como discutido anteriormente, metodologias como PET ou SPECT, por exemplo, utilizam marcadores administrados de forma exógena. Apesar da alta sensibilidade e robustez na quantificação, essas técnicas são invasivas e sua resolução espacial é limitada pela quantidade reduzida de marcadores, quando comparada ao tamanho do cérebro. Além disso, essas técnicas dificultam medidas repetitivas do CBF, limitando, significativamente, as aplicações em que informações dinâmicas são de interesse. Com base nos mesmos princípios, tiveram origem as técnicas de detecção de marcadores usando RM. Neste caso, a medida de perfusão pode ser feita utilizando tanto agentes de contraste exógenos como endógenos. A segurança que a irradiação de RF representa quando comparada às técnicas concorrentes constitui umas das vantagens de utilizar RM no estudo de perfusão. Além disso, os traçadores disponíveis para utilização com a técnica são menos agressivos e a resolução espacial alcançada se equipara à das melhores concorrentes.

3.4.1 RM utilizando agentes de contraste

Dois tipos distintos de contraste exógeno podem ser utilizados para medida de perfusão utilizando RM. O primeiro deles é formado pelo grupo de agentes de contraste que podem ser diretamente detectados por técnicas espectroscópicas, uma vez que apresentam frequências de Larmor diferentes da água (como, por exemplo, $^2\text{H}_2\text{O}$ (ACKERMAN *et al.*, 1987)). Por outro lado, existe o grupo de agentes de contraste que podem ser indiretamente detectados pelo efeito que eles têm sobre o sinal da água como, por exemplo, o gadolínio (VILLRINGER *et al.*, 1988), que dentre os agentes de contraste injetáveis, é o mais utilizado em ambiente clínico e estudos de perfusão utilizando RM. Seus compostos podem ser utilizados de diferentes maneiras para a determinação de parâmetros hemodinâmicos. Mudanças no contraste por T_1 podem ser utilizadas para quantificar a cinética do derrame através da barreira sangue-cérebro e em tumores (TOFTS; KERMODE, 1991). Além disso, após a injeção do gadolínio e sua conseqüente distribuição no compartimento vascular, a redução em T_1 é diretamente proporcional ao volume sanguíneo cerebral (CBV, do inglês *Cerebral Blood Volume*) (BELLIVEAU *et al.*, 1990). Fora isto, mudanças em T_2 ou T_2^* durante a passagem através do sistema vascular podem ser analisadas utilizando o princípio do volume central de forma a fornecer informação sobre os parâmetros hemodinâmicos.

No final da década de 80, uma descrição formal da técnica que analisa mudanças no sinal de RM causadas por uma injeção rápida de gadolínio, atualmente conhecida por DSC-MRI (do inglês *Dynamic Susceptibility Contrast MRI*), foi realizada (VILLRINGER *et al.*, 1988). Os primeiros experimentos em animais e humanos utilizando este conceito datam de 1990 (BELLIVEAU *et al.*, 1990; ROSEN *et al.*, 1990). O modelo de análise dos dados obtidos usando a referida técnica

assume que as mudanças em T_2^* são lineares com a concentração local de gadolínio. Esta relação linear permite que a perfusão seja quantificada a partir do princípio do volume central. Para isto é necessário determinar as mudanças no sinal do tecido e a AIF e, com base nessas duas informações, pode-se determinar a curva que descreve a evolução da taxa de relaxação de T_2^* . A resposta do tecido pode então ser obtida através da deconvolução entre esta curva e a AIF e, a partir de então, pode-se determinar os valores de CBF, CBV e MTT combinando a teoria dos traçadores cinéticos e o princípio do volume central.

A maior dificuldade do modelo está em determinar a AIF com precisão e, desta forma, obter uma curva de resposta do tecido que efetivamente reflita apenas o efeito correspondente ao tecido. Isto demanda uma aquisição tridimensional ou pelo menos a aquisição de uma segunda imagem em uma posição deslocada com relação à primeira, o que é feito à custa da redução na resolução temporal. Especialmente em pequenos animais, nos quais a passagem do agente de contraste é muito rápida, a diminuição da resolução temporal pode ser significativa e comprometer a qualidade dos dados. Nestes casos, a alternativa é a obtenção de valores relativos dos parâmetros hemodinâmicos rCBF, rCBV, rMTT, obtidos a partir do ajuste da curva que representa a taxa de relaxação a uma função conhecida.

Comumente, usa-se uma função Gama variável uma vez que a mesma descreve com bastante fidelidade a passagem de um traçador intravascular desde que não haja recirculação (THOMPSON *et al.*, 1964). O primeiro momento da função Gama variável é proporcional ao MTT, enquanto a área sob a curva é proporcional ao CBV. A partir do princípio do volume central, pode-se, então, determinar o valor relativo de CBF.

Muito embora abordagens qualitativas tenham sido aplicadas em diferentes estudos e descrevam mudanças na hemodinâmica cerebral relativamente bem, elas fornecem apenas uma estimativa grossa dos parâmetros hemodinâmicos (WEISSKOFF *et al.*, 1993). A obtenção desses parâmetros é confiável somente nos casos em que a AIF é suficientemente uniforme para os tecidos considerados (PERTHEN *et al.*, 2002).

3.4.2 RM utilizando contraste endógeno

A sensibilidade de RM ao sinal de prótons, bem com a abundância de prótons no organismo, combinado com as propriedades paramagnéticas da deoxi-hemoglobina, tornaram a RM uma modalidade de imagens ideal para observar a movimentação da água, ou mesmo do sangue, sem a necessidade da utilização de contrastes exógenos.

No início dos anos 90, foi proposta a utilização do contraste BOLD (do inglês *Blood Oxygenation Level Dependent*) como marcador de atividade cerebral (OGAWA *et al.*, 1990). Esta metodologia se baseia na diferença de susceptibilidade magnética entre a hemoglobina oxigenada e desoxigenada. Durante a execução de alguma tarefa, o consumo de oxigênio no cérebro aumenta localmente. Entretanto, isto é compensado por um aumento no CBF e no CBV. Conseqüentemente, a concentração de deoxi-hemoglobina diminui significativamente dando origem a um aumento no sinal de RM conhecido como efeito BOLD.

A concentração de deoxi-hemoglobina e, por conseqüência, o sinal BOLD, depende de vários fatores, como, por exemplo, CBF, CBV, taxa metabólica de oxigênio, hematócritos e saturação de oxigênio arterial, o que complica a quantificação de parâmetros hemodinâmicos utilizando a técnica. Tentativas no

sentido de estabelecer um modelo quantitativo para a técnica foram feitas, mas a aplicabilidade se restringiu a um período bem descrito de hipóxia (VAN ZIJL *et al.*, 1998).

Atualmente, BOLD é a técnica mais utilizada para o estudo da resposta hemodinâmica funcional e sua descoberta contribuiu e ainda contribui, significativamente, para o avanço da neurociência. Justamente por causa de sua descoberta e respectivo impacto, os anos 90 foram denominados a “década do cérebro”.

Também no início dos anos 90, um novo método para quantificação de perfusão utilizando RM foi proposto. ASL surgiu como uma proposta de utilização da água presente no sangue arterial como traçador endógeno para perfusão. Seu princípio se baseia na diferenciação entre os spins fluindo com o sangue e os estacionários. Considerando que os spins intravasculares magneticamente marcados atingem os capilares e realizam a troca com o tecido, torna-se possível a obtenção de imagens cujo contraste seja proporcional à perfusão. Nas duas últimas décadas, uma série de seqüências utilizando esses princípios foi desenvolvida e podem ser agrupadas em dois grupos, dependendo de como a marcação dos spins é realizada: ASL pulsada (PASL, do inglês *Pulsed ASL*) e ASL contínua (CASL, do inglês *Continuous ASL*). No próximo capítulo, serão discutidos os princípios gerais desta técnica e as características principais das seqüências enquadradas em cada um desses grupos.

4 Arterial Spin Labeling

Arterial spin labeling é uma técnica completamente não invasiva que permite o monitoramento quantitativo da perfusão cerebral durante um longo período de tempo. Sua característica não invasiva permite que medidas sejam repetidas inúmeras vezes com uma resolução temporal limitada exclusivamente pela SNR necessária para garantir uma boa precisão na determinação dos valores de CBF. Desta forma, ASL tem se provado, juntamente com outras técnicas de ressonância magnética, uma excelente ferramenta para estudos relacionados a problemas vasculares cerebrais (WINTERMARK *et al.*, 2005).

Os princípios de ASL se baseiam na utilização da água presente no sangue arterial como um traçador endógeno para perfusão. A quantidade do traçador presente no cérebro é determinada através da alteração que a magnetização M_a desta água marcada produz na magnetização M_b da água presente inicialmente no tecido cerebral, processo este representado na Figura 4.

Figura 4: Ilustração esquemática do caminho percorrido pela água presente no sangue arterial para a realização das trocas entre o compartimento vascular e o tecido, trocas estas que ocorrem no nível dos capilares.

A descrição deste processo pode ser feita, simplesmente, incorporando-se à componente longitudinal das equações de Bloch, definidas anteriormente, termos que descrevam este fluxo. Assim, a equação pode ser escrita da seguinte forma:

$$\frac{dM_b(t)}{dt} = \frac{M_b^0 - M_b(t)}{T_1} + CBF (M_a(t) - M_v(t)) \quad [22]$$

sendo M_b a magnetização longitudinal por grama de tecido cerebral, M_b^0 o valor de M_b na situação completamente relaxada, T_1 o tempo de relaxação longitudinal da água presente no cérebro na ausência de fluxo, CBF o fluxo sanguíneo cerebral definido em ml/100g/min, e M_a e M_v , respectivamente, as magnetizações longitudinais por ml de sangue arterial e venoso. Supondo que a água seja um marcador que pode se difundir livremente, tem-se que (HOOD, 1987):

$$M_v(t) = \frac{M_b(t)}{\lambda} \quad [23]$$

sendo λ o coeficiente de partição cérebro-sangue para a água, definido da seguinte forma:

$$\lambda = \frac{\text{quantidade de água / g de tecido cerebral}}{\text{quantidade de água / ml de sangue}} \quad [24]$$

Supondo o modelo de compartimento bem misturado, a quantidade de água deixando o cérebro pelo sistema venoso, em uma situação de equilíbrio, deve ser a mesma quantidade trazida através da vasculatura arterial, ou seja:

$$M_a^0 = M_v^0 = \frac{M_b^0}{\lambda} \quad [25]$$

sendo M_a^0 o valor de M_a na situação completamente relaxada. Desta forma, a Eq. [22] pode ser reescrita da seguinte forma:

$$\frac{dM_b(t)}{dt} = \frac{M_b^0 - M_b(t)}{T_{1app}} - 2\alpha(t) \frac{CBF}{\lambda} M_b^0 \quad [26]$$

sendo T_{1app} o tempo de relaxação longitudinal aparente para a água presente no tecido no caso em que existe perfusão e $\alpha(t)$ o grau de marcação, definidos, respectivamente, como:

$$\frac{1}{T_{1app}} = \frac{1}{T_1} + \frac{CBF}{\lambda} \quad [27]$$

$$\alpha(t) = \frac{M_a^0 - M_a(t)}{2M_a^0} \quad [28]$$

A Eq. [26] revela alguns pontos importantes sobre a quantificação dos valores de CBF através da técnica ASL. Um deles é que para alterar o estado de magnetização do tecido cerebral, é necessário que o sangue seja marcado, ou seja, $\alpha(t)$ tem que ser diferente de zero. Além disso, a taxa de perfusão não muda a magnetização do cérebro de forma instantânea, mas sim com uma constante de tempo determinada por T_{1app} . Finalmente, como o CBF em humanos é da ordem de

60ml/100g/min, por exemplo, $\text{CBF} / \lambda \approx 0.01$, o que é muito pequeno para alterar $T_{1\text{app}}$ de tal maneira que seja possível obter uma medida de CBF confiável a partir de alterações nas taxas de relaxação.

4.1 PASL

Na técnica PASL, um volume relativamente grande de sangue arterial é dinamicamente marcado numa região próxima à de interesse. Após um determinado período de tempo, a partir do início da marcação dos spins, adquire-se um conjunto de imagens cuja magnetização é proporcional à quantidade de água com spins marcados que fluiu para região.

Duas abordagens distintas foram propostas para a realização do esquema de marcação dos spins usando a técnica PASL: a) FAIR (do inglês *Flow-Sensitive Alternating Inversion Recovery*) (KWONG *et al.*, 1992; KIM, 1995; KWONG *et al.*, 1995; SCHWARZBAUER *et al.*, 1996) e b) EPISTAR (do inglês *Echo Planar Imaging and Signal Targeting with Alternating Radio Frequency*) (EDELMAN *et al.*, 1994). Na primeira delas, a imagem marcada é adquirida após uma inversão seletiva, enquanto as imagens controles são adquiridas após uma inversão não seletiva. Já em EPISTAR, a imagem marcada é adquirida após a saturação do tecido, seguida pela inversão dos spins fluindo para a região de interesse. As imagens controle, por outro lado, são adquiridas na mesma condição, exceto pelo fato de que a inversão é realizada numa posição equidistante acima da região da imagem (Figura 5).

Figura 5: Diagrama mostrando as duas abordagens pulsadas da técnica ASL. Em ambos os casos a situação de marcação (esq.) e controle (dir.) estão representadas.

Apesar dessas diferenças básicas existentes no esquema de aquisição, a magnetização resultante da diferença entre as imagens marcadas e controle, em ambos os casos, apresenta um decaimento bi-exponencial dado por (PELL *et al.*, 1999):

$$\begin{aligned} \Delta M(TI) &= M_{SS}(TI) - M_{NS}(TI) = \\ &= 2M_b^0 \alpha_0 \frac{CBF}{\lambda} e^{-\delta/T_{1a}} \left[\frac{e^{-(TI-\delta)/T_{1app}} - e^{-(TI-\delta)/T_{1a}}}{\frac{1}{T_{1a}} - \frac{1}{T_{1app}}} \right] \end{aligned} \quad [29]$$

sendo ΔM a diferença da magnetização das imagens obtidas após um tempo TI com inversão seletiva e não-seletiva, respectivamente, e δ o tempo de trânsito.

Na prática, dois são os fatores importantes para uma quantificação precisa através da técnica FAIR (CALAMANTE *et al.*, 1996). Esses fatores estão relacionados, por um lado, ao quão sensível ao fluxo a técnica pode ser no momento

da aquisição seletiva e, por outro lado, ao quão insensível a mesma pode ser durante a aquisição não seletiva.

No primeiro caso, supõe-se que a imagem seletiva seja sensível a qualquer fluxo, independente do valor de TI utilizado. Isto significa que para fluxos baixos, a inversão dos spins deveria ser feita numa região cuja espessura fosse exatamente a mesma do plano da imagem. Entretanto, na prática, a região de marcação é mais extensa (da ordem de 3:1 (KIM, 1995)) que o plano da imagem, de modo a eliminar os efeitos de imperfeição no perfil dos pulsos utilizados. Este processo introduz um tempo extra durante o qual parte do sangue que atinge a região da imagem não está efetivamente marcado. Isto causa uma redução no grau de marcação da imagem obtida após a inversão seletiva e resulta, assim, em uma subestimação do valor de CBF. Em estudos com pequenos animais, este não é um problema muito crítico e, na grande maioria dos casos, é desprezado, dado que, em situações normais, o fluxo dos spins entre a região de marcação e de imagem é praticamente instantâneo (TSEKOS *et al.*, 1998).

Por outro lado, assume-se que a imagem não seletiva apresente apenas uma pequena componente de fluxo, o que é válido dependendo da diferença entre T_{1a} e T_1 . Esta condição, na prática, só é válida no caso de uma real inversão global, o que só poderia ser efetivado utilizando uma bobina de corpo inteiro ideal. Assim, se a bobina utilizada não atua sobre todo o sujeito, a inversão não seletiva possui uma dada espessura, o que dá origem a um tempo, Δ , após o qual sangue não marcado começa a atingir a região da excitação (KIM, 1995; KIM *et al.*, 1997). Uma vez que isto ocorre, o sangue apresenta o mesmo estado de magnetização para ambos os casos, o obtido após inversão seletiva e não seletiva. Na prática, isto introduz um

limite superior na taxa de fluxo, que pode ser medida para um determinado TI (PELL *et al.*, 1999).

4.2 CASL

Historicamente, CASL foi a primeira forma de implementação de ASL (DETRE *et al.*, 1992; WILLIAMS *et al.*, 1992). Nesta técnica, ilustrada na Figura 6, a água arterial fluindo para o cérebro é continuamente saturada ($\alpha \approx 0.5$) ou invertida ($\alpha \approx 1.0$). Usualmente, dado o maior sinal gerado, opta-se pela utilização da inversão em detrimento à saturação. Desta forma, a maneira mais eficiente de realizar a inversão dos spins é baseada na técnica conhecida por *flow-driven adiabatic fast passage* (DIXON *et al.*, 1986). Neste caso, um pulso de RF de amplitude constante é aplicado, fora de ressonância, na presença de um gradiente ao longo da direção do fluxo. O *offset* de frequência do pulso de RF é determinado pela amplitude do gradiente e pela distância, ao centro do magneto, do plano de inversão. Os spins arteriais, que fluem com uma determinada velocidade ao longo do gradiente de marcação, sentem uma variação na frequência, análogo ao que acontece nos experimentos de RM de onda contínua. Ao passar pelo plano de marcação, esses spins sofrem uma inversão adiabática, que é mantida conforme eles continuam fluindo para fora do plano de marcação. Para que isto ocorra, entretanto, as seguintes condições devem ser respeitadas:

$$\frac{1}{T_{2a}} \ll \frac{G_{\text{marcação}} v}{B_1} \ll \gamma B_1 \quad [30]$$

sendo T_{2a} o tempo de relaxação transversal do sangue arterial, $G_{\text{marcação}}$, a amplitude do gradiente, v a velocidade dos spins e B_1 a intensidade do pulso de RF usado para marcação dos spins. Dentre as condições impostas pela Eq. [30], a mais importante

é a que o fluxo deve ser praticamente retilíneo ao longo da direção do gradiente de marcação de forma que a variação na frequência seja a maior possível. Em humanos, isto significa, por exemplo, que a marcação tem que ser feita abaixo do círculo de Willis (COW, do inglês *Circle of Willis*), onde as carótidas comuns e internas fluem na direção inferior-superior. Além disso, a condição para inversão só é satisfeita por artérias cuja velocidade do sangue seja alta o suficiente para permitir uma variação na frequência que seja considerada grande quando comparada aos tempos de relaxação do sangue arterial. Por outro lado, essas velocidades, quando comparadas à amplitude do pulso de RF utilizado, devem ser relativamente pequenas.

Figura 6: Diagrama da abordagem contínua da técnica ASL. Os esquemas de aquisição que dão origem às imagens marcadas (esq.) e de controle (dir.) estão representados.

Supondo, então, que os spins arteriais estejam entrando no cérebro com magnetização diferente da condição de equilíbrio:

$$M_a(t) = (1 - 2\alpha)M_a^0 \quad [31]$$

a Eq. [22] pode ser resolvida para a dependência temporal de M_b .

$$M_b(t) = M_b^0 T_{1app} \left(\frac{1}{T_{1b}} - (2\alpha - 1) \frac{CBF}{\lambda} + \frac{2\alpha CBF}{\lambda} e^{-t/T_{1app}} \right) \quad [32]$$

Na condição de controle ($\alpha = 0$) a magnetização M_b atinge um estado estacionário descrito por:

$$M_b^{ss1} = M_b^0 T_{1app} \left(\frac{1}{T_{1b}} + \frac{CBF}{\lambda} \right) \quad [33]$$

Já no caso em que potência é aplicada para realizar a marcação dos spins arteriais, a magnetização M_b atinge um novo estado estacionário, assumindo um valor M_b^{ss2} dado por:

$$M_b^{ss2} = M_b^0 T_{1app} \left(\frac{1}{T_{1b}} - (2\alpha - 1) \frac{CBF}{\lambda} \right) \quad [34]$$

Combinando as equações [33] e [34] pode-se obter a solução para determinação do CBF, uma vez que as grandezas λ , T_{1app} , α , M_b^{ss1} e M_b^{ss2} são mensuráveis, é dada por:

$$CBF = \frac{\lambda}{T_{1b}} \frac{M_b^{ss1} - M_b^{ss2}}{M_b^{ss2} + (2\alpha - 1)M_b^{ss1}} \quad [35]$$

Muito embora a implementação da abordagem contínua seja simples, alguns sistemas de RM não permitem que seus amplificadores de RF operem de forma contínua, o que se torna uma limitação para a implementação da técnica. Além disso, a marcação contínua pode causar uma considerável deposição de potência no sujeito. Muito embora a técnica já tenha sido aplicada em estudos com animais e humanos em sistemas de 11.7T e 7T, respectivamente, a taxa de absorção específica (SAR, do inglês *Specific Absorption Rate*) pode limitar a utilização clínica da metodologia em altos campos.

Apesar de apresentar melhor SNR que a técnica pulsada, CASL apresenta problemas relacionados com transferência de magnetização (WILLIAMS *et al.*, 1992;

ZHANG *et al.*, 1992; MCLAUGHLIN *et al.*, 1997). Isto ocorre porque a aplicação de um pulso de RF longo, fora de ressonância, causa saturação direta das macromoléculas do tecido cerebral. Uma vez saturada, essas macromoléculas trocam magnetização com a água livre presente no tecido, alterando tanto a magnetização de equilíbrio quanto o T_{1app} . Algumas alternativas foram propostas para contornar este problema que dificulta a determinação precisa do CBF, bem como a aquisição de múltiplos planos ou tridimensional (SILVA *et al.*, 1995; ZHANG *et al.*, 1995; ALSOP; DETRE, 1998; WANG *et al.*, 2005).

5 CASL: Implementação e Otimização

Nos últimos anos, foram propostas diferentes implementações para a medida de perfusão, utilizando tanto a abordagem contínua quanto a pulsada da técnica ASL. Como discutido anteriormente, no modo contínuo, a magnetização dos spins é invertida continuamente utilizando um pulso de RF constante de baixa potência, combinado a um gradiente longitudinal de marcação. A marcação seletiva dos spins da água arterial ocorre porque o *offset* de frequência da irradiação de RF é muito maior que a largura de banda da água presente no tecido. Em animais, por exemplo, a marcação é realizada na região do pescoço, aproximadamente a 2 cm do plano de aquisição, utilizando um gradiente da ordem de 1 G/cm. Desta forma, o *offset* de frequência, 8.5 kHz, é bem maior que a largura de banda do ^1H presente na água do tecido para um plano coronal de 2 mm de espessura (850 Hz). Entretanto, os spins de ^1H presentes nas macromoléculas do cérebro podem apresentar larguras de linha da ordem de 50 kHz (WOLFF; BALABAN, 1989), de maneira que a utilização de uma única bobina de RF

para a marcação e aquisição das imagens pode incorrer na saturação das macromoléculas na região de detecção, gerando contraste por transferência de magnetização (MTC, do inglês *Magnetization Transfer Contrast*) (WOLFF; BALABAN, 1989).

Efeitos de MTC podem ter influências adversas nas medidas de perfusão utilizando ASL já que a saturação das macromoléculas causa uma grande redução na intensidade do sinal da água presente no tecido. Em 4.7T, por exemplo, a utilização de um campo de RF de 100 mG, com um *offset* de 8.5 kHz com relação à frequência de ressonância da água, causa uma redução de 75% do sinal quando comparado à situação sem aplicação de RF (ZHANG *et al.*, 1992). Fora isto, os efeitos de MTC variam com a frequência (WOLFF; BALABAN, 1989), de forma que a correção para esses efeitos durante um experimento de ASL requer a aquisição de uma imagem de controle localizada em um plano simetricamente oposto ao plano de marcação, utilizando a mesma potência de RF do ciclo de marcação. Assim, a saturação das macromoléculas ocorre também durante a fase de controle. Entretanto, isto limita o mapeamento da perfusão a um único plano por vez, simetricamente centrado entre os planos de controle e marcação, com orientação restrita ao eixo perpendicular à direção do gradiente de marcação.

Uma alternativa para essas limitações é a utilização de uma bobina dedicada para a realização da marcação (SILVA *et al.*, 1995). Se a RF desta bobina não atinge fisicamente o tecido de interesse, os efeitos de MTC são eliminados. Com base nisto, o presente trabalho se focou na implementação e utilização da abordagem contínua de ASL utilizando uma bobina de marcação dedicada. Nas seções a seguir, serão descritos os sistemas de RM dedicados a estudos com animais e humanos, respectivamente, utilizados no presente trabalho. No caso

particular do sistema de animais, serão expostos os detalhes referentes à implementação da técnica CASL, bem como toda a caracterização e otimização da mesma. As particularidades da implementação de CASL no sistema para estudos com humanos serão brevemente expostas, uma vez que sua realização e completa caracterização ocorreram anteriormente à realização do presente trabalho (TALAGALA *et al.*, 2004).

5.1 O sistema de imagens por RM

5.1.1 Sistema para animais

Todos os experimentos utilizando animais foram conduzidos em um sistema de imagens composto por um magneto horizontal de 30 cm de diâmetro interno operando em 7T e um espectrômetro AVI (Bruker-Biospin Inc., Billerica, MA). O sistema possui, ainda, um conjunto de bobinas de gradiente capazes de gerar 450 mT/m (Resonance Research Inc., Billerica, MA). Uma bobina de transmissão do tipo gaiola, desenvolvida localmente, de 12 cm de diâmetro interno, e uma bobina receptora de superfície, operando em quadratura e anatomicamente desenvolvida para encaixar sobre a porção superior da cabeça do rato (RAPID Biomedical GmbH, Rimpar, Alemanha) foram utilizadas durante as sessões experimentais.

Para aquisição das imagens, os animais eram posicionados no magneto após terem sido anestesiados. Com o auxílio de uma imagem localizadora, a posição era corrigida de maneira que a região do bregma coincidisse com o centro do magneto. A bobina de marcação era posicionada aproximadamente 2 cm deslocada do centro do magneto e conectada ao segundo canal de transmissão de RF do espectrômetro. Sua posição era efetivamente determinada através da aquisição de uma imagem

sagital e outra coronal do pescoço do animal, adquiridas na condição em que a mesma era utilizada como transmissora. O centro do perfil do sinal longitudinal gerado pela bobina de marcação era, então, utilizado na aferição da posição.

Todas as bobinas foram equipadas com circuitos de desacoplamento ativo para minimizar a interferência entre bobinas durante os estágios de marcação e de aquisição das imagens, além de reduzir os efeitos de saturação da água na região de aquisição (ZHANG *et al.*, 1995).

5.1.2 Sistema para humanos

Os experimentos com humanos foram realizados em um sistema de corpo inteiro GE Signa de 3T equipado com um sistema de gradientes capazes de gerar até 40 mT/m e taxa de subida de 150 T/ms. Uma bobina de transmissão de corpo inteiro e uma bobina de cabeça de 8 canais foram utilizadas para aquisição das imagens.

A bobina de marcação (TALAGALA *et al.*, 2004) era posicionada sobre o pescoço do voluntário para inverter, de forma contínua, os spins da água do sangue arterial fluindo através das artérias carótidas e vertebrais, em ambos os lados do pescoço. A posição da bobina de marcação com relação ao isocentro do magneto era obtida com auxílio do sistema de posicionamento do magneto. Inicialmente, o laser era utilizado para definir o centro da região da imagem logo acima da sobrancelha do voluntário. Em seguida, o deslocamento do paciente para que o laser fosse posicionado no centro físico da bobina de marcação fornecia a informação a respeito da posição da bobina. Analogamente ao sistema utilizado em estudos animais, todas as bobinas foram equipadas com circuitos de

desacoplamento ativo para minimizar a interferência entre as mesmas e reduzir os efeitos de saturação da água na região de aquisição (TALAGALA *et al.*, 2004).

5.2 Bobina de marcação

Para os estudos realizados com animais, foi construída uma bobina do tipo borboleta sintonizada em 300.3 MHz constituída de dois *loops* retangulares de corrente (10 x 5 mm) com uma separação de 10 mm entre os centros dos *loops* e construídos a partir de uma chapa de cobre de 0.5 mm de espessura (Figura 7a).

Figura 7: a) Esquema da bobina de marcação indicando as dimensões físicas. Os espaços entre as placas de cobre representam elementos capacitivos. b) Diagrama do circuito utilizado na construção da bobina de marcação.

O circuito equivalente da bobina está mostrado na Figura 7b. Os *loops* individuais $L1$, $L2$ e $L3$ foram conectados em série com os capacitores $C1$, $C2$ e CT , utilizados para o ajuste da frequência e alimentados através dos capacitores de

casamento de impedância, CM e CB. Um diodo pin, D1, foi conectado em paralelo com o *loop* ressonante e chaveado ativamente entre os estados de transmissão (sintonizado) e isolamento (não sintonizado) e suas polarizações foram realizadas através dos *chokes* CH1 e CH2. Todos os componentes e a bobina foram construídos em uma placa de circuito impresso de lado único, de forma que nenhum plano de aterramento tenha sido utilizado. A fim de evitar reatâncias parasitas, todas as conexões foram mantidas as mais próximas possíveis. As correntes circulando nos dois *loops* possuem sentidos opostos, gerando um campo transversal B_1 no plano central da bobina. Para evitar contato com o animal, todo o circuito, incluindo a bobina, foi coberto com uma capa feita de Teflon (Figura 8).

Figura 8: Fotos da bobina de marcação utilizada nos experimentos com animais.

Para o estudo com humanos, foi usada uma bobina equivalente à utilizada para animais. Neste caso, porém, dois *loops* de corrente (66 x 45 mm) com centros separados por 120 mm entre si foram utilizados na construção da mesma. Maiores detalhes da bobina desenvolvida para utilização em humanos, incluindo sua caracterização, podem ser encontrados no trabalho publicado por Talagala e colaboradores (TALAGALA *et al.*, 2004).

5.3 Grau de marcação

O grau de marcação é uma grandeza importante na quantificação dos valores de CBF utilizando ASL, uma vez que está diretamente relacionado à diferença obtida no sinal do tecido nas condições de controle e marcação. A potência de RF utilizada para os experimentos foi otimizada de forma a produzir a maior eficiência de marcação possível, observando-se a intensidade do sinal nas artérias carótidas comum. Desta forma, implementamos, a partir de uma sequência *gradient-echo* convencional, um método que permitisse determinar o grau de marcação da bobina utilizada.

Após a realização da marcação dos spins por um período de 100 ms, uma série de imagens eram adquiridas num plano ligeiramente deslocado do plano central da bobina com os seguintes parâmetros: TE = 2.374 ms, TR = 106.5 ms, FOV = 25.6 x 25.6 mm² e matriz = 128x128. A potência de RF (0 - 5 W) aplicada à bobina de marcação foi alterada a cada repetição e o grau de marcação foi determinado para cada valor de potência utilizando a seguinte equação:

$$\alpha = \alpha_0 e^{-\tau/T_{1a}} = \frac{M_a - M_a^0}{2M_a^0} \quad [36]$$

sendo α_0 é o grau de marcação no plano de marcação, τ é o tempo de trânsito entre o plano de marcação e o plano da imagem, T_{1a} é o tempo de relaxação longitudinal dos spins arteriais, M_a e M_a^0 correspondem a intensidade do sinal nas carótidas com e sem potência aplicada, respectivamente.

A Figura 9a mostra imagens representativas adquiridas na região do pescoço após a marcação dos spins arteriais utilizando diferentes potências de RF. Da esquerda para a direita, as imagens correspondem a potências de marcação de 0,

0.1, 0.5, e 5.0 W, respectivamente. Conforme a potência de RF aumenta, menor é a intensidade do sinal obtido nas carótidas internas, o que significa que os spins da água do sangue fluindo através do plano de marcação estão sendo afetados, de forma a deixar a região com um ângulo de *flip* cada vez maior. A última imagem selecionada mostra um sinal intenso, pois apesar do ângulo de *flip* ser maior que 90°, as imagens demonstradas foram geradas utilizando-se a magnitude do sinal.

Figura 9: Imagens representativas na região do pescoço obtidas após a utilização de diferentes potências de RF para a realização da marcação dos spins. Da esquerda para a direita, as imagens representativas correspondem a potências de marcação de 0, 0.1, 0.5, e 5.0 W, respectivamente. As carótidas internas estão destacadas nas imagens. b) Dependência do grau de marcação com relação à potência de RF utilizada para marcação dos spins arteriais.

A Figura 9b mostra o comportamento da eficiência de marcação conforme a potência de RF aumenta. Como se pode ver, os dados indicam que, para esta bobina de marcação, utilizada em todos os experimentos com animais, uma potência mínima de 2 W é necessária para se obter uma eficiência de marcação de $75 \pm 2\%$ na região do pescoço.

5.4 Mapas de T_1

Outro parâmetro importante na quantificação da perfusão utilizando ASL são os valores dos tempos de relaxação longitudinal (T_1). Mapas de T_1 foram obtidos utilizando uma seqüência EPI (do inglês *Echo Planar Imaging*) inversão-recuperação bidimensional. Com este método, a magnetização, M_0 , é invertida e relaxa durante um tempo, τ , denominado tempo de inversão, após o qual é medida aplicando-se um pulso de excitação. A evolução temporal da magnetização é dada por:

$$M = M_0 \left(1 - 2e^{-\tau/T_1} + cte \right) \quad [37]$$

Assim, T_1 pode ser determinado pelo *fitting* da curva de magnetização ou, simplesmente, pelo cálculo direto de $T_1 = \tau_0 / \ln(2)$, sendo τ_0 o valor de τ quando $M = 0$. No presente trabalho, os mapas de T_1 foram obtidos a partir do *fitting* da curva de relaxação realizado *pixel a pixel*.

As imagens foram obtidas com uma resolução espacial de 267 μm num plano de 750 μm de espessura utilizando os seguintes parâmetros: TE = 38 ms, TR = 9400 ms, FOV = 25.6 x 25.6 mm, matriz = 96 x 96, 4 médias. Para compor a curva de relaxação, 30 imagens com tempos de inversão variando de 300 ms a 9000 ms foram adquiridas. O *fitting* dos três parâmetros da equação [37] foi realizado utilizando Matlab R2006a (The MathWorks, Natick, MA, USA).

Figura 10: Tempos de relaxação longitudinal (T_1) medidos em diferentes regiões do cérebro do rato em um sistema de 7T (esq.), bem como a especificação das regiões de interesse selecionadas para a realização das medidas.

A Figura 10 mostra a distribuição dos tempos de relaxação longitudinal ao longo do cérebro do rato medida em 7T. Muito embora os valores apresentem uma heterogeneidade típica entre as regiões avaliadas, a variabilidade entre animais é pequena, como se pode notar pelos baixos desvios padrões obtidos. Em detalhe, uma imagem de alta resolução do cérebro do animal mostra as regiões onde as medidas foram realizadas. Considerando o cérebro todo, o valor médio obtido para o tempo de relaxação longitudinal no cérebro dos ratos foi de $T_1 = 1725 \pm 30$ ms.

5.5 Mapas de perfusão

Uma vez determinadas as grandezas importantes para a quantificação da perfusão utilizando ASL e concluída a otimização de parâmetros necessários à aquisição das imagens de forma eficiente, as primeiras imagens de perfusão CASL foram adquiridas usando uma seqüência *spin-echo* EPI com os seguintes parâmetros: TE = 48 ms, TR = 5000 ms, FOV = 32 x 32 mm², 3 planos contínuos de 2 mm de espessura e matriz = 128 x 128. A resolução espacial nominal de cada

voxel foi de $250 \times 250 \times 2000 \mu\text{m}^3$. Um tempo pós marcação (PLD, do inglês *Post Labeling Delay*) de 250ms foi utilizado para evitar contaminação intravascular (ALSOP; DETRE, 1996). Um pulso de marcação de 4538 ms foi aplicado na presença de um gradiente longitudinal $G_z = 1 \text{ G/cm}$ na frequência de marcação apropriada. Os três planos contíguos foram adquiridos em ordem anterior-posterior para evitar interferências da aquisição na magnetização do sangue marcado. A aquisição de 32 médias resultou em um tempo de aquisição total de 5min20s.

As imagens e os mapas de perfusão foram processados utilizando MATLAB R2006a (The MathWorks, Natick, MA). Os mapas quantitativos de perfusão, mostrados a seguir, foram gerados a partir da equação [35] com base na subtração das imagens obtidas após a marcação dos spins das imagens de controle. A média de cada um dos conjuntos foi realizada independentemente.

Figura 11: a) Imagens coronais anatômicas e b) as respectivas imagens de perfusão do cérebro do rato obtidas utilizando ASL.

A Figura 11a mostra imagens EPI coronais anatômicas típicas do cérebro de um rato. As imagens de perfusão global correspondentes estão mostradas na Figura

11b. A mesma sensibilidade à perfusão foi obtida em ambos os hemisférios, comprovando a eficiência simétrica da bobina de marcação. Neste animal, em particular, o valor de CBF obtido foi de 116 ± 6 ml/100g/min, o que está de acordo com valores previamente publicados na literatura (SICARD *et al.*, 2003; WEGENER *et al.*, 2007).

Interessante notar que, exceto por alguns poucos pixels, não existe sinal residual, após a subtração das imagens, fora da região onde de fato existe perfusão. Isto é um grande indicativo de que a utilização de uma bobina dedicada para a marcação dos spins elimina efeitos de MTC, permitindo, assim, a quantificação confiável dos valores de CBF ao longo de todo o cérebro.

5.6 Considerações gerais

Nesta primeira etapa do trabalho, foram estabelecidas as bases para a aquisição de mapas quantitativos de perfusão utilizando a técnica CASL com uma bobina de marcação dedicada. Foi realizada uma caracterização completa da bobina, bem como de grandezas importantes para o modelo de quantificação utilizado. Os primeiros resultados demonstram a potencialidade da técnica, apresentando mapas quantitativos de perfusão com alta SNR e completa ausência de efeitos de MTC.

Uma vez estabelecida e caracterizada, uma aplicação recente e interessante da técnica consiste em realizar, de maneira seletiva, a marcação do sangue fluindo através de artérias específicas e não mais de maneira global. Recentemente, alguns métodos baseados em ASL foram propostos para medida de territórios vasculares. Na próxima seção, esses métodos serão discutidos e uma nova implementação será apresentada.

6 Territórios Vasculares

As técnicas de neuroimagem capazes de fornecer informações a respeito da hemodinâmica cerebral possuem um papel cada vez mais importante no ambiente clínico (HOEFFNER, 2005; WINTERMARK *et al.*, 2005). Em particular, encontram aplicação no diagnóstico e definição da abordagem terapêutica adotada em tumores cerebrais (CHA, 2003) e outras doenças cerebrais, tais como vasoespasma cerebral (LAD *et al.*, 2006), doenças causadas pela obstrução arterial (VAN LAAR; VAN DER GROND *et al.*, 2006) e AVC (LATCHAW, 2004).

Como discutido anteriormente, quando comparadas a outras metodologias de imagens, as técnicas de medida de perfusão por RM têm a vantagem de não expor o paciente à radiação ionizante e permitir a quantificação dos valores de CBF, CBV e MTT com uma resolução espacial relativamente alta e em um curto período de tempo (HOEFFNER, 2005; WINTERMARK *et al.*, 2005). Quando combinado a outras técnicas de imagens por RM, como angiografia, difusão e imagens com contraste por T₂, as técnicas de medida de perfusão utilizando RM podem fornecer uma avaliação abrangente da circulação cerebral tanto em condições normais como em

condições patológicas, permitindo uma comparação direta das regiões com perfusão alterada com o território isquêmico e a origem do problema (ROWLEY; ROBERTS, 2004). Esta estratégia tem sido bastante explorada na avaliação preliminar de pacientes com AVC (SORENSEN *et al.*, 1996), permitindo a obtenção de informações referente ao tecido afetado comparado com o tecido recuperável, guiando, assim, a estratégia de tratamento (WARACH, 2003).

Um conjunto de técnicas angiográficas e de medida de perfusão utilizando RM foram propostas para medidas de territórios de perfusão vascular (NISHIMURA *et al.*, 1987; EDELMAN *et al.*, 1990; SARDASHTI *et al.*, 1990; FURST *et al.*, 1993; DETRE *et al.*, 1994; ZAHARCHUK *et al.*, 1999; EASTWOOD *et al.*, 2002; TRAMPEL *et al.*, 2002; DAVIES; JEZZARD, 2003; MILDNER *et al.*, 2003; HENDRIKSE *et al.*, 2004; TAOKA *et al.*, 2004; WERNER *et al.*, 2004; GOLAY *et al.*, 2005; HENDRIKSE; VAN DER ZWAN *et al.*, 2005; WERNER *et al.*, 2005; GUNTHER, 2006; JONES *et al.*, 2006; VAN LAAR; HENDRIKSE *et al.*, 2006; ZIMINE, I. *et al.*, 2006; WONG, 2007). Os territórios vasculares podem fornecer informação complementar aos dados obtidos através de angiografia, principalmente no que se refere à quantificação do estado de perfusão do tecido, e podem ser importantes tanto em aplicações prognósticas como em diagnósticas.

No aspecto prognóstico, o mapeamento dos territórios vasculares permite a identificação de anormalidades no fluxo sanguíneo e auxilia na análise da extensão das regiões com elevado risco de dano em caso de AVC. Por exemplo, um estudo recente mostrou uma grande variação nos territórios de perfusão da circulação anterior e posterior de 115 voluntários saudáveis, causadas, principalmente, por diferentes formações do COW (VAN LAAR; HENDRIKSE *et al.*, 2006). Além disso, o mapeamento prognóstico dos territórios de perfusão fornece informações sobre a

circulação colateral, um parâmetro importante no planejamento cirúrgico para pacientes submetidos a intervenções vasculares, como, por exemplo, revascularização das artérias responsáveis pela perfusão cerebral (HENDRIKSE *et al.*, 2004). Já no aspecto de diagnose, o mapeamento dos territórios vasculares em pacientes com problemas cerebrovasculares, como no caso de oclusão da carótida interna (ICA, do inglês *Internal Carotid Artery*), permite a análise da extensão da região afetada e a adaptação da vasculatura como resultado da redistribuição devido ao fluxo colateral compensatório ou à recanalização da artéria ocluída (HENDRIKSE; VAN DER ZWAN *et al.*, 2005).

Logo após a inserção da técnica de ASL como uma ferramenta para obtenção de mapas de perfusão global do cérebro, surgiu a proposta de utilizar ASL para, de maneira seletiva, marcar o sangue fluindo através de artérias específicas (DETRE *et al.*, 1994). Recentemente, alguns métodos baseados em ASL foram propostos para medida de territórios vasculares em humanos (ZAHARCHUK *et al.*, 1999; EASTWOOD *et al.*, 2002; TRAMPEL *et al.*, 2002; DAVIES; JEZZARD, 2003; MILDNER *et al.*, 2003; HENDRIKSE *et al.*, 2004; TAOKA *et al.*, 2004; WERNER *et al.*, 2004; GOLAY *et al.*, 2005; HENDRIKSE; VAN RAAMT *et al.*, 2005; WERNER *et al.*, 2005; JONES *et al.*, 2006; VAN LAAR; HENDRIKSE *et al.*, 2006; ZIMINE, I. *et al.*, 2006). A seguir, serão discutidos brevemente os métodos baseados em ASL propostos para medidas de territórios vasculares, enfatizando as vantagens e desvantagens de cada um deles. Além disso, será apresentada uma nova implementação para esta finalidade, bem como os primeiros resultados obtidos em animais e humanos.

6.1 Estado da arte

O mapeamento dos territórios vasculares utilizando ASL se baseia em realizar a marcação apenas do sangue fluindo através das artérias de interesse, deixando o sangue presente nas outras artérias intacto. Idealmente, as técnicas dedicadas a mapear os territórios de perfusão cerebral deveriam oferecer uma seleção flexível de qual território demarcar e fazer isto em um tempo relativamente curto de maneira a atender às restrições dos exames clínicos, permitindo, ainda, a obtenção de imagens de todo o cérebro com alta SNR e livre de artefatos. Basicamente, esta estratégia foi implementada de três formas distintas (PAIVA *et al.*, 2007; VAN LAAR; VAN DER GROND *et al.*, 2008): utilizando uma bobina de marcação dedicada posicionada sobre as artérias de interesse (DETRE *et al.*, 1994; ZAHARCHUK *et al.*, 1999; TRAMPEL *et al.*, 2002; MILDNER *et al.*, 2003); utilizando inversão seletiva de regiões confinadas espacialmente onde as artérias de interesse estão localizadas (EASTWOOD *et al.*, 2002; HENDRIKSE *et al.*, 2004; TAOKA *et al.*, 2004; WERNER *et al.*, 2004; GOLAY *et al.*, 2005; HENDRIKSE; VAN RAAMT *et al.*, 2005; WERNER *et al.*, 2005; JONES *et al.*, 2006; VAN LAAR; HENDRIKSE *et al.*, 2006; ZIMINE, I. *et al.*, 2006) e utilizando pulsos de RF bidimensionais para marcação direta da artéria de interesse (DAVIES; JEZZARD, 2003).

Os métodos que utilizam uma bobina dedicada possuem, em geral, maior SNR, requerem menor deposição de potência de RF, reduzindo eventuais problemas com SAR e permitem cobertura tridimensional completa. Entretanto, requerem a implementação de um hardware extra, o que pode limitar sua aplicação em sistemas clínicos, e estão restritos à separação na região do pescoço, o que pode restringir a seletividade à circulação esquerda e direita apenas. Já os métodos que utilizam inversão seletiva possuem maior flexibilidade na implementação, bem como maior

seletividade arterial, sofrendo, entretanto, com os artefatos causados pela interferência entre a região onde a marcação é realizada e o volume de interesse.

A seguir, será exposto cada um dos métodos baseados em ASL propostos para medidas de territórios vasculares, enfatizando as vantagens e desvantagens de cada um deles.

6.1.1 Bobina de marcação dedicada

A primeira proposta de utilização de ASL para mapear os territórios vasculares surgiu pouco tempo depois da proposição inicial da técnica (DETRE *et al.*, 1994). Neste caso, uma bobina de marcação dedicada, combinada a um plano de marcação oblíquo, permitiu a obtenção das primeiras imagens em animais. Este mesmo princípio foi explorado por Zaharchuk e colaboradores (ZAHARCHUK *et al.*, 1999) e pelo grupo do Dr. David Norris (TRAMPEL *et al.*, 2002; MILDNER *et al.*, 2003). Em ambos os casos, bobinas dedicadas de marcação foram posicionadas sobre a artéria de interesse, simplificando o problema por dispensar a utilização de um plano oblíquo de marcação (Figura 12). Entretanto, esta alteração elimina a possibilidade de acessar artérias mais internas sem que as mais superficiais sejam afetadas, o que restringe a aplicação às carótidas comuns (CCA, do inglês *Common Carotid Artery*). Além disso, neste caso, a aquisição do território de perfusão de diferentes artérias requer o reposicionamento da bobina além de impedir a obtenção de mapas globais de perfusão na mesma sessão de imagens.

Figura 12: Esquema da metodologia que permite a obtenção de territórios vasculares posicionando a bobina de marcação sobre a artéria de interesse.

A Figura 13 mostra um conjunto de imagens na qual se pode ver o território de perfusão obtido em um sistema de humanos de 3T utilizando uma pequena bobina posicionada sobre a carótida esquerda, mostrando contraste apenas no hemisfério ipsilateral em um voluntário saudável (ZAHARCHUK *et al.*, 1999).

Figura 13: Imagens axiais de controle (em cima) e os respectivos mapas de perfusão (em baixo) obtidos utilizando uma bobina de marcação unilateral. Imagens obtidas com *spin-echo* EPI utilizando os seguintes parâmetros: TR / TE / período de marcação / PLD = 4 s / 22 ms / 3 s / 0.5 s. Como esperado para um cérebro típico, o sinal de perfusão obtido após a marcação do sangue fluindo em apenas uma das carótidas se concentra no hemisfério ipsilateral. A subtração total no hemisfério contralateral serve como demonstração de ausência de MTC (ZAHARCHUK *et al.*, 1999).

Em suma, as vantagens específicas de utilizar uma bobina separada para a obtenção de territórios de perfusão das principais artérias suprindo o cérebro são a alta SNR, a baixa deposição de potência de RF e a possibilidade de cobertura

tridimensional sem a presença de MTC. A completa separação entre as circulações direita e esquerda é facilmente obtida, enquanto a separação da circulação anterior da superior pode ser obtida com auxílio de aquisições adicionais e combinações específicas. A principal desvantagem está relacionada à cobertura espacial limitada da bobina de RF, de forma que ramificações do COW não podem ser acessadas com estes métodos. Além disso, uma bobina dedicada de marcação requer que o espectrômetro de RM esteja equipado com um hardware extra, o que pode significar uma limitação, principalmente, em sistemas clínicos. Uma calibração detalhada dos níveis de potência de RF e da eficiência de marcação é necessária de forma a minimizar erros na quantificação do CBF e evitar densidades excessivas locais de potência de RF.

6.1.2 Marcação seletiva de regiões confinadas espacialmente

O método para medida dos territórios vasculares mais explorado utiliza a marcação seletiva de regiões cerebrais contendo as artérias de interesse (EASTWOOD *et al.*, 2002; HENDRIKSE *et al.*, 2004; TAOKA *et al.*, 2004; WERNER *et al.*, 2004; GOLAY *et al.*, 2005; HENDRIKSE; VAN RAAMT *et al.*, 2005; WERNER *et al.*, 2005; GUNTHER, 2006; JONES *et al.*, 2006; VAN LAAR; HENDRIKSE *et al.*, 2006; ZIMINE, I. *et al.*, 2006; WONG, 2007). Estas técnicas utilizam uma única bobina de RF para realizar a marcação e a aquisição das imagens. Isto, por si só, representa uma desvantagem desta implementação porque a bobina engloba grande parte do sujeito e, mesmo durante o período de marcação dos spins, uma deposição global de potência ocorre, elevando o SAR a valores que podem comprometer a aplicação em altos campos. Além disso, a potência de RF tem que ser aplicada mesmo durante a aquisição das imagens de controle de forma a evitar

os efeitos de MTC, representado um *duty-cycle* de RF dobrado quando comparado aos métodos que utilizam uma bobina dedicada para a marcação (ZAHARCHUK *et al.*, 1999). Por outro lado, a utilização de uma única bobina para marcação e imagem tem a grande vantagem de não requerer qualquer alteração nos hardwares convencionais dos sistemas de RM, facilitando, assim, sua implementação em sistemas clínicos.

Utilizando uma abordagem similar à proposta inicialmente para a utilização com uma bobina de RF dedicada à marcação, Werner e colaboradores (WERNER *et al.*, 2004) implementaram um método no qual a cobertura limitada do perfil de excitação de uma bobina de cabeça é combinada a um plano oblíquo de marcação para obter territórios de perfusão da circulações direita e esquerda.

Dado a redução na eficiência do perfil de excitação da bobina de transmissão na região do pescoço (Figura 14a), combinado à utilização de um plano de marcação oblíquo, a marcação dos spins ocorre apenas na carótida esquerda (ou direita) e nas artérias vertebrais (VA, do inglês *Vertebral Artery*) (Figura 14b). Uma vez que o perfil de excitação da bobina de transmissão é relativamente uniforme na região da cabeça, ramificações do COW também não podem ser selecionadas para medida de seus respectivos territórios, o que limita o método à distinção entre os hemisférios direito e esquerdo. A Figura 14c mostra um exemplo das imagens de perfusão obtidas utilizando o presente método em um voluntário saudável. Uma boa separação entre a circulação direita e esquerda pode ser verificada apesar das limitações, por exemplo, relacionadas à separação da contribuição da circulação posterior.

Figura 14: a) Ilustração esquemática do perfil de excitação ao longo do eixo longitudinal de uma bobina de transmissão/recepção convencional. A marcação seletiva das artérias de interesse é realizada combinando este decaimento na eficiência da bobina com um plano oblíquo de marcação. b) Posicionamento do plano de marcação baseado nos dados obtidos de um angiograma da região do pescoço. A imagem do cérebro foi adicionada apenas para efeitos ilustrativos. O plano de marcação intersecta a artéria selecionada aproximadamente 80 mm abaixo do centro da bobina enquanto as artérias contralaterais são intersectadas a aproximadamente 160 mm do centro da bobina. c) Imagens de perfusão obtidas em um voluntário saudável após a marcação das circulações direita e esquerda, respectivamente (primeira e segunda linha). Respectivas imagens anatômicas estão mostradas na terceira linha. Uma boa demarcação dos territórios de perfusão da circulação anterior pode ser notada, exceto pela contaminação causada pela perfusão da circulação posterior (WERNER *et al.*, 2004).

Além do método CASL, descrito acima, seqüências baseadas na implementação pulsada de ASL também foram proposta para o mapeamento dos territórios de perfusão vascular (HENDRIKSE *et al.*, 2004; TAOKA *et al.*, 2004; GOLAY *et al.*, 2005; HENDRIKSE; VAN RAAMT *et al.*, 2005; GUNTHER, 2006; VAN

LAAR; HENDRIKSE *et al.*, 2006; ZIMINE, I. *et al.*, 2006; WONG, 2007). A Figura 15a mostra o conceito básico do esquema de marcação. Primeiramente, adquire-se um angiograma da região do COW que é utilizado na prescrição dos planos de marcação. Em particular, pode-se ver o posicionamento dos planos de marcação de maneira a determinar os territórios da carótida interna esquerda (verde), direita (vermelho) e da circulação posterior (azul). Cada plano de marcação engloba toda a região das artérias cerebrais de forma a evitar redução na SNR quando comparada à aquisição dos mapas de perfusão global. Entretanto, tanto nestes métodos, como no proposto por Taoka e colaboradores (TAOKA *et al.*, 2004), módulos de saturação e fortes gradientes de defasagem têm que ser utilizados para minimizar os artefatos causados pela superposição do plano de marcação com a região de imagem.

Figura 15: a) Posicionamento dos planos de marcação de maneira a determinar os territórios da carótida interna esquerda (verde), direita (vermelho) e da circulação posterior (azul) baseado no angiograma da região do COW (GOLAY *et al.*, 2005). b) Posicionamento dos planos de marcação utilizado na abordagem em que duas aquisições (azul e roxo), ambas incluindo a circulação posterior, substituem as três aquisições (vermelha, verde e azul) do método anterior (ZIMINE, I. *et al.*, 2006).

Inicialmente, esses métodos foram desenvolvidos com a intenção de realizar a marcação direta das artérias de interesse (Figura 15a), evitando, porém, contaminação das demais artérias (HENDRIKSE *et al.*, 2004; TAOKA *et al.*, 2004; GOLAY *et al.*, 2005; HENDRIKSE; VAN RAAMT *et al.*, 2005). Mais recentemente Zimine e colaboradores (ZIMINE, I. *et al.*, 2006), Günther (GUNTHER, 2006) e Wong (WONG, 2007) introduziram variações nesta abordagem de forma que a marcação passou a ser realizada em combinações de artérias e a determinação dos territórios individuais realizada a partir do pós-processamento dos dados. Zimine propôs a substituição das três aquisições dos métodos anteriores por duas, ambas incluindo a circulação posterior (Figura 15b), reduzindo, assim, o tempo de imagem necessário para obtenção dos territórios vasculares (ZIMINE, I. *et al.*, 2006).

O esquema proposto por Günther utiliza um ciclo de gradientes que altera o sinal da magnetização longitudinal do sangue chegando ao cérebro (GUNTHER, 2006). Assim, a informação dos diferentes territórios pode ser obtida através de uma única aquisição, o que reduz a duração do mapeamento dos territórios significativamente. Além disso, a análise de componentes independentes foi introduzida no pós-processamento de maneira a aumentar a confiabilidade na determinação dos diferentes territórios vasculares, reduzindo a susceptibilidade do método às imprecisões no posicionamento dos planos de marcação, típica dos métodos anteriores. Esses métodos demonstraram sua aplicabilidade em sistemas para humanos de 1.5T e 3T.

Uma potencial desvantagem dos métodos descritos acima está relacionada com a utilização do angiograma para prescrição dos planos de marcação. Apesar de constituir um passo fundamental para o sucesso da metodologia, existe sempre a possibilidade de o paciente se mover entre esta aquisição e a obtenção dos dados

para determinação dos territórios de perfusão, resultando em um mapeamento inapropriado ou, no melhor dos casos, na redução da SNR devido a uma marcação ineficiente dos spins nas artérias escolhidas. Esta potencial desvantagem se agrava com a duração da aquisição, forçando a obtenção de diferentes angiogramas em experimentos mais longos. Além disso, em alguns sujeitos, pode ser impossível separar a circulação anterior da posterior devido a tortuosidade dos vasos e ao posicionamento da cabeça do paciente no magneto. Finalmente, o posicionamento dos planos de marcação pode variar de operador para operador, podendo resultar em inconsistência dos resultados. Este último problema pode, porém, ser minimizado através do desenvolvimento de um sistema automático de posicionamento dos planos de marcação (ZIMINE, *I et al.*, 2006) ou pela utilização de técnicas mais robustas de pós-processamento, como, por exemplo, rotinas de análise de componentes independentes (GUNTHER, 2006).

A fim de obter uma definição ainda melhor dos territórios vasculares, Eastwood e colaboradores (EASTWOOD *et al.*, 2002) e Jones e colaboradores (JONES *et al.*, 2006) utilizaram uma esquema PASL mais elaborado, no qual regiões de inversão eram combinadas com saturações dos planos de imagem, como mostrado na Figura 16. O primeiro deles reforçou a importância das técnicas de ASL na área de imagens de perfusão de regiões específicas usando esta abordagem para expandir técnicas angiográficas, ao invés de gerar, efetivamente, dados de perfusão (EASTWOOD *et al.*, 2002). Jones, entretanto, explorou todas as vantagens desses métodos, o que inclui menor vulnerabilidade a variações da eficiência de marcação causadas por mudanças na geometria arterial ou na velocidade no fluxo sanguíneo, por exemplo, para separar os hemisférios de perfusão direito e esquerdo (JONES *et al.*, 2006).

Figura 16: Representação esquemática dos esquemas de marcação seletiva que combinam pulsos de RF e saturação dos planos de imagem para a obtenção dos territórios vasculares de perfusão. a) Um pulso de inversão sagital unilateral inverte os spins na carótida selecionada. Um pulso de saturação, seguido por um gradiente de defasagem, é aplicado para destruir os efeitos do pulso de inversão na região da imagem. b) Um pulso de inversão sagital unilateral é seguido por um pulso de inversão seletivo que inverte o esquema de marcação na região localizada abaixo do plano de aquisição. Um pulso de saturação, seguido por um gradiente de defasagem, é, então, aplicado para destruir os efeitos do pulso de inversão na região da imagem.

A grande desvantagem de ambos os métodos é que a aquisição fica restrita a um único plano, além de serem altamente sensíveis aos perfis de excitação dos pulsos de RF utilizados na inversão do plano da imagem e na saturação dos spins estacionários.

Um método inovador, utilizando um plano de marcação girante com centro de rotação posicionado sobre a artéria de interesse, foi proposto por Werner e colaboradores (WERNER *et al.*, 2005) para a realização da marcação seletiva dos spins arteriais. A metodologia, ilustrada na Figura 17a, fornece um bom nível de seletividade, incluindo a marcação da artéria basilar, das artérias cerebrais médias

(MCA, do inglês *Middle Cerebral Artery*) e ambas as artérias cerebrais anteriores (ACA, do inglês *Anterior Cerebral Artery*).

Figura 17: a) Ilustração do esquema utilizando um plano de marcação girante com centro de rotação posicionado sobre a artéria de interesse para, seletivamente, marcar a artéria de interesse. Um gradiente girante G combinado a um pulso de RF de frequência modulada define a posição de marcação como sendo sobre uma das artérias, enquanto as áreas adjacentes observam um comportamento ressonante variando com modulação senoidal. A área sombreada ilustra a cobertura do plano de marcação dinâmico. b) Imagens dos territórios de perfusão adquiridos em um voluntário saudável. Imagens anatômicas com contraste por T_1 (primeira linha) e os respectivos territórios de perfusão da MCA direita (segunda linha) e esquerda (terceira linha), bem como da ACA (quarta linha). Os territórios de perfusão estão claramente delineados, exceto pela região onde o mecanismo de marcação intersecta a região da imagem, aparecendo como bandas escuras nos mapas de perfusão (WERNER *et al.*, 2005).

Muito embora os territórios individuais apareçam bem delineados, a interferência entre o esquema de marcação e a região onde as imagens foram adquiridas, aparecendo como uma banda escura nas imagens de perfusão (Figura 17b), acaba comprometendo a qualidade dos dados. Além disso, os tempos

necessários para aquisição de ramos independentes dos COW são relativamente longos, o que compromete a aplicação da técnica em sistemas clínicos.

Experimentos realizados em *phantoms* em um sistema clínico de 1.5T demonstraram que o método é capaz de fornecer uma eficiência de marcação relativamente alta (~80% de um experimento CASL convencional). Entretanto, o método se mostrou bastante sensível a erros na definição da posição de marcação, especificamente *in vivo*. Pequenos desvios na posição determinada para a marcação podem produzir grandes efeitos na redução da eficiência de marcação, tornando, portanto, a quantificação absoluta dos valores de perfusão um tanto desafiadoras (WERNER *et al.*, 2005). Outras fontes de imprecisão na definição da posição de marcação podem ser introduzidas por efeitos de susceptibilidade e inhomogeneidade de B_0 . Em ambos os casos, a inhomogeneidade gera um gradiente de campo cuja componente perpendicular à artéria selecionada pode deslocar o ponto de marcação da posição desejada, reduzindo, assim, a eficiência de marcação e, até mesmo, a seletividade da artéria de interesse.

Em suma, as abordagens que utilizam uma única bobina para a realização da marcação e aquisição das imagens permitem uma maior flexibilidade quando comparadas aos métodos que utilizam uma bobina de marcação dedicada, permitindo, inclusive, a discriminação de ramificações do COW. Dentre suas desvantagens, está a imprecisão na delimitação dos territórios vasculares causada, principalmente, pela imprecisão na marcação da artéria de interesse, bem como, pela presença de artefatos oriundos da superposição dos planos de marcação e imagem. Além disso, a utilização de uma bobina de transmissão de corpo inteiro (ou de cabeça) para a realização da marcação em um experimento de ASL pode limitar

a aplicação do método em altos campos devido à excessiva deposição de potência de RF que pode ocorrer nas seqüências contínuas.

6.1.3 Pulsos de RF bidimensionais

Os pulsos de RF bidimensionais (Figura 18), inicialmente propostos por Bottomley e Hardy (BOTTOMLEY; HARDY, 1987), foram explorados na implementação potencialmente mais flexível, em termos de seletividade e especificidade, dentre as técnicas baseadas em ASL para o mapeamento dos territórios vasculares (DAVIES; JEZZARD, 2003). Desde sua proposição, os pulsos de RF multidimensionais foram empregados em diferentes aplicações, incluindo imagens de campo de visão restrito (RIESEBERG *et al.*, 2002), imagens angiográficas (ALLEY *et al.*, 1997) e cardíacas (CLINE *et al.*, 1991). Sua principal vantagem é a possibilidade de, simultaneamente, obter a marcação seletiva em duas dimensões espaciais, o que, em princípio, tornaria possível a marcação de qualquer artéria, incluindo artérias acima do COW.

Figura 18: Perfil da resposta espacial de uma distribuição uniforme de spins sujeito a um pulso bidimensional seletivo. Apesar de o pulso apresentar um perfil de alta eficiência focalizado no cilindro central, lóbulos laterais perturbam a magnetização seguindo, neste caso, um padrão esférico.

Entretanto, apesar de toda a flexibilidade e seletividades potencial fornecida pelos pulsos 2D, existem algumas desvantagens práticas envolvidas na implementação do método para medida de territórios de perfusão arterial. O espectro de frequências desses pulsos possui componentes que dão origem a lóbulos laterais, como pode ser visto na Figura 18, que têm que ser posicionados fora da região de interesse, de forma a não comprometer a seletividade da técnica nem gerar efeitos de MTC, além de evitar artefatos na região onde as imagens são adquiridas. Entretanto, quanto mais estreita a largura de banda do pulso, o que aumenta sua seletividade, menor o raio desses lóbulos laterais, o que se torna um limitante no que se refere à quão seletiva a técnica pode ser sem que o sinal de perfusão seja afetado. Além disso, os algoritmos utilizados para gerar o perfil de excitação dos pulsos bidimensionais não levam em consideração o fluxo dos spins. Assim, em aplicações *in vivo* para medidas de fluxo, obter o perfil de inversão desejado em regiões cuja anatomia força a mudança de direção dos spins pode ser um tanto quanto complicado, diminuindo, assim, a acurácia da marcação.

Um exemplo desta baixa eficiência em delinear os territórios de perfusão cerebral pode ser apreciado na Figura 19. As imagens de perfusão obtidas após a marcação dos spins utilizando um pulso bidimensional mostram uma alta contaminação e, conseqüentemente, baixa definição dos territórios de vasculares obtidos. Como discutido anteriormente, este constitui o principal desafio na implementação deste método que, potencialmente, poderia compor a metodologia mais flexível para medidas dos territórios de perfusão.

Figura 19: Imagens EPI típicas obtidas de um voluntário saudável (em cima) e os respectivos mapas de perfusão obtidos como resultado da marcação realizada com pulsos bidimensionais da ICA direita (no meio) e esquerda (embaixo) (DAVIES; JEZZARD, 2003).

6.1.4 Considerações gerais

Diferentes métodos baseados em ASL foram propostos nos últimos anos e discutidos nas seções anteriores, ressaltando suas respectivas vantagens e limitações. Essencialmente, métodos que utilizam uma bobina de marcação dedicada se aproveitam da alta SNR, baixa deposição de potência de RF e possibilidade de cobertura tridimensional devido a ausência de efeitos de MTC, sendo, entretanto, limitados à separação das artérias que compõem a circulação esquerda e direita. Além disso, tem sua aplicação clínica restrita pela necessidade da utilização de um hardware extra. Os métodos que utilizam hardwares clínicos típicos possuem maior flexibilidade de implementação, bem como, maior seletividade arterial, permitindo inclusive o acesso a ramificações do COW. Entretanto, o fato da marcação seletiva se dar dentro do volume de interesse implica no aparecimento de artefatos que podem prejudicar o mapeamento e, principalmente, a quantificação da perfusão no território desejado.

Este aumento no interesse da utilização dos métodos baseados na técnica de ASL para o mapeamento dos territórios vasculares das principais artérias cerebrais se deu, em parte, por conta dos avanços tecnológicos nas áreas de hardware e software dos equipamentos de RM. Além disso, houve um aumento na demanda clínica no sentido de utilizar não somente o estado de desobstrução arterial fornecido pelos angiogramas, mas também, a informação a respeito da extensão do tecido suprido por determinada artéria, um parâmetro que só pode ser obtido com a medida seletiva de CBF. Desta forma, as pesquisas nesta área devem seguir duas direções principais: a) eliminar as limitações técnicas associada a cada uma das implementações, melhorando a sensibilidade e a cobertura espacial; e b) trazer essas técnicas para o ambiente clínico, disponibilizando-as em equipamentos clínicos para que sejam utilizadas rotineiramente em pacientes.

A seguir, serão discutidos os princípios básicos da metodologia implementada no presente trabalho, bem como os primeiros resultados obtidos em animais e humanos.

6.2 Metodologia

No presente trabalho, a metodologia implementada se baseia em uma seqüência ASL contínua. Optamos pela abordagem que utiliza uma bobina dedicada para a marcação dos spins arteriais, que oferece uma melhor SNR e minimiza os problemas relativos à transferência de magnetização, facilitando a aquisição de múltiplos planos.

Desta forma, experimentos CASL foram realizados tanto em animais como em humanos utilizando uma bobina do tipo borboleta (SILVA *et al.*, 1995; TALAGALA *et al.*, 2004), posicionada sobre a região do pescoço a uma distância Δz_0

do isocentro do magneto para realizar a marcação dos spins arteriais fluindo através das principais artérias que irrigam o cérebro, como as CCAs e as VAs. A marcação seletiva da circulação esquerda, direita ou ambas foi realizada utilizando o princípio de passagem adiabática rápida (WILLIAMS *et al.*, 1992). Dado o limitado perfil de excitação da bobina de marcação, a introdução de um plano de marcação girado com relação ao plano vertical faz com que somente as artérias passando pela região de interseção entre o plano de marcação e o plano da bobina sejam afetadas (Figura 20a).

Figura 20: a) Esquema para marcação do sangue fluindo apenas na artéria de interesse. b) Angiograma obtido na região do pescoço do animal mostrando as carótidas e as artérias vertebrais, utilizadas no planejamento do esquema de marcação seletiva.

Como mostrado na Figura 20a, o plano de marcação é definido pela rotação, de um dado ângulo θ , do gradiente de marcação, G_{eff} , no plano horizontal, com relação ao eixo longitudinal. Quando nenhum gradiente transversal é utilizado, $\theta = 0^\circ$ e um experimento CASL convencional é realizado, com ambos os lados, direito e esquerdo, sendo marcados. Para garantir a validade das condições descritas pela Eq. [30], a componente z do gradiente de marcação foi otimizada para a melhor

eficiência de inversão (WILLIAMS *et al.*, 1992; MACCOTTA *et al.*, 1997) e mantida constante para todos os experimentos, o que significa que o ângulo θ foi definido, simplesmente, pela adição do gradiente na direção x . Quando θ é grande o suficiente, apenas as artérias que formam a circulação direita ($\theta > 0^\circ$) ou esquerda ($\theta < 0^\circ$) estão contidas na intersecção do plano de marcação com o plano da bobina, enquanto as artérias localizadas no lado oposto são intersectadas pelo plano de marcação distante e, por consequência, fora do alcance da bobina de marcação (Figura 20a).

Na prática, é possível determinar o menor ângulo necessário para, de forma seletiva, realizar a diferenciação do território vascular da artéria desejada levando em conta o perfil de excitação longitudinal da bobina de marcação, EP_z , e a distância, $\delta = \delta_L + \delta_R$, entre as artérias (Figura 20b):

$$\theta > \tan^{-1}\left(\frac{EP_z}{2\delta}\right) \quad [38]$$

Para otimizar a seletividade, a posição do plano de marcação é ajustada na direção longitudinal de acordo com o valor de δ_z , calculado com base nos valores de δ_R e δ_L de acordo com a seguinte equação:

$$\delta_z = \chi \tan \theta, \quad \chi = \begin{cases} \delta_R, & 0^\circ < \theta < 90^\circ \\ \delta_L, & -90^\circ < \theta < 0^\circ \end{cases} \quad [39]$$

Assim, o *offset* na frequência de marcação é dado por:

$$f_{ASL} = \gamma G_z (\Delta z_0 + \delta_z) \quad [40]$$

6.3 Métodos e resultados

6.3.1 Estudos em animais

O presente estudo foi aprovado pelo *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC) do NINDS, NIH (protocolo IACUC #1209-05). Um grupo (N = 6) de ratos adultos do tipo *Sprague-Dawley* (SD) (*Charles River Laboratories White Plains, NY*), pesando 250-350g, foi anestesiado com isoflurana (5% para indução, 2% para manutenção), e restrito com o auxílio de pinos de orelha e barra de mordedura. A temperatura retal foi mantida a 37.0 ± 1.0 °C com auxílio de uma cama elétrica (Rapid Biomedical GmbH, Rimpf, Alemanha), enquanto a taxa cardíaca e saturação da oxigenação arterial eram monitoradas com auxílio de um oxímetro de pulso (Surgivet, Waukesha, WI).

Uma vez posicionado no magneto, uma imagem localizadora foi adquirida para ajustar a posição do cérebro do animal no isocentro do magneto. A posição da bobina de marcação com respeito às artérias de interesse foi, então, verificada, utilizando a mesma como transmissora para aquisição de uma imagem sagital e outra coronal do pescoço do animal. A posição de marcação Δz_0 foi então definida como sendo o centro do perfil do sinal longitudinal gerado pela mesma.

Angiogramas da região do pescoço do animal foram adquiridos utilizando uma sequência do tipo *gradient-echo* com compensação de fluxo com TE = 4.3 ms e TR = 20 ms. Maior realce do sinal devido ao fluxo foi obtido utilizando um ângulo de *flip* grande (90°) para excitação. Uma imagem axial na posição da bobina de marcação foi utilizada para determinar a distância ao plano $x = 0$ da carótida esquerda (δ_L) e direita (δ_R), como mostrado na Figura 20b. Este procedimento permitiu uma

determinação precisa de Δz_0 e δz , permitindo assim, o cálculo do *offset* de frequência usado para marcação de acordo com a Eq. [40].

Imagens de perfusão CASL coronais foram adquiridas usando uma sequência *spin-echo* EPI com os seguintes parâmetros: TE = 38 ms, TR = 5115 ms, FOV = 25.6 x 25.6 mm², 10 planos contínuos de 1.5 mm de espessura e matriz = 96 x 96. A resolução espacial nominal de cada voxel foi de 267 x 267 x 1500 μm^3 . Um PLD de 350ms (ALSOP; DETRE, 1996) foi utilizado para evitar contaminação intravascular. Um pulso de marcação de 4183 ms foi aplicado na presença de um gradiente longitudinal $G_z = 1$ G/cm na frequência de marcação apropriada. Como mostrado anteriormente, a potência de RF utilizada para CASL foi otimizada para produzir a maior eficiência de marcação. Os 10 planos contíguos foram adquiridos em ordem anterior-posterior para evitar interferências da aquisição na magnetização do sangue marcado. A aquisição de 32 médias resultou em um tempo de aquisição total de 5min27s.

As imagens e os mapas de perfusão foram processados utilizando MATLAB R2006a (The MathWorks, Natick, MA). Os mapas quantitativos de perfusão, mostrados a seguir, foram gerados a partir da equação [35] com base na subtração das imagens obtidas após a marcação dos spins das imagens de controle. A média de cada um dos conjuntos foi realizada independentemente. Diferenças significativas nos dados foram testadas com o teste t-Student usando Microsoft Office Excel 2003 SP3 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). O nível de significância foi definido para $p < 0.05$.

Tipicamente, um rato SD de 300g possui suas carótidas separadas por $\delta \approx 1$ cm. Dado o perfil de excitação da bobina de marcação utilizada, $EP_z \approx 1.5$ cm, o mínimo ângulo necessário para diferenciação dos territórios das carótidas direita e

esquerda, de acordo com a Eq. [38], é 37° . O efeito do ângulo θ no contraste de perfusão pode ser visto na Figura 21, que mostra imagens coronais de perfusão dos hemisférios esquerdo e direito do cérebro de um rato SD, adquiridas usando $\theta = \pm 45^\circ$ e $\theta = \pm 60^\circ$, respectivamente.

Figura 21: Imagens coronais de perfusão típicas do cérebro de um rato SD obtidas utilizando a) $\theta = \pm 45^\circ$ e b) $\theta = \pm 60^\circ$, respectivamente.

Com o ângulo menor, um contraste de perfusão expressivo no lado contralateral pode ser observado, indicando uma marcação significativa dos spins arteriais e, por consequência, uma seletividade insuficiente para diferenciar a circulação direita da esquerda. Com 45° , o contraste de perfusão no lado contralateral foi, em média, 46% do valor obtido no lado marcado. Esta diferença foi muito maior com a utilização de um ângulo maior, com contraste de perfusão no lado oposto à marcação, de apenas 26% do lado ipsilateral quando $\theta = 60^\circ$. Muito embora os resultados sugiram que o uso de ângulos ainda maiores pudesse melhorar a seletividade da metodologia, a intersecção do plano de marcação com a parte mais posterior do cérebro introduziu artefatos nas imagens de perfusão adquiridas utilizando $\theta > 60^\circ$.

Figura 22: a) Imagens coronais anatômicas e b) de perfusão do cérebro de um rato SD usando $\theta = 0^\circ$. Imagens de perfusão correspondendo aos territórios de perfusão das carótidas c) esquerda e d) direita, adquiridas usando, respectivamente, $\theta = -60^\circ$ e $\theta = +60^\circ$.

A Figura 22a mostra imagens EPI coronais anatômicas típicas do cérebro de um rato cobrindo grande parte do cérebro do animal. Imagens correspondentes de perfusão global ($\theta = 0^\circ$) estão mostradas na Figura 22b. A mesma sensibilidade à perfusão foi obtida em ambos os hemisférios, comprovando a eficiência simétrica da bobina de marcação. Para obtenção do território de perfusão esquerdo, $\theta = -60^\circ$ foi utilizado, produzindo as imagens mostradas na Figura 22c. Da mesma forma, $\theta = +60^\circ$ deu origem às imagens mostradas na Figura 22d, correspondendo ao território de perfusão direito.

Na maior parte do cérebro, os territórios de perfusão esquerdo e direito foram complementares, mas não completamente simétricos. No rato da Figura 22, por exemplo, nota-se uma grande contribuição da ACA para o território esquerdo, mas não para o direito (planos 5-7 na Figura 22c-d).

A Tabela 1 lista os valores calculados de CBF obtidos para $\theta = 0^\circ$, $\theta = -60^\circ$ e $\theta = +60^\circ$ para todos os ratos utilizados neste estudo. Os valores de CBF quando $\theta = 0^\circ$ no hemisfério esquerdo e direito foram idênticos ($p = 0.3$), indicando um desempenho uniforme da bobina de marcação. Entretanto, o uso de um plano de marcação oblíquo diminuiu, significativamente, o valor de CBF no lado contralateral ($p < 0.01$), mantendo, entretanto, os valores no hemisfério ipsilateral. Considerando todos os animais, o valor médio do sinal de perfusão no lado contralateral foi de apenas $25\% \pm 7\%$ do sinal no hemisfério ipsilateral ($p < 0.01$).

Tabela 1: Valores de CBF (ml/100g/min) obtidos para ratos SD utilizando $\theta = 0^\circ$, -60° e $+60^\circ$.

Rato	$\theta = 0^\circ$		$\theta = -60^\circ$		$\theta = +60^\circ$	
	Esq.	Dir.	Esq.	Dir.	Esq.	Dir.
1	149	147	148	32	23	130
2	95	90	96	34	24	92
3	119	119	121	41	39	111
4	105	101	102	26	25	105
5	143	145	135	22	30	138
6	127	131	115	33	24	124
Média $\pm$ SD	123 $\pm$ 21	122 $\pm$ 23	120 $\pm$ 20	31 $\pm$ 7	28 $\pm$ 6	117 $\pm$ 17

Todos os valores foram derivados de regiões de interesse do mesmo tamanho, desenhadas manualmente, e posicionadas nos hemisférios esquerdo e direito do cérebro. Os valores são estatisticamente diferentes do lado contralateral ($p < 0.01$) tanto quando $\theta = -60^\circ$, como quando $\theta = +60^\circ$.

6.3.2 Estudos em humanos

Voluntários adultos saudáveis ($N = 18$, 9 homens e 9 mulheres, média de idade 31 ± 8 anos) foram escaneados sob protocolo IRB aprovado pelo NIH. Uma vez posicionado no magneto, uma imagem localizadora foi adquirida para referência, seguida por um angiograma da região do pescoço, adquirido utilizando uma seqüência do tipo tempo de vó com $TE = 3.6$ ms e $TR = 15$ ms. Maior realce do sinal devido ao fluxo foi obtido utilizando um ângulo de *flip* grande (90°) para excitação. Uma imagem axial na posição da bobina de marcação foi utilizada para

determinar a distância ao plano $x = 0$ da carótida esquerda (δ_L) e direita (δ_R), como mostrado na Figura 20b. Com isto, determinou-se o *offset* de frequência usado para marcação de acordo com a Eq. [40].

Imagens de perfusão axiais foram adquiridas usando uma seqüência CASL com módulo de aquisição do tipo *gradient-echo* EPI com os seguintes parâmetros: TE = 13.2 ms, TR = 5000 ms, FOV = 240 x 240 mm², 23 planos contínuos de 3 mm de espessura e matriz = 64 x 64. A resolução espacial nominal de cada *voxel* foi de 3.75 x 3.75 x 3 mm³. Além disso, um pulso de marcação de 3 s foi utilizado na presença de um gradiente longitudinal $G_z = 0.3$ G/cm na frequência de marcação apropriada, bem como um PLD = 1.2 s. A potência de RF utilizada para CASL foi otimizada para produzir a maior eficiência de marcação (TALAGALA *et al.*, 2004). Os 23 planos contíguos foram adquiridos em ordem superior-inferior para evitar interferências da aquisição na magnetização do sangue marcado. A aquisição de 25 pares de imagens resultou em um tempo total de 4min10s.

Os valores de CBF foram calculados utilizando a seguinte equação (GARRAUX *et al.*, 2005):

$$CBF = \frac{\lambda}{T_{1b}} \frac{M_b^1 - M_b^2}{M_b^1} \frac{1}{2\alpha e^{-\left(\frac{\tau}{T_{1a}-T_{1b}} + \frac{PLD}{T_{1b}}\right)}} \frac{1 - e^{-\frac{TR}{T_{1b}}}}{1 - e^{-\frac{LT}{T_{1b}}}} \quad [41]$$

sendo LT o tempo de marcação. Os valores de M_b^1 e M_b^2 foram medidos para todos os sujeitos enquanto $T_{1a} = 1.5$ s e $\lambda = 0.9$ ml/g (HERSCOVITCH; RAICHLE, 1985), $\alpha = 0.75$ (TALAGALA *et al.*, 2004) e $\tau = 1$ s foram assumidos. Além disso, $T_{1b} = 1.33$ s e $T_{1b} = 0.83$ s foram assumidos para matéria cinzenta e branca, respectivamente (TALAGALA *et al.*, 2004) e $PLD = 1.2$ s e $LT = 3$ s foram usados em todos os cálculos.

As imagens e os mapas de perfusão foram obtidos da subtração das imagens ASL das imagens de controle utilizando MATLAB R2006a (The MathWorks, Natick, MA) e foram expressas em mudança percentual do sinal. Para evitar imprecisão causada por movimento, cada um dos pares foi subtraído antes da obtenção da média. Além disso, para otimizar a precisão da subtração das imagens, os tempos de aquisição foram mantidos os mais curtos possíveis determinados, essencialmente, pelo número de pares necessários para obtenção da SNR desejável. Antes da subtração, as imagens foram realinhadas utilizando uma rotina de registro do SPM5 (Wellcome Department of Imaging Neuroscience, Queen Square, London, UK). Todas as análises foram feitas baseadas em regiões de interesse (ROI, do inglês *Region of Interest*) de mesmo tamanho, desenhadas manualmente, em ambos os hemisférios. Os valores médios da mudança percentual do sinal foram obtidos utilizando o software Amira 4.0 (Mercury Computer Systems Inc., Chelmsford, MA).

A seletividade da marcação dos territórios de perfusão foi otimizada variando o ângulo θ do plano de marcação conforme mostrado na Figura 23. A intensidade do sinal foi determinada em ROIs definidas em regiões de matéria branca e cinzenta do cérebro em ambos os hemisférios.

Figura 23: Diferenças percentuais no sinal obtido de ROIs definidas em regiões de matéria branca e cinzenta do cérebro em ambos os hemisférios conforme o ângulo de marcação aumenta. As barras de erro representam o desvio padrão do sinal. Uma atenuação significativa no sinal de perfusão do hemisfério esquerdo pode ser observada para $\theta > 30^\circ$.

Quando $\theta = 0^\circ$, ambos os hemisférios foram marcados eficientemente, comprovando a simetria da bobina de marcação. Conforme θ aumenta, o sinal no hemisfério esquerdo diminui dado a redução na eficiência de marcação da circulação esquerda. Uma redução significativa pode ser notada para $\theta > 30^\circ$, o que está de acordo com a Eq. [38]. A bobina utilizada nos experimentos humanos tem uma abrangência na direção z da ordem de $EP_z \approx 45$ mm, enquanto a separação típica entre as carótidas em humanos é da ordem de 46 mm. Desta forma, seria esperado que a diferenciação na marcação dos territórios iniciasse para $\theta > 26^\circ$. A diferença percentual do sinal na matéria cinzenta para $\theta = 40^\circ$ foi de 38% da intensidade obtida para $\theta = 0^\circ$, e diminuiu ainda mais, sendo de apenas 5% quando $\theta = 50^\circ$. Para este voluntário, $\theta = 60^\circ$ resultou em atenuação completa. Desta forma, $\theta = \pm 60^\circ$ foi definido, também para o caso dos humanos, como padrão.

Uma vez que a bobina de marcação utilizada não foi desenvolvida especificamente para o mapeamento dos territórios de perfusão, é possível que

bobinas com o perfil de excitação longitudinal mais estreito possam obter uma boa seletividade com ângulos de marcação menores. Entretanto, como mostrado, é possível compensar o perfil de excitação da bobina de marcação simplesmente aumentando os ângulos utilizados para o plano de marcação. Em nosso caso, por exemplo, o sistema de 3T utilizado possui gradientes capazes de gerar 40 mT/m, o que daria um ângulo de marcação máximo, considerando $G_z = 3$ mT/m, de $\theta_{\max} = \tan^{-1}(40/3) \approx 86^\circ$. Entretanto, uma das desvantagens de utilizar ângulos grandes para o plano de marcação é que pequenos erros na determinação da distância Δz_0 podem significar um decréscimo significativo na eficiência de marcação e, por consequência, na precisão com a qual se delinea os territórios de perfusão.

A Figura 24a mostra um conjunto típico de imagens axiais anatômicas do cérebro de um voluntário, seguidas por um conjunto de imagens equivalentes de perfusão global obtido através da marcação das principais artérias que suprem o cérebro (Figura 24b). Contrastes típicos de perfusão foram observados tanto para a matéria branca como para a matéria cinzenta, acompanhado de um excelente delineamento anatômico cortical.

Neste voluntário, a mudança percentual no sinal foi $1.14\% \pm 0.09\%$ na matéria cinzenta e $0.16\% \pm 0.04\%$ na matéria branca, correspondendo aos valores calculados de CBF de 76 ± 6 ml/100g/min e 17 ± 5 ml/100g/min, respectivamente. Os territórios de perfusão arterial do hemisfério direito, bem como do esquerdo, foram obtidos introduzindo um ângulo no plano de marcação de $\theta = +60^\circ$ (Figura 24c) e $\theta = -60^\circ$ (Figura 24d), respectivamente. Os territórios de perfusão incluem contribuições das circulações anterior, média e posterior. Em ambos os casos, o contraste CBF obtido foi excelente no hemisfério de interesse, enquanto o lado contralateral não apresentou praticamente nenhum contraste mensurável. Na Figura

24c-d pode-se notar um anel brilhante, da espessura de um único *pixel*. Este artefato é devido ao baixo sinal dos *pixels* da borda presentes nas imagens de controle, o que faz com que a razão $(M_b^1 - M_b^2)/M_b^1$ seja relativamente grande e perceptível devido à baixa intensidade do sinal ($< 2\%$) na imagem de diferença.

Figura 24: a) Imagens axiais anatômicas do cérebro de um voluntário e b) suas respectivas imagens de perfusão global adquiridas usando $\theta = 0^\circ$. c) Imagens de perfusão do hemisfério direito, correspondendo ao território de perfusão da carótida direita, adquiridas utilizando $\theta = 60^\circ$ e d) do hemisfério esquerdo, correspondendo ao território de perfusão da carótida esquerda, adquiridas utilizando $\theta = -60^\circ$.

A Tabela 2 traz os valores da diferença percentual do sinal e de CBF calculados para a situação em que ambos os lados foram marcados. Além disso, também estão listados os respectivos valores de SNR obtidos na matéria branca e matéria cinzenta para os voluntários deste estudo. Devido a ausência de contraste de perfusão, 2 sujeitos foram excluídos das análises.

Os valores médios de CBF calculados para a matéria cinzenta e branca entre todos os voluntários foram de 74 ± 13 ml/100g/min e 14 ± 13 ml/100g/min ($N = 14$), respectivamente. Quando a bobina de marcação foi utilizada de modo a obter perfusão global, ou seja, $\theta = 0^\circ$, não houve diferença estatística nos valores de sinal

ou CBF entre o hemisfério esquerdo e direito ($p = 0.2$), indicando que a bobina de RF apresenta uma sensibilidade similar e, portanto, eficiência similar na marcação de ambos os lados.

Tabela 2: Diferença no sinal de perfusão global ($\theta = 0^\circ$) e respectivos valores de CBF e SNR.

Voluntário	Diferença no Sinal de Perfusão (%)				CBF (ml/100g/min)				SNR			
	Matéria Cinzenta		Matéria Branca		Matéria Cinzenta		Matéria Branca		Matéria Cinzenta		Matéria Branca	
	Esq.	Dir.	Esq.	Dir.	Esq.	Dir.	Esq.	Dir.	Esq.	Dir.	Esq.	Dir.
1	1.04	0.96	-0.03	-0.01	69	64	-3	-1	8	8	2	2
2	1.32	1.49	0.20	0.17	88	99	21	17	15	14	2	2
3	1.53	1.37	0.35	0.25	101	91	37	27	16	17	4	3
4	1.06	0.98	0.22	0.20	70	65	23	21	10	11	3	2
5	1.00	0.86	0.16	0.11	66	57	17	12	7	8	2	2
6	1.15	0.95	0.32	0.29	77	63	34	31	10	9	1	1
7	1.21	1.47	0.06	0.01	80	98	6	1	13	14	1	1
8	0.85	0.83	-0.05	-0.09	56	55	-5	-9	13	12	2	2
9	1.20	1.08	0.19	0.13	79	71	20	13	13	13	2	2
10	1.03	1.01	0.15	0.13	69	67	16	14	11	13	2	1
11	1.16	0.94	0.13	0.05	77	63	14	5	8	7	1	1
12	1.19	1.06	0.06	-0.01	79	71	6	-1	9	9	1	1
13	1.16	1.10	0.27	0.26	77	73	29	28	12	12	2	2
14	1.00	0.96	0.06	0.06	66	64	6	7	8	9	1	1
Média	1.13	1.08	0.15	0.11	75	71	16	12	11	11	2	2
SD	0.16	0.21	0.12	0.12	11	14	13	12	3	3	1	1

Todos os valores foram derivados de ROIs do mesmo tamanho, desenhadas manualmente, e posicionadas no hemisfério esquerdo e direito do cérebro. Em ambos os casos, matéria branca ou cinzenta, testes-t pareados não revelaram diferenças estatísticas entre os lados esquerdo e direito ($p = 0.2$).

Segundo os valores apresentados na Tabela 2, os valores de perfusão na matéria cinzenta foi 4-6 vezes maior que na matéria branca, o que aparentemente está em desacordo com valores previamente publicados no quais, tipicamente, esta razão está entre 1.6 (YE *et al.*, 2000) e 3.7 (CAMPBELL; BEAULIEU, 2006). Entretanto, em aproximadamente metade dos voluntários incluídos no presente estudo, o sinal de perfusão na matéria branca está no nível do ruído, provavelmente

devido aos valores mais curtos de T_1 combinados aos valores mais longos de tempo de trânsito na matéria branca, quando comparados à matéria cinzenta. De fato, se eliminarmos todos os sujeitos que apresentaram $SNR = 1$, a razão entre o sinal de perfusão nas matérias branca e cinzenta cai para 3.7 ± 1.0 , que está dentro dos valores encontrados na literatura (CAMPBELL; BEAULIEU, 2006).

A Figura 25 mostra a diferença percentual média no sinal da matéria branca e cinzenta nos hemisférios esquerdo e direito nas situações em que $\theta = 0^\circ$, correspondendo à perfusão global do cérebro, e $\theta = \pm 60^\circ$, correspondendo aos territórios direito e esquerdo.

Figura 25: Diferença percentual média no sinal das matérias branca e cinzenta nos hemisférios esquerdo e direito nas situações em que $\theta = 0^\circ$, correspondendo à perfusão global do cérebro, e $\theta = \pm 60^\circ$, correspondendo aos territórios direito e esquerdo foram utilizados (* $p < 0.01$).

Quando $\theta = +60^\circ$, a diferença no sinal na matéria cinzenta no hemisfério esquerdo, $0.07\% \pm 0.06\%$, foi 92% menor que no hemisfério direito, $0.85\% \pm 0.30\%$ ($p < 0.01$), enquanto que para $\theta = -60^\circ$, o sinal no hemisfério direito, $0.16\% \pm 0.13\%$, foi 82% menor que o do lado contralateral, $0.89\% \pm 0.22\%$ ($p < 0.01$). Da mesma forma, na matéria branca, quando $\theta = +60^\circ$, a mudança média do sinal no lado não

marcado foi $0.02\% \pm 0.05\%$, 85% menor que no hemisfério marcado, $0.13\% \pm 0.07\%$ ($p < 0.01$), enquanto que para $\theta = -60^\circ$, o sinal no hemisfério direito, $0.02\% \pm 0.04\%$, foi, também, 85% menor que no lado contralateral, $0.13\% \pm 0.08\%$ ($p < 0.01$).

Em média, o contraste de perfusão obtido na matéria cinzenta do lado ipsilateral quando o ângulo foi utilizado, $\Delta S(\theta = \pm 60^\circ) = 0.87\% \pm 0.26\%$, foi estatisticamente diferente do contraste obtido sem o uso dos ângulos, $\Delta S(\theta = 0^\circ) = 1.11\% \pm 0.19\%$ ($p < 0.01$). Uma vez que as medidas com e sem a utilização dos ângulos foram realizadas na mesma sessão experimental, a diferença no contraste de perfusão na matéria cinzenta só pode ser atribuída ao ajuste impreciso da frequência de marcação. Isto poderia ser causado, por exemplo, por erros na medida da posição exata das carótidas, o que, de acordo com a Eq. [40], induziria o cálculo errado da frequência de marcação. Além disso, considerando que a carótidas não estejam posicionadas completamente paralelas à direção z do magneto, a adição de um gradiente transversal para girar o plano de marcação poderia alterar a amplitude efetiva do gradiente de marcação, comprometendo as condições para a obtenção da inversão dos spins, reduzindo, assim, a eficiência de marcação. Entretanto, em ambos os casos, seriam esperados pequenos efeitos que não justificariam uma redução tão significativa no resultado obtido. Outra alternativa seria a determinação imprecisa da distância Δz_0 . A utilização do sistema de posicionamento do próprio conjunto de RM, baseado em um feixe de laser, pode não ser uma forma muito eficiente de se obter esta informação. Indicativo de que esta pode ser a maior causa é que esta diferença não foi observada nos estudos com animais, nos quais a posição Δz_0 foi precisamente determinada com auxílio de imagens adquiridas na própria sessão experimental, sugerindo que um método mais preciso fosse necessário nos experimentos com humanos também.

Esta redução compromete a quantificação dos valores de CBF nos territórios selecionados. Entretanto, muito embora a quantificação da perfusão forneça uma informação importante a respeito da patofisiologia dos problemas vasculares, a informação clínica mais relevante obtida pelo mapeamento dos territórios de perfusão está relacionada aos seus aspectos espaciais. Além disso, a redução na eficiência de marcação apresentada foi independente do sinal do ângulo utilizado para definir o plano de marcação sugerindo, portanto, que os territórios de perfusão podem ser mapeados de forma robusta apesar da subestimação dos valores de CBF. A atenuação média do sinal no lado contralateral relativa ao sinal obtido com marcação global foi maior que 80% com a utilização de um ângulo de 60° tanto para matéria cinzenta como para matéria branca.

Em cada um dos hemisférios, o território de perfusão cerebral é composto pela circulação anterior e média, suprida pela respectiva artéria carótida interna, e pela circulação posterior, suprida pelas artérias vertebrais. Uma vez que as artérias vertebrais se unem para formar a artéria basilar, tanto a marcação do território esquerdo como a do direito inclui o território de perfusão da circulação posterior. Considerando, portanto, que a circulação posterior é marcada de forma semelhante em ambas as aquisições, o seu território pode ser isolado através de um algoritmo de pós-processamento semelhante ao proposto por Zimine e colaboradores (ZIMINE, I. *et al.*, 2006):

$$\begin{aligned}
 POST &= \frac{LP + RP - |LP - RP|}{2} \\
 LICA &= LP - POST \\
 RICA &= RP - POST
 \end{aligned}
 \tag{42}$$

em que LP e RP são os mapas de perfusão combinados da circulação esquerda ($LICA$) e direita ($RICA$), respectivamente, com a posterior ($POST$). A Figura 26

mostra um mapa colorido dos territórios de perfusão cerebral obtidos em um voluntário típico.

Figura 26: Mapa colorido dos territórios de perfusão cerebral obtidos em um voluntário típico mostrando os territórios supridos pela ICA esquerda (verde) e direita (vermelho). A circulação posterior (azul) pode ser obtida na fase de pós-processamento de acordo com a Eq. [42]. A região central do cérebro contém contribuições da circulação esquerda e direita, as quais estão representadas em amarelo.

Os territórios anterior e médio direito estão representados em vermelho, enquanto seus equivalentes no hemisfério esquerdo estão representados em verde. Já a circulação posterior esta representada em azul. Exceto pela já esperada mistura da circulação direita e esquerda para formar o território de perfusão posterior e por alguns pixels, mostrados em amarelo, representando a região contendo contribuições simultâneas da circulação esquerda e direita, as circulações anterior e média se apresentaram bastante hemisfericamente distintas nos mapas.

Muito embora em alguns casos tenha sido possível obter informação a respeito da circulação posterior, como mostrado na Figura 26, de acordo com estudos recentes (PARK *et al.*, 2006; MIN; LEE, 2007), aproximadamente um quarto da população saudável tem hipoplasia da artéria vertebral ou aplasia, o que poderia induzir uma interpretação errônea dos dados em alguns sujeitos. Nestes casos, a Eq. [42], utilizada para extração da referida informação, não é mais válida e

o pós-processamento proposto não poderia ser utilizado para delimitar a área suprida pela circulação posterior. Considerações análogas se aplicam aos casos de pacientes com oclusões em determinadas artérias de interesse.

6.4 Considerações gerais

Os dados apresentados demonstram a eficiência da combinação da sequência CASL com uma bobina dedicada de marcação para demarcação dos territórios de perfusão das principais artérias cerebrais tanto em animais quanto em humanos. Utilizando uma bobina de marcação dedicada e com perfil de excitação restrito, imagens dos territórios vasculares foram obtidas com alta SNR e delineação robusta. Além disso, dado o fato de que o alcance transversal da bobina de marcação abrange todas as principais artérias na região do pescoço, a técnica permite a obtenção de imagens de perfusão global na mesma sessão experimental, sem a necessidade de reposicionar o voluntário e/ou a bobina. Essas características constituem vantagens práticas significativas do presente método, quando comparado àqueles propostos anteriormente que também faziam uso de uma bobina dedicada para marcação (ZAHARCHUK *et al.*, 1999; TRAMPEL *et al.*, 2002; MILDNER *et al.*, 2003).

As principais vantagens relativas à utilização de uma bobina dedicada em experimentos CASL são bem conhecidas: a) minimiza os efeitos de transferência de magnetização, resultando em uma diferença maior entre as imagens ASL e as de controle, resultando numa melhor SNR, além de facilitar a aquisição de imagens do cérebro todo (SILVA *et al.*, 1995; ZHANG *et al.*, 1995; ZAHARCHUK *et al.*, 1999; TALAGALA *et al.*, 2004); e b) permite uma reduzida deposição de potência no sujeito, restringindo-a às áreas vizinhas à bobina de marcação e evitando a

utilização do pulso de RF durante a aquisição das imagens de controle (ZAHARCHUK *et al.*, 1999; TALAGALA *et al.*, 2004). Uma desvantagem significativa no que se refere à sua utilização para obtenção de territórios vasculares, entretanto, é que a marcação está restrita à região do pescoço. Isto impossibilita a utilização do método para obtenção dos territórios individuais das ramificações do COW, permitindo, portanto, um mapeamento mais detalhado das contribuições regionais das artérias cerebrais menores, como por exemplo, a artéria cerebral média. Além disso, a exigência de um hardware extra, incluindo um segundo canal de transmissão de RF, o que atualmente não faz parte dos sistemas clínicos típicos, pode limitar a aplicação da metodologia em ambiente clínico. Entretanto, é bastante provável que esta limitação seja facilmente superada em vista dos rápidos avanços sofridos pela tecnologia dos hardwares de RM nos últimos anos.

Em suma, a combinação de uma bobina dedicada com um planejamento próprio no que se refere à posição e direção do plano de marcação possibilita a demarcação dos territórios de perfusão das principais artérias cerebrais com alta SNR e ausência de efeitos de transferência de magnetização. O método pode ser aplicado tanto em pesquisa como em procedimentos clínicos, permitindo a discriminação das circulações anterior e, eventualmente, posterior em cada um dos hemisférios cerebrais sem a necessidade de reposicionamento do paciente e/ou da bobina de marcação.

7 Aplicações em Patologia: Hipertensão

Nos últimos anos, ASL se solidificou com uma importante ferramenta para o diagnóstico de doenças cerebrovasculares (WINTERMARK *et al.*, 2005). Um estudo recente, por exemplo, estendeu a aplicabilidade de ASL para investigar a relação entre o CBF local e os fatores de risco cerebrovasculares (VAN LAAR; VAN DER GRAAF *et al.*, 2008), mostrando uma correlação entre hipertensão e o aumento de CBF em pacientes com arteriosclerose sintomática. Considerando que hipertensão é o fator de risco número um para AVC (KANNEL *et al.*, 1970), uma investigação a respeito de seus efeitos na função autorregulatória cerebrovascular pré e pós AVC seria de grande contribuição científica.

Seguindo as recomendações da *Stroke Therapy Academic Industry Roundtable* (STAIR) (1999), tem havido um aumento significativo no número de estudos utilizando modelos animais associados a determinadas patofisiologias. Em particular, dois desses modelos são compostos por ratos SHR (do inglês *Spontaneously Hypertensive*) e SHRSP (do inglês *Spontaneously Hypertensive*

Stroke Prone) (OKAMOTO; AOKI, 1963; YAMORI *et al.*, 1982). A presença de hipertensão crônica em ambas as linhagens de ratos resulta em remodelamento vascular, aumento específico da membrana mediana e diminuição no diâmetro interno dos vasos (YAMAKAWA *et al.*, 2003), causando um aumento na resistência vascular (TUTTLE *et al.*, 2002), bem como uma redução na capacidade de deformação dos vasos. Desta forma, é comum que nessas linhagens, a circulação colateral das artérias cerebrais seja comprometida (COYLE, 1986; , 1987; TUTTLE *et al.*, 2002).

O efeito que a hipertensão tem sobre a auto-regulação cerebral passa a ser de importância crucial uma vez que o CBF e o grau de colateralização constituem dois fatores importantes na previsão das consequências de um AVC (LIEBESKIND, 2003). Estudos recentes determinaram os valores locais de CBF em ratos saudáveis e hipertensos utilizando *Laser Doppler* (DUPUIS *et al.*, 2005) ou auto-radiografia (KITA *et al.*, 1995; ITO *et al.*, 2002). Entretanto, uma caracterização detalhada das alterações da morfologia vascular, como, por exemplo, a determinação dos territórios de perfusão vascular e níveis de colateralização, reatividade vascular a vasodilatadores, como o CO₂, e sua correlação com os valores basais de CBF, ainda estão por ser realizadas. Além disso, as técnicas utilizadas até o presente momento são invasivas e impraticáveis para medidas longitudinais, enquanto que, para que seja clinicamente viável, a metodologia deve ser não invasiva, confiável e aplicável dentro de um período de tempo razoável. Os métodos baseados em ASL preenchem esses quesitos e permitem medidas quantitativas de CBF local e global em sessões de imagens cuja duração atende aos requisitos clínicos (THOMAS *et al.*, 2006; DANKER; DUONG, 2007; PAIVA *et al.*, 2007; VAN LAAR; VAN DER GROND *et al.*, 2008).

Com a proposição dos métodos para medida dos territórios de perfusão vascular utilizando ASL (PAIVA *et al.*, 2007; VAN LAAR; VAN DER GROND *et al.*, 2008), começou-se avaliar a circulação colateral e as alterações nos territórios vasculares individuais em aterosclerose sintomática (JONES *et al.*, 2006) e estenose das carótidas (VAN LAAR *et al.*, 2007). Somado a isto, variações patológicas e não patológicas na anatomia vascular foram estudadas tanto em ambiente clínico (STAROSELSKAYA *et al.*, 2001; HENDRIKSE; VAN RAAMT *et al.*, 2005; VAN OSCH *et al.*, 2006) como experimental (REESE *et al.*, 1999; KRUCKER *et al.*, 2004) usando angiografia. A combinação dessas técnicas – ASL, medidas de territórios vasculares e angiografia – pode contribuir significativamente para a compreensão a respeito da vasculatura cerebral e de sua resposta a insultos ou danos.

No presente estudo, utilizamos o sistema descrito anteriormente para obter os valores de CBF, reatividade cerebrovascular ao CO₂ e os territórios de perfusão cerebral em ratos saudáveis e hipertensos. Além disso, angiogramas foram utilizados para verificar variações na formação do COW relacionadas a diferenças individuais nos territórios vasculares.

7.1 Métodos e resultados

O presente estudo foi aprovado pelo IACUC do NINDS, NIH (protocolo IACUC #1225-05 e #1209-05). Ratos adultos do tipo SD (N = 12) e SHR (N = 12) (*Charles River Laboratories White Plains, NY*), pesando 250-400g foram anestesiados com isoflurana (5% para indução, 2% para manutenção) em uma mistura 2:2:1 de ar, nitrogênio e oxigênio. Após a indução anestésica, os animais foram restritos em um suporte estereotáctico de cabeça compatível com RM utilizando pinos de orelha e barra de mordedura. A temperatura retal foi mantida a 37.0 ± 1.0 °C utilizando uma

cama elétrica também compatível com RM (Rapid Biomedical GmbH, Rimpär, Alemanha), enquanto a fisiologia foi monitorada com auxílio de um oxímetro de pulso (Surgivet, Waukesha, WI).

Os ratos foram divididos em dois grupos experimentais. O primeiro grupo (N = 12, 6 SDs, 6 SHRs) foi utilizado nas análises dos territórios de perfusão cerebral. Para este grupo, uma seqüência convencional CASL, bem como o mapeamento dos territórios utilizando o método descrito anteriormente e um angiograma do cérebro todo foram obtidos. O segundo grupo (N = 12, 6 SDs, 6 SHRs) foi induzido à hipercapnia. Neste caso, a concentração de anestésico foi mantida a mesma enquanto a composição do gás inalado foi alterada de forma a incluir 5% e 10% de CO₂, respectivamente. Um intervalo de tempo de 5 minutos foi mantido entre a alteração na composição do gás e o início da aquisição das imagens para adaptação do animal.

Os experimentos foram conduzidos no mesmo sistema de alto campo dedicado a estudos animais descrito anteriormente, e as sessões de imagens foram realizadas utilizando o conjunto de 3 bobinas (transmissão/recepção/marcação).

Uma imagem localizadora foi adquirida para ajustar a posição do cérebro do animal no isocentro do magneto. A posição da bobina de marcação com respeito às artérias de interesse foi verificada, utilizando a mesma como transmissora para aquisição de uma imagem sagital e outra coronal do pescoço do animal. A posição de marcação Δz_0 foi definida como sendo o centro do perfil do sinal longitudinal gerado pela bobina.

Angiogramas da região do pescoço do animal foram adquiridos utilizando uma seqüência do tipo *gradient-echo* com compensação de fluxo utilizando TE = 4.3 ms, TR = 20 ms e um ângulo de *flip* de 90° para realçar o fluxo. Uma imagem axial na

posição da bobina de marcação foi utilizada para determinar a distância ao plano $x = 0$ da carótida esquerda (δ_L) e direita (δ_R), com base nos quais o *offset* de frequência usado para marcação foi determinado a partir da Eq. [40].

Imagens de perfusão CASL coronais foram adquiridas usando uma sequência *spin-echo* EPI com os seguintes parâmetros: TE = 38 ms, TR = 5115 ms, FOV = 25.6 x 25.6 mm², 10 planos contínuos de 1.5 mm de espessura e matriz = 96 x 96, resultando em uma resolução espacial de 267 μ m no plano. Um PLD de 350ms (ALSOP; DETRE, 1996) foi utilizado para evitar contaminação intravascular. Um pulso de marcação de 4183 ms foi aplicado na presença de um gradiente longitudinal $G_z = 1$ G/cm na frequência de marcação apropriada. Uma potência de RF de 2W, otimizada anteriormente, foi utilizada para maximizar a eficiência de marcação. Os 10 planos contíguos foram adquiridos em ordem anterior-posterior para evitar interferências da aquisição na magnetização do sangue marcado. A aquisição de 32 médias resultou em um tempo de aquisição total de 5min27s.

Angiogramas da vasculatura cerebral completa foram adquiridos utilizando uma sequência do tipo *gradient-echo* com compensação de fluxo utilizando TE = 4.5ms e TR = 30ms, ângulo de flip = 90°, FOV = 19.2 x 19.2 mm e uma matriz de 192 x 192. Foram adquiridos 218 planos de 1 mm de espessura, separados por 0.1 mm, o que resulta em uma resolução espacial isotrópica efetiva de 100 μ m.

As imagens e os mapas de perfusão foram processados utilizando MATLAB R2006a (The MathWorks, Natick, MA). Os mapas quantitativos de perfusão, mostrados a seguir, foram gerados a partir da equação [35] com base na subtração das imagens obtidas após a marcação dos spins das imagens de controle. A média de cada um dos conjuntos foi realizada independentemente. Os angiogramas, propriamente ditos, foram gerados utilizando um algoritmo de projeção da máxima

intensidade (MIP, do inglês *Maximum Intensity Projections*) implementado em IDL 6.3 (ITT Visual Information Solutions, Boulder, CO). Diferenças significativas nos dados foram testadas com o teste t-Student usando Microsoft Office Excel 2003 SP3 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). O nível de significância foi definido para $p < 0.05$.

Figura 27: a) Imagens coronais típicas obtidas em ratos hipertensos. b) Mapa de perfusão global correspondente e territórios vasculares correspondendo à circulação c) esquerda e d) direita.

A Figura 27a mostra típicas imagens EPI coronais anatômicas do cérebro de um rato hipertenso. Imagens correspondentes de perfusão global ($\theta = 0^\circ$) estão mostradas na Figura 27b. A mesma sensibilidade à perfusão foi obtida em ambos os hemisférios, bem como sinal de perfusão equivalente em todos os planos, o que comprova que o esquema de aquisição não está afetando o sinal de perfusão. Além disso, pode-se apreciar um bom contraste entre matéria branca e cinzenta, além de uma interessante heterogeneidade no sinal de perfusão de diferentes regiões, atribuída às diferenças regionais na taxa metabólica (SOKOLOFF *et al.*, 1977). Para

obtenção do território de perfusão esquerdo, $\theta = -60^\circ$ foi utilizado, produzindo as imagens mostradas na Figura 27c. Da mesma forma, $\theta = +60^\circ$ deu origem às imagens mostradas na Figura 27d, correspondendo ao território de perfusão direito.

Tabela 3: Valores de CBF (ml/100g/min) obtidos para ambos os grupos de ratos, SD e SHR, utilizando $\theta = 0^\circ$, -60° e $+60^\circ$.

Rato	$\theta = 0^\circ$		$\theta = -60^\circ$		$\theta = +60^\circ$	
	Esq.	Dir.	Esq.	Dir.	Esq.	Dir.
SD	1	90	88	89	30	26
	2	124	127	120	39	42
	3	116	110	110	29	29
	4	98	100	96	30	23
	5	118	140	120	25	27
	6	132	139	130	26	30
Média $\pm$ SD	113 $\pm$ 16	117 $\pm$ 21	111 $\pm$ 16	30 $\pm$ 5	30 $\pm$ 7	112 $\pm$ 15
SHR	1	172	170	167	52	43
	2	110	111	113	26	29
	3	137	135	134	36	39
	4	175	175	167	38	30
	5	157	155	149	42	33
	6	131	133	136	32	35
Média $\pm$ SD	147 $\pm$ 25	147 $\pm$ 25	144 $\pm$ 21	38 $\pm$ 9	35 $\pm$ 5	149 $\pm$ 25

Todos os valores foram derivados de ROIs do mesmo tamanho, desenhadas manualmente, e posicionadas nos hemisférios esquerdo e direito do cérebro. Os valores são estatisticamente diferentes do lado contralateral ($p < 0.01$) tanto quando $\theta = -60^\circ$, como quando $\theta = +60^\circ$.

Os valores obtidos para perfusão utilizando $\theta = 0^\circ$, $\theta = -60^\circ$ e $\theta = +60^\circ$ para ambas as linhagens de ratos utilizadas neste estudo podem ser apreciados na Tabela 4. Valores globais de CBF nos hemisférios esquerdo e direito foram idênticos quando $\theta = 0^\circ$ ($p = 0.35$), indicando uma performance uniforme da bobina de marcação. Entretanto, a utilização do plano de marcação oblíquo reduziu, significativamente, os valores medidos de CBF no lado contralateral, enquanto manteve inalterados os valores obtidos no hemisfério ipsilateral. Quando $\theta = 60^\circ$, os valores de CBF obtidos no hemisfério esquerdo em ratos SD e SHR foram 27% e

26%, respectivamente, dos valores obtidos no hemisfério direito ($p < 0.01$). Da mesma forma, quando $\theta = -60^\circ$, uma atenuação do sinal no hemisfério contralateral de 74% e 76% relativo ao sinal do lado marcado ($p < 0.01$) foi obtida para ratos SD e SHR, respectivamente.

A Figura 28 mostra as variações nos territórios vasculares, determinadas utilizando ASL e angiografia, em ratos saudáveis e hipertensos. Respectivos MIPs (colunas esquerda e do meio) e a representação em cores dos mapas dos territórios de perfusão (coluna da direita), salientando as assimetrias observadas, podem ser analisadas. Ao longo do cérebro, os territórios de perfusão direito e esquerdo foram complementares na maior parte do cérebro, mas não completamente simétricos. A Figura 28a-c, mostra um padrão bastante similar, no qual se pode ver uma contribuição significativa da circulação esquerda para o território da ACA direita. As primeiras duas colunas (Figura 28a-b) foram obtidas em ratos SD enquanto a terceira coluna traz o mapa e os respectivos angiogramas de um rato hipertenso. Em todos os três casos, uma análise detalhada dos angiogramas revelou uma dominância lateralizada no segmento A1 esquerdo da ACA, como pode ser observado pelas regiões ressaltadas com setas brancas.

Um padrão interessante pode ser observado na Figura 28d, no qual a dominância na região da ACA se alterna conforme a posição da imagem. Os planos mais posteriores revelam uma contribuição para o território esquerdo, enquanto os mais anteriores revelam um padrão invertido.

Figura 28: Variações nos territórios vasculares em ratos saudáveis e hipertensos determinadas utilizando ASL e angiografia. Respective MIPs (colunas esquerda e do meio) e representação em cores dos mapas dos territórios de perfusão (coluna da direita) salientando a assimetria observada.

O respectivo angiograma revela que o segmento A1 do lado esquerdo da ACA é mais grosso que seu correspondente do lado direito, o que explicaria a dominância encontrada nos planos mais anteriores. Entretanto, esta inversão de padrões poderia ser justificada pela presença do pequeno vaso contribuindo assimetricamente para o lado direito da região da ACA. Já a Figura 28e mostra o território de perfusão obtido de um rato hipertenso mostrando um avanço no território esquerdo quando a circulação direita é marcada, o que também está de pleno acordo com o observado no respectivo angiograma. Entretanto, neste caso, uma contribuição significativa da circulação esquerda para o território de perfusão direito do núcleo hipotalâmico e talâmico paraventricular pode ser vista. Este padrão, em particular, foi o único apresentado exclusivamente por uma das linhagens, neste caso, a de ratos hipertensos.

Ao todo, 6 animais (4 SDs e 2 SHRs) apresentaram dominância do lado esquerdo da região da ACA, enquanto 2 animais (1 SD e 1 SHR) revelaram dominância direita na mesma região. Neste caso, o rato hipertenso também apresentou dominância na região da artéria talâmica. Dos animais restantes, 2 (1 SD e 1 SHR) apresentaram padrão de dominância alternada entre os hemisférios esquerdo e direito dependendo da posição do plano e os outros 2 (2 SHR) mostraram padrão simétrico na região da ACA, apesar de um deles apresentar dominância na região da artéria talâmica.

As diferentes dominâncias observadas estão sumarizadas na Figura 29. Na linha de cima, os dois exemplos de dominância lateralizada, esquerda e direita, respectivamente, da ACA. Na coluna de baixo, dois casos em que a dominância não é lateralizada. Em um deles (esquerdo), ambos os lados contribuem para o território do hemisfério contralateral. Na representação em cores, esta região aparece em

amarelo dado a mistura dos sinais de ambos os lados. No outro caso (direito) praticamente não se observa dominância no que se refere à região suprida pela ACA. Entretanto, o referido animal apresenta uma dominância lateralizada na região suprida pela artéria talâmica.

Figura 29: Conjunto dos diferentes tipos de dominâncias observados em ambos os grupos de animais.

Esses dados, obtidos em duas linhagens diferentes de animais, estão de acordo com um estudo recente realizado em humanos (HENDRIKSE *et al.*, 2004; VAN LAAR; HENDRIKSE *et al.*, 2006) no sentido de que uma grande variabilidade dos territórios de perfusão vascular foi encontrado em ambos os casos. Além disso, os dados demonstram que as causas prováveis para esses diferentes padrões são as variações anatômicas do COW, observadas mesmo em animais saudáveis, o que também está de acordo com o observado em humanos.

Um segundo grupo de animais, definido de forma semelhante ao utilizado no estudo dos territórios vasculares, foi induzido à hipercapnia através da exposição a níveis elevados de CO₂. Os parâmetros fisiológicos foram monitorados durante todo o experimento e estão listados na Tabela 4. Esses parâmetros não foram

estatisticamente diferentes entre os grupos para nenhuma das condições analisadas.

Tabela 4: Parâmetros fisiológicos obtidos em condição basal e sob hipercapnia.

Ratos	Nível de CO ₂	HR	RR	SPO ₂	ETCO ₂
SD	0 %	349 ± 2	51 ± 4	91 ± 3	21 ± 5
	5 %	348 ± 4	51 ± 6	90 ± 5	50 ± 5
	10 %	346 ± 7	52 ± 3	89 ± 7	81 ± 8
SHR	0 %	345 ± 6	50 ± 7	90 ± 4	22 ± 3
	5 %	346 ± 7	50 ± 7	89 ± 4	47 ± 3
	10 %	347 ± 4	52 ± 4	88 ± 4	78 ± 7

Batimentos cardíacos (HR, do inglês *Heart Rate*), taxa de respiração (RR, do inglês *Respiration Rate*), saturação do oxigênio periférico (SPO₂ do inglês *Saturation of Peripheral Oxygen*), e *end-tidal* CO₂ (ETCO₂). Não houve diferenças estatísticas entre ambos os grupos no que se refere aos parâmetros fisiológicos.

Os valores de CBF basal de duas importantes estruturas cerebrais, o córtex motor e o putâmen, bem como os valores para o cérebro todo foram obtidos para ambas as linhagens de ratos e estão mostrados na Figura 30.

Figura 30: Variação regional dos valores de CBF medidos em ratos saudáveis e hipertensos. As ROIs foram definidas de forma a englobar todo o cérebro, apenas o córtex motor ou o putâmen. Em todos os casos, os valores obtidos para os ratos SHR foram significativamente maiores que os para ratos SD ($p < 0.01$).

Os valores de CBF, considerando o cérebro todo, obtidos para os ratos hipertensos, 147 ± 24 ml/100g/min, foram significativamente mais altos que os obtidos para ratos saudáveis (115 ± 18 ml/100g/min, $p < 0.01$). Considerando valores regionais de CBF, no caso dos ratos SHR os valores obtidos variaram desde 163 ± 35 ml/100g/min no córtex motor até 136 ± 38 ml/100g/min no putâmen e, em ambos os casos, foram estatisticamente maiores que os respectivos valores obtidos para ratos SD, que foram, respectivamente, 125 ± 35 ml/100g/min ($p < 0.01$) na região cortical e 96 ± 29 ml/100g/min ($p < 0.01$) no putâmen.

Figura 31: Valores basais de CBF medidos em ratos saudáveis e hipertensos e suas respectivas respostas à indução de hipercapnia utilizando 5% e 10% de CO₂. Em todos os casos, os valores obtidos para os ratos SHR foram significativamente maiores que os obtidos para ratos SD ($p < 0.01$).

A resposta do CBF à hipercapnia foi avaliada em ambos os grupos de animais e está mostrada na Figura 31. Quando submetidos a 5% de CO₂, os valores globais de CBF obtidos nos ratos hipertensos, 186 ± 41 ml/100g/min, foram estatisticamente maiores que os obtidos nos ratos SD (147 ± 25 ml/100g/min, $p < 0.01$) representando um aumento de $28 \pm 6\%$ com relação à sua condição basal. O aumento verificado entre os ratos saudáveis, $31 \pm 7\%$, não foi estatisticamente

diferente do obtido pelos ratos hipertensos ($p = 0.06$) e pode ser avaliado na Figura 32. Da mesma forma, os valores de CBF obtidos quando os animais foram submetidos a 10% de CO_2 foram maiores no grupo de animais hipertensos (195 ± 42 ml/100g/min) do que no de animais saudáveis (166 ± 27 ml/100g/min, $p < 0.01$). Entretanto, neste caso, o aumento causado pela indução da hipercapnia entre os ratos SD quando comparados à sua condição basal foram significativamente maior que o observado entre os ratos SHR ($p < 0.01$). Tanto em condição basal como em hipercapnia, os valores de CBF obtidos no presente estudo estão de acordo com valores previamente publicados (DUONG *et al.*, 2001; SICARD *et al.*, 2003).

Figura 32: Mudanças percentuais nos valores de CBF quando comparados aos valores basais após a indução da hipercapnia utilizando 5% e 10% de CO_2 . Quando 5% de CO_2 foi utilizado para indução da hipercapnia, ambos os grupos apresentaram aumento nos valores de CBF equivalente. Entretanto, os valores de CBF aumentaram significativamente mais com relação aos níveis basais nos ratos SD do que nos ratos SHR quando 10% de CO_2 foi utilizado ($p < 0.01$).

7.2 Considerações gerais

Os dados obtidos no presente estudo demonstram uma grande variabilidade na extensão dos territórios de perfusão da circulação anterior em animais saudáveis

e hipertensos. Comportamento similar foi encontrado em estudos recentes realizados em uma grande amostra de voluntários (HENDRIKSE *et al.*, 2004; VAN LAAR; HENDRIKSE *et al.*, 2006). Um estudo angiográfico revelou que, como no caso dos humanos, essas variações estão relacionadas com diferenças anatômicas na formação do COW, presentes mesmo em animais sem nenhuma patologia diagnosticada. Entretanto, um padrão interessante foi encontrado na região talâmica, na qual apenas ratos hipertensos revelaram dominâncias lateralizadas, sugerindo a possibilidade de algum vínculo com a patologia. A informação obtida com as angiografias não permitiu, porém, uma elucidação melhor a respeito de má formação vascular características nesta área. A informação que a configuração do COW afeta a extensão dos territórios de perfusão cerebral pode ser importante na tentativa de prever, ou mesmo esclarecer, variações na extensão da região afetada após um AVC.

Além disso, os dados demonstram uma correlação positiva entre hipertensão e valores elevados de CBF. Tanto em condição basal como após a indução de hipercapnia, os ratos hipertensos apresentaram CBF regional e global maior que os ratos SD, que apresentaram valores de CBF condizentes com a literatura (DUONG *et al.*, 2001; SICARD *et al.*, 2003). Um comportamento similar foi, também, demonstrado recentemente em humanos (VAN LAAR; VAN DER GRAAF *et al.*, 2008). Com 5% de CO₂, o aumento nos valores de CBF comparados à suas respectivas linhas de base não foi estatisticamente diferente entre ambas as linhagens. Entretanto, quando submetidos a 10% de CO₂ os ratos hipertensos apresentaram uma reatividade vascular significativamente menor que ratos saudáveis. Sabe-se, entretanto, que a presença de hipertensão crônica causa remodelamento vascular (YAMAKAWA *et al.*, 2003) causando um aumento na

resistência vascular e uma redução na capacidade de deformação dos vasos (HEISTAD *et al.*, 1990; TUTTLE *et al.*, 2002). Além disso, sabe-se que a isoflurana atua no organismo como um potente vasodilatador cerebral (HANSEN *et al.*, 1988). Assim, é provável que essas diferenças estruturais entre ratos saudáveis e hipertensos reduzam a contratilidade das artérias cerebrais nos ratos SHR, o que, basicamente, dita a auto-regulação da circulação cerebral (STRANDGAARD; PAULSON, 1984), limitando, portanto, o nível de hiperemia induzido pela hipercapnia, o que explicaria a redução na reatividade vascular para altos níveis de CO₂ nesses animais.

Em suma, no presente estudo, exploramos as vantagens da combinação da sequência CASL com uma bobina de marcação dedicada para analisarmos e caracterizarmos os ratos SHR, uma linhagem bastante utilizada como modelo animal em estudos de AVC e outras doenças vasculares cerebrais. Os valores de CBF nesses animais se mostraram mais elevados que os do grupo de animais saudáveis tanto em condição basal como de hipercapnia. Entretanto, a reatividade vascular ao CO₂ foi restrita para altos valores de CO₂ indicando a presença de algum fator limitante da auto-regulação da circulação cerebral característico da presença de hipertensão crônica. Os resultados também demonstraram uma alta correlação entre os territórios de perfusão e as formações anatômicas do COW, corroborando, assim, a aplicabilidade do método apresentado para uma melhor compreensão da hemodinâmica cerebral.

8 ASL Dinâmica

Um dos objetivos principais da neurociência, bem como da neurofisiologia, é buscar a compreensão profunda da organização cerebral em termos de suas unidades anatômicas e funcionais (RAKIC, 2002). Os métodos modernos de neuroimagem, como imagens funcionais por RM (fMRI, do inglês *functional Magnetic Resonance Imaging*) (OGAWA *et al.*, 1990), PET (PHELPS *et al.*, 1982) e imagens ópticas de sinais intrínsecos (OIS, do inglês *Optical Imaging of Intrinsic Signals*) (LIEKE *et al.*, 1989) têm assumido uma papel cada vez maior no mapeamento das unidades funcionais fundamentais no córtex cerebral. Essas modalidades de imagens funcionais exploram o acoplamento da atividade celular com a regulação hemodinâmica do suprimento energético e remoção dos resíduos – conhecido como acoplamento cerebrovascular – para detectar as mudanças no CBF, CBV ou oxigenação sanguínea, quantidades essas que atuam como marcadores indiretos da atividade neuronal focal (VILLRINGER; DIRNAGL, 1995).

Como a resolução temporal e espacial das modalidades de neuroimagem é determinada pela especificidade dos sinais hemodinâmicos fundamentais, a

caracterização dos perfis espaciais e temporais da resposta hemodinâmica (HDR, do inglês *Hemodynamic Response*) a estímulos cerebrais focais se torna de suma importância para a correta interpretação e quantificação de dados funcionais (VILLRINGER; DIRNAGL, 1995). Evidências sugerem que as características espaciais e temporais fundamentais da HDR são suficientes para resolver a atividade subcortical e que a regulação hemodinâmica ocorre em uma escala espacial muito menor que a obtida em típicos experimentos de fMRI em animais e humanos. Conseqüentemente, informações mais detalhadas poderiam ser obtidas com um maior avanço tecnológico. Entretanto, ainda não está claro até que ponto os sinais hemodinâmicos seriam capazes de mapear populações neuronais elementares. Desta forma, a aplicabilidade da neuroimagem para o estudo da organização funcional do cérebro depende de pesquisas que tragam uma maior compreensão das evoluções temporais e espaciais de HDR.

A habilidade de medir de forma adequada e quantificar o CBF utilizando RM é um determinante para o progresso da compreensão da função cerebral. Nesta seção, serão introduzidos os conceitos de uma implementação da técnica ASL, conhecida como DASL, que permite medidas de CBF e CBF HDR com alta resolução temporal.

8.1 DASL

Nas seções anteriores, foi apresentado um desenvolvimento formal mostrando como, a partir das equações de Bloch, pode ser determinar os valores de CBF utilizando a técnica de ASL. Uma análise da Eq. [35] mostra que a quantificação de CBF depende do coeficiente de partição, λ , e de três outros parâmetros: o tempo de relaxação longitudinal do tecido, T_{1b} , o tempo de trânsito, τ ,

entre os planos de marcação e de aquisição da imagem, implícito na variável α , e a diferença entre os sinais obtidos nas condições de marcação e controle. Comumente, esses parâmetros são obtidos em experimentos separados, como descrito anteriormente. Além disso, a forma como esses parâmetros são determinados impossibilita uma análise dinâmica de variações rápidas. Em muitas aplicações, como, por exemplo, experimentos de fMRI para a determinação da HDR com alta resolução temporal ou o mapeamento dos tempos de trânsito associados ao diagnóstico de doenças vasculares cerebrais, seria essencial determinar os valores de CBF dinamicamente.

Uma forma eficiente de obter medidas dinâmicas de CBF é impor variações periódicas sistemáticas no grau de marcação α . De acordo com a Eq. [26], uma variação periódica no grau de marcação causaria variações, também periódicas, na magnetização do tecido. Assim, uma análise temporal da resposta do tecido é capaz de fornecer uma quantificação dinâmica de T_{1b} , τ e CBF. A esta análise transiente, dá-se o nome DASL (BARBIER *et al.*, 1999; BARBIER *et al.*, 2001)

Esta análise dinâmica pode ser introduzida simplesmente fazendo com que o grau de marcação seja descrito por uma função periódica dependente do tempo, ou seja, $\alpha = \alpha(t)$. Neste caso, a Eq. [26] pode ser integrada, caracterizando a evolução temporal de um sistema, em estado estacionário, sujeito a uma função de marcação dependente do tempo, dada por (BARBIER *et al.*, 1999):

$$M_b(t) = M_b^0 - 2\alpha(t)M_b^0 \frac{CBF}{\lambda} e^{-\tau/T_{1a}} \otimes e^{-(t-\tau)/T_{1app}} \quad [43]$$

em que $\otimes$ simboliza um produto de convolução. Da Eq. [43], pode-se notar que independente da função escolhida para realizar a marcação, o tecido responde com um pequeno atraso temporal introduzido pelo tempo de trânsito τ .

Em teoria, a função de marcação pode ser definida arbitrariamente desde que os spins arteriais possam ser invertidos de acordo, o que vincula sua definição unicamente aos objetivos experimentais. Uma opção simples é utilizar uma função quadrada, com período 2Δ , definida da seguinte forma:

$$\alpha(t) = \begin{cases} \alpha_0 e^{-t/T_{1a}} & , \quad 0 < t \leq \Delta \\ 0 & , \quad \Delta < t \leq 2\Delta \end{cases} \quad [44]$$

Neste caso, a resposta periódica da magnetização do tecido seria dada por (BARBIER *et al.*, 1999):

$$\begin{aligned} M_b(\tau < t \leq \Delta + \tau) &= M_b^0 \left[1 - 2T_{1app} \alpha_0 e^{-\tau/T_{1a}} \frac{CBF}{\lambda} \right. \\ &\quad \times \left(\frac{(1 - e^{-\Delta/T_{1app}}) e^{-(t-\tau)/T_{1app}}}{e^{\Delta/T_{1app}} - e^{-\Delta/T_{1app}}} + (1 - e^{-(t-\tau)/T_{1app}}) \right) \Big] \\ M_b(\Delta + \tau < t \leq 2\Delta + \tau) &= M_b^0 \left[1 - 2T_{1app} \alpha_0 e^{-\tau/T_{1a}} \frac{CBF}{\lambda} \right. \\ &\quad \times \left(\left(\frac{(1 - e^{-\Delta/T_{1app}}) e^{-\Delta/T_{1app}}}{e^{\Delta/T_{1app}} - e^{-\Delta/T_{1app}}} + (1 - e^{-\Delta/T_{1app}}) \right) e^{-(t-\Delta-\tau)/T_{1app}} \right) \Big] \end{aligned} \quad [45]$$

A Figura 33 mostra a simulação da resposta do tecido submetido a diferentes frequências de uma função de marcação periódica quadrada, expressada pela Eq. [45]. Como esperado, a resposta de tecido está deslocada, temporalmente, com relação à função de marcação, de um período igual ao tempo de trânsito. Além disso, tanto a amplitude como a fase da resposta do tecido são moduladas pela função de marcação. A modulação na fase ocorre devido à forma como a função altera a magnetização dos spins arteriais fluindo para a região de detecção, enquanto a modulação na amplitude ocorre baseada em quão rápido os estados

marcados e não marcados se alternam quando comparado ao tempo de trânsito e à taxa de relaxação longitudinal do tecido.

Figura 33: Simulação da resposta do tecido a três frequências distintas da função de marcação, após atingir o estado estacionário. As simulações foram realizadas utilizando os seguintes parâmetros: $T_{1app} = 1.75$ s, $\tau = 0.25$ s, CBF = 150 ml/100g/min and $\alpha_0 = 0.90$. Definiram-se as seguintes frequências para a função de marcação: a) 0.20Hz, b) 0.10Hz e c) 0.05Hz. As linhas pontilhadas representam a função de marcação (escala à direita) e as linhas sólidas mostram a resposta do tecido em unidades arbitrárias (escala à esquerda). d) Gráfico com a escala ampliada na região de máxima amplitude em cada uma das situações. Pode-se notar que frequências de marcação diferentes modulam a amplitude da resposta do tecido, enquanto o atraso com relação a função de marcação é constante e governado pelo tempo de trânsito.

A técnica DASL tem a vantagem de permitir uma repetição contínua do experimento de ASL, de forma que a resposta do tecido pode ser analisada para a determinação, de uma maneira dinâmica, dos três parâmetros de interesse: T_{1b} , τ e CBF. A obtenção dessas grandezas pode ser realizada com alta sensibilidade, pois o período de marcação, 2Δ , pode ser feito longo o suficiente de maneira que a magnetização do tecido atinja o estado estacionário, como mostrado na Figura 33c.

Além disso, a característica periódica da resposta obtida favorece uma análise dos dados no domínio de frequências, facilitando, assim, processos de filtragem e eliminação de ruído.

É importante notar que a utilização de frequências de marcação muito altas, o que aumenta o número de ciclos dentro de um período de tempo definido, favorecendo a realização de médias, pode comprometer a qualidade na estimativa de T_{1app} devido à diminuição do tempo permitido para a evolução da magnetização do tecido e à redução do número de pontos utilizados na determinação. Além disso, o grau de precisão na determinação dos tempos de trânsito é proporcional à acurácia na determinação do deslocamento temporal entre a função de marcação e a resposta de tecido. Desta forma, a taxa de amostragem é limitada pelo menor tempo de trânsito que se pretende determinar, o que pode significar uma limitação significativa nos estudos utilizando pequenos animais, nos quais os tempos de trânsito são da ordem de 100 – 350 ms (ZHANG *et al.*, 1992; BARBIER *et al.*, 1999; BARBIER *et al.*, 2001).

8.2 Métodos e resultados

O presente estudo foi aprovado pelo IACUC do NINDS, NIH (protocolo IACUC #1209-05) e realizado em ratos adultos do tipo SD (N = 8) (*Charles River Laboratories White Plains, NY*), pesando 250-350 g. Os animais foram divididos em dois grupos experimentais. O primeiro grupo (N = 4) foi utilizado na caracterização da técnica DASL. Para este grupo, uma sequência convencional CASL foi utilizada para comparação dos valores de CBF obtidos utilizando ambas as técnicas. Os animais foram anestesiados com isoflurana (5% para indução, 2% para manutenção) em uma mistura 2:2:1 de ar, nitrogênio e oxigênio. Após a indução anestésica, os

animais foram restritos em um suporte estereotático de cabeça compatível com RM utilizando pinos de orelha e barra de mordedura. A temperatura retal foi mantida a 37.0 ± 1.0 °C utilizando uma cama elétrica também compatível com RM (Rapid Biomedical GmbH, Rimpf, Alemanha) enquanto a fisiologia foi monitorada com auxílio de um oxímetro de pulso (Surgivet, Waukesha, WI).

O segundo grupo (N = 4) foi utilizado nos experimentos funcionais utilizando DASL. Neste caso, os animais foram submetidos a um procedimento cirúrgico para que cateteres PE-50 fossem introduzidos na artéria e veia femoral direita para análise sanguínea e administração intravenosa do anestésico, respectivamente. Durante o procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados com isoflurana (5% para indução, 2% para manutenção) em uma mistura 2:2:1 de ar, nitrogênio e oxigênio, entubados e mecanicamente ventilados. Após a cirurgia, os animais foram restritos em um suporte de cabeça estereotático compatível com RM utilizando pinos de orelha e barra de mordedura e a isoflurana foi substituída por α -chloralose (dose inicial de 80 mg/kg seguido por uma infusão constante de 26.7 mg/kg/h). Junto com o anestésico, os animais receberam *Pancuronium Bromide* (dose inicial de 2 mg/kg seguido por infusão constante de 2 mg/kg/h) para minimizar movimentos residuais. A temperatura retal foi mantida a 37.0 ± 1.0 °C utilizando uma cama elétrica compatível com RM (Rapid Biomedical GmbH, Rimpf, Alemanha) e os parâmetros respiratórios foram monitorados utilizando um capnógrafo (BCI 300 Capnocheck, BCI Inc., Waukesha, WI, USA). Amostras de sangue foram analisadas periodicamente e a fisiologia do animal corrigida para garantir estabilidade durante o experimento.

Os experimentos foram conduzidos no mesmo sistema de alto campo dedicado a estudos animais descrito anteriormente, e as sessões de imagens foram realizadas utilizando o conjunto de 3 bobinas (transmissão/recepção/marcação).

Uma imagem localizadora foi adquirida para ajustar a posição do cérebro do animal no isocentro do magneto. A posição da bobina de marcação com respeito às artérias de interesse foi verificada utilizando a mesma como transmissora para aquisição de uma imagem sagital e outra coronal do pescoço do animal. A posição de marcação Δz_0 foi definida como sendo o centro do perfil do sinal longitudinal gerado pela bobina.

Imagens de perfusão DASL coronais foram adquiridas usando uma sequência *gradient-echo* EPI com os seguintes parâmetros: TE = 20 ms, TR = 250 ms, FOV = 25.6 x 25.6 mm² e matriz = 128 x 128, resultando em uma resolução espacial de 200 μ m no plano. Um único plano de 2 mm de espessura foi definido sobre a região do córtex somatossensorial, 0-1mm superior ao Bregma. Um pulso de marcação de 200 ms foi aplicado na presença de um gradiente longitudinal $G_z = 1$ G/cm na frequência de marcação apropriada. Uma potência de RF de 2W, otimizada anteriormente, foi utilizada para maximizar a eficiência de marcação. Uma frequência DASL de 0.05 Hz foi utilizada para determinação de CBF, tempo de trânsito e T_{1app} em repouso. Para os experimentos funcionais, uma frequência DASL de 0.0125 Hz foi utilizada e o paradigma funcional foi apresentado através de estímulos elétricos nas patas dianteiras, compostos de pulsos de 2mA aplicados em uma frequência de 3 Hz, em blocos de 10 s “off” / 3 s “on” / 17 s “off”. A definição do paradigma funcional foi feita de forma que os estímulos fossem apresentados durante o período estacionário do ciclo DASL para evitar efeitos transientes.

Os dados foram processados utilizando MATLAB R2006a (The MathWorks, Natick, MA) e Stimulate (Center for Magnetic Resonance Research, University of Minnesota Medical School, Minneapolis, MN). Os mapas quantitativos de perfusão, tempo de trânsito e tempo de relaxação foram gerados a partir da equação [45]. Diferenças significativas nos dados foram testadas com o teste t-Student usando Microsoft Office Excel 2003 SP3 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). O nível de significância foi definido para $p < 0.05$.

Inicialmente, todos os dados foram analisados visualmente para verificar consistência na aquisição e, então, submetidos a um algoritmo de correção de linha de base. Para isto, cada período da resposta do tecido à função de marcação foi substituído pelo seu respectivo valor médio (duração e intensidade média). Um *fitting* polinomial deste conjunto de pontos foi realizado, cujo resultado, sem o termo de ordem zero, foi utilizado para realizar uma subtração ponto a ponto dos dados, eliminando as oscilações da linha de base.

Corrigida a linha de base, os dados foram submetidos a um *fitting* com base no modelo descrito na Eq. [45]. A FT da curva obtida após o *fitting* foi utilizada para determinar o espectro de frequências permitido pelo modelo, enquanto a FT dos dados revelava as perturbações periódicas presente nos dados. Definiu-se, então, um filtro complexo baseado nas componentes reais e imaginárias do espectro de frequências obtido a partir do modelo DASL, o qual foi aplicado nos dados para eliminar todas as frequências não previstas no modelo.

Figura 34: a) Dados originais, após a correção da linha de base, obtidos utilizando DASL. b) Componentes reais (esquerda) e imaginárias (direita) da FT dos dados e c) as respectivas componentes obtidas da FT do *fitting* utilizando o modelo expresso pela Eq. [45]. d) Espectro de frequências dos dados filtrados com base nas frequências permitidas pelo modelo DASL. Além da redução significativa do ruído, o pico em 1 Hz, introduzido devido à frequência respiratória, também foi filtrado. e) Dados filtrados mostrando uma redução significativa do ruído.

O processo de filtragem dos dados baseado no modelo DASL pode ser apreciado na Figura 34. Os dados originais, após a correção da linha de base, obtidos utilizando a sequência DASL, estão mostrados na Figura 34a. Apesar da boa SNR, o ruído presente nos dados é visível. A Figura 34b mostra as componentes reais (esquerda) e imaginárias (direita) da FT dos dados, enquanto o item c mostra a informação análoga obtida a partir da FT do *fitting* dos dados originais utilizando a Eq. [45]. Os dados, ainda no domínio da frequência, filtrados com base nas frequências permitidas pelo modelo, estão mostrados na Figura 34d. Componentes com amplitude negativa foram removidas pelo filtro, bem como a componente de frequência presente na faixa de 1 Hz. Esta frequência, correspondendo à taxa respiratória, demonstra a aplicabilidade deste método de filtragem para eliminar modulações periódicas introduzidas por variações fisiológicas. Os dados filtrados podem ser vistos na Figura 34e, demonstrando uma redução significativa no ruído. A vantagem deste processo de filtragem é que mesmo perturbações ocorrendo a muito baixa frequência podem ser eliminadas dos dados sem comprometer a informação a respeito da resposta do tecido.

Após a realização da filtragem, mapas de perfusão, tempo de trânsito e T_{1app} foram obtidos. Típicos mapas podem ser apreciados na Figura 35. É possível notar a alta SNR apresentada pelos mapas de CBF e T_{1app} gerados a partir dos dados DASL. Como a resolução temporal da sequência era da mesma ordem dos tempos de trânsito em ratos, o respectivo mapa se mostrou mais ruidoso que o obtido para os outros parâmetros. No caso deste animal, em particular, o valor global de CBF foi de 121 ml/100g/min, enquanto os valores globais obtidos para T_{1app} e τ foram, respectivamente, 1119 ms e 283 ms.

Figura 35: Mapas obtidos a partir dos dados adquiridos utilizando DASL. a) Mapa de CBF, apresentando alta SNR. b) Mapa de T_{1app} , no qual também se pode notar a alta SNR e c) Mapa de tempo de trânsito, mais ruidoso em função do tempo de trânsito em ratos ser comparável à resolução temporal da técnica utilizada.

Os valores de CBF basal de duas importantes estruturas cerebrais, o córtex motor e o putâmen, bem como os valores para o cérebro todo, foram obtidos para o grupo de animais e estão mostrados na Figura 36. Valores de CBF obtidos utilizando uma sequência CASL convencional também estão listados de forma a permitir uma comparação entre os valores obtidos com ambas as implementações.

Figura 36: Variação regional dos valores de CBF medidos em ratos SD. As ROIs foram definidas de forma a englobar todo o cérebro, apenas o córtex motor ou o putâmen. Valores obtidos utilizando uma sequência CASL convencional também estão listados.

Os valores de CBF considerando o cérebro todo obtidos utilizando DASL, 125 ± 11 ml/100g/min, foram equivalentes aos valores obtidos considerando a mesma ROI e uma seqüência CASL convencional (119 ± 12 ml/100g/min, $p = 0.2$). Considerando os valores regionais de CBF, o mesmo comportamento foi observado e os valores de CBF variaram desde 132 ± 11 ml/100g/min no córtex motor até 113 ± 15 ml/100g/min no putâmen quando DASL foi utilizada. Já com CASL, os valores obtidos foram, respectivamente, 128 ± 11 ml/100g/min na região cortical e 104 ± 13 ml/100g/min no putâmen.

Figura 37: Variação regional dos valores de a) T_{1app} e b) τ medidos em ratos SD. Em ambos os casos, as ROIs foram definidas de forma a englobar o córtex motor ou o putâmen.

Os valores de T_{1app} e tempo de trânsito foram determinados para o grupo de animais utilizado no presente estudo e estão mostrados na Figura 37. Para T_{1app} , os valores obtidos na região do córtex motor e no putâmen foram, respectivamente, 1301 ± 123 ms e 1155 ± 114 ms (Figura 37a). Já para τ , os valores apresentados foram, respectivamente, 273 ± 41 ms no córtex e 241 ± 34 ms no putâmen (Figura 37b) e encontram-se dentro dos limites de valores publicados previamente (ZHANG *et al.*, 1992; BARBIER *et al.*, 1999; BARBIER *et al.*, 2001).

A aplicabilidade da técnica DASL na investigação da resposta do CBF a estímulos funcionais foi analisada utilizando estimulação somatossensorial bilateral e pode ser apreciada na Figura 38. A Figura 38a mostra uma mapa de ativação da resposta funcional BOLD. Regiões robustas de ativação foram obtidas no córtex somatossensitivo em ambos os hemisférios. A Figura 38b mostra a evolução temporal da magnetização do tecido na região ativada quando submetido às modulações DASL e estímulos funcionais. Após a filtragem, uma média é realizada e todos os ciclos são concatenados em um único ciclo DASL, mostrado na Figura 38c. Os períodos nos quais os estímulos são apresentados estão indicados pelas barras horizontais embaixo da resposta hemodinâmica. A resposta hemodinâmica funcional pode ser claramente vista sobre a resposta obtida no experimento DASL. O período de controle do ciclo DASL mostra a resposta BOLD, enquanto o de marcação revela uma mistura do contraste BOLD com CBF, ambos com fases opostas. Como os aumentos funcionais em CBF causam uma redução no sinal ASL, as mudanças funcionais efetivas no sinal são menores durante a parte do ciclo DASL em que a marcação dos spins ocorre (quando os contrastes gerados pelo contraste BOLD e ASL se opõem) do que durante os períodos de controle, nos quais as mudanças são determinadas apenas pelo contraste BOLD.

Figura 38: a) Mapa de t -score mostrando a resposta funcional BOLD à estimulação bilateral das patas dianteiras. Regiões robustas de ativação podem ser vistas em ambos os hemisférios. b) Evolução temporal do sinal obtido na região de ativação em um experimento combinando DASL e fMRI. A hemodinâmica funcional aparece superimposta à resposta DASL. c) Média de todos os ciclos DASL, obtidos após a filtragem dos dados. Os períodos nos quais os estímulos foram apresentados estão indicados pela barras horizontais embaixo da resposta hemodinâmica.

8.3 Considerações gerais

A resolução temporal dos métodos de ASL para quantificação de CBF é intrinsecamente baixa devido à necessidade da aquisição de duas imagens distintas. Além disso, o fato de que o contraste de perfusão apropriado é obtido apenas quando tempo suficiente é deixado para que os spins atinjam a região de interesse e realizem a troca de magnetização com os spins presentes no tecido, também contribui neste sentido. Assim, a técnica DASL se apresenta como uma alternativa interessante para melhorar a resolução temporal, uma vez que os dados podem ser

adquiridos com uma taxa de amostragem alta enquanto o estado de magnetização do cérebro oscila entre as condições de controle e marcação induzidas por uma função de marcação periódica.

A possibilidade de se obter três dos parâmetros relacionados com a quantificação do CBF torna a técnica atrativa para análises da hemodinâmica em estudos da função cerebral e em estudos clínicos de patologias vasculares cerebrais. A repetição periódica da função de marcação dá a DASL a vantagem de permitir a obtenção de medidas de CBF com alta SNR devido às subseqüentes amostragens e ao eficiente procedimento de filtragem.

Como discutido anteriormente, uma série de métodos foram propostos recentemente para mapear os territórios de perfusão. Entretanto, nenhuma das técnicas propostas até o presente momento possui resolução temporal suficiente para permitir uma caracterização detalhada das mudanças nos padrões de perfusão vascular associados com AVC focal ou hemorragia. A técnica DASL pode ser uma implementação interessante para estas aplicações, em que mudanças nos territórios vasculares são acompanhadas de mudanças nos tempos de trânsito devido à alteração nos padrões de perfusão.

Em suma, DASL constitui uma plataforma experimental versátil para o estudo das características espaciais e temporais da hemodinâmica cerebral, seja em condições basais ou funcionais. Otimizações da técnica devem permitir a análise detalhada da natureza vascular dos contrastes BOLD e ASL, bem como as mudanças nos tempos de trânsito vascular e territórios de perfusão associadas a hiperemia funcional.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diferente de outros órgãos do corpo, o cérebro é criticamente dependente de um fornecimento contínuo de sangue. Dado sua elevada demanda energética, o cérebro opera sob um rigoroso acoplamento da atividade elétrica neuronal à regulação hemodinâmica do fornecimento de nutrientes energéticos e remoção dos resíduos da atividade elétrica. Este acoplamento neurovascular é composto de mecanismos complexos e redundantes que têm como principal objetivo regular o CBF com grande precisão espacial e temporal de modo a manter a homeostase do tecido cerebral. Tais mecanismos resultam de uma ação integrada entre neurônios, glia e vasos sanguíneos, que formam uma "unidade neurovascular" que age ao nível celular para regular o fluxo sanguíneo local. Perturbações nos mecanismos de controle causam disfunção cerebral e levam a doenças diversas como, por exemplo, as doenças de Alzheimer e de Parkinson, a isquemia cerebral ou o derrame cerebral. Desta forma, compreender os níveis de CBF e suas variações é fundamental e inúmeras pesquisas têm sido realizadas no sentido de determinar métodos que permitam a quantificação e o monitoramento desta grandeza crucial para a viabilidade dos tecidos.

Tipicamente, as técnicas para determinação dos valores de CBF se desenvolveram com base na teoria que analisa a cinética de um agente marcador enquanto o mesmo se encontra em estado de perfusão no tecido de interesse. No caso particular de RM, a medida de perfusão pode ser feita utilizando tanto agentes de contraste exógenos como endógenos. A utilização de marcadores endógenos, explorada pelos métodos baseados em ASL, agrega uma característica não invasiva à esta classe de metodologias que permite o monitoramento longitudinal dos valores

de CBF, favorecendo, assim, a obtenção de informações dinâmicas. Além disso, a segurança que a irradiação não ionizante utilizada em RM representa quando comparada às técnicas concorrentes, como PET e SPECT, constitui uma vantagem significativa da técnica.

O presente trabalho explorou a abordagem contínua da técnica ASL para a quantificação dos valores de CBF em humanos e animais. Os dados apresentados demonstram a eficiência da combinação da sequência CASL com uma bobina dedicada de marcação para o estudo da hemodinâmica cerebral. Uma das principais vantagens da utilização de uma bobina dedicada em experimentos CASL é a redução dos efeitos de transferência de magnetização, resultando em uma diferença maior entre as imagens ASL e as de controle, aumentando a SNR e simplificando a aquisição de imagens do cérebro todo. Além disso, esta abordagem permite uma reduzida deposição de potência no sujeito, restringindo-a às áreas vizinhas à bobina e evitando a utilização do pulso de RF durante a aquisição das imagens de controle.

A grande desvantagem do método apresentado é que sua implementação requer a utilização de um hardware extra, o que pode limitar sua aplicação em sistemas clínicos. Entretanto, os últimos anos têm sido marcado por significativos avanços tecnológicos nas áreas de hardware e software dos equipamentos de RM, de forma que a expectativa é que esta limitação deva estar restrita aos dias atuais e que, em um futuro breve, as alterações necessárias à implementação da metodologia façam parte da configuração padrão dos equipamentos clínicos.

Um aumento recente na demanda clínica no sentido de utilizar não somente o estado de desobstrução arterial fornecido pelos angiogramas, mas também, a informação a respeito da extensão do tecido suprido por determinada artéria impulsionou o desenvolvimento de metodologias que permitissem a medida seletiva

de CBF. Os territórios vasculares de perfusão, como são conhecidos, fornecem informação complementar à obtida com os angiogramas no que se refere à quantificação do estado de perfusão do tecido, e têm se provado uma ferramenta bastante útil tanto no ambiente acadêmico como em aplicações clínicas de problemas vasculares cerebrais. Em um aspecto preventivo, o mapeamento dos territórios vasculares permite a identificação de anormalidades no fluxo sanguíneo e auxilia na análise da extensão das regiões com elevado risco de dano em caso de AVC. Além disso, possibilita a obtenção de informações sobre a circulação colateral, um parâmetro clínico de suma importância no planejamento cirúrgico para pacientes submetidos a intervenções vasculares. Fora isto, o mapeamento dos territórios de perfusão permite a análise da extensão da região afetada após um AVC e o acompanhamento da adaptação da vasculatura como resultado da redistribuição devido ao fluxo colateral compensatório ou à recanalização da artéria oclusa.

Utilizando a bobina dedicada de marcação com perfil de excitação efetivo restrito, imagens dos territórios vasculares foram obtidas com alta SNR e delineação robusta em animais e humanos. Como o alcance transversal da bobina de marcação utilizada no presente trabalho abrange todas as principais artérias na região do pescoço, a técnica permite obtenção de imagens de perfusão global na mesma sessão experimental, sem a necessidade de reposicionar o voluntário e/ou a bobina. Isto constitui uma vantagem prática significativa do método apresentado, quando comparado às implementações anteriores que também se beneficiavam de uma bobina dedicada para marcação.

Além da desvantagem relativa à utilização de um hardware ainda não comumente disponível em sistemas clínicos, o método apresentado está restrito à realização da marcação na região do pescoço o que, tipicamente, limita a

seletividade à circulação esquerda e direita. Muito embora este nível de separação seja restrito, as técnicas propostas até o presente momento que possibilitam maior seletividade sofrem com a presença de artefatos causados pela superposição dos planos de marcação com a região da imagem, o que exige a utilização de esquemas de marcação mais complexos e reduz a SNR dos mapas de perfusão obtidos. Além disso, a obtenção dos territórios vasculares exige a utilização de algoritmos robustos de pós processamento para reduzir imperfeições na delimitação dos mesmos. Desta forma, as pesquisas nesta área devem seguir duas direções principais no sentido de eliminar as limitações técnicas associada a cada uma das implementações, melhorando a sensibilidade e a cobertura espacial e, principalmente, no sentido de trazê-las para o ambiente clínico para que sejam utilizadas rotineiramente em pacientes.

A implementação dinâmica da técnica ASL constitui uma plataforma experimental versátil para o estudo das características espaciais e temporais da hemodinâmica cerebral, e os resultados apresentados demonstram isto tanto em condições basais como funcionais. Uma aplicação interessante para a metodologia seria a sua utilização para a determinação dos territórios de perfusão vascular. Uma das deficiências dos métodos propostos para tal finalidade está relacionada à baixa resolução temporal intrínseca, limitando, por exemplo, uma caracterização detalhada das mudanças nos padrões de perfusão vascular causadas por problemas vasculares em sua fase aguda. Uma vez que os dados DASL podem ser obtidos com alta resolução temporal, esta abordagem certamente contribuiria no sentido de aumentar a gama de aplicações dos métodos para mapeamento dos territórios de perfusão.

Futuros estudos devem se beneficiar destas implementações para obter maiores informações a respeito da natureza vascular dos contrastes BOLD e ASL, bem como das mudanças nos tempos de trânsito vascular e territórios de perfusão associadas à hiperemia funcional.

Em suma, ASL é uma técnica extremamente poderosa capaz de fornecer informações quantitativas a respeito do fluxo sanguíneo de forma completamente não invasiva. Uma vez que a perfusão é um processo fisiológico de fundamental importância e é afetado amplamente por problemas patofisiológicos, esta técnica possui uma extensa área de aplicação em pesquisas básicas e clínicas da fisiologia cerebral. Sua aplicabilidade já foi demonstrada em diferentes aplicações na área de neuroimagem, incluindo problemas neurovasculares agudos e crônicos, epilepsia, doenças neurodegenerativas, doenças relacionadas ao envelhecimento e ao desenvolvimento e doenças neuropsiquiátricas. Os avanços técnicos recentes têm contribuído significativamente para melhorar a sensibilidade destes métodos baseados em ASL e devem, cada vez mais, favorecer suas utilizações em rotinas clínicas.

REFERÊNCIAS

- ACKERMAN, J. J., *et al.* Deuterium nuclear magnetic resonance measurements of blood flow and tissue perfusion employing $2\text{H}_2\text{O}$ as a freely diffusible tracer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v.84, n.12, Jun, p.4099-102. 1987.
- ALLEY, M. T., *et al.* Angiographic imaging with 2D RF pulses. *Magn. Reson. Med.*, v.37, n.2, Feb, p.260-7. 1997.
- ALSOP, D. C.; DETRE, J. A. Reduced transit-time sensitivity in noninvasive magnetic resonance imaging of human cerebral blood flow. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, v.16, n.6, Nov, p.1236-49. 1996.
- ALSOP, D. C.; DETRE, J. A. Multisection cerebral blood flow MR imaging with continuous arterial spin labeling. *Radiology*, v.208, n.2, Aug, p.410-6. 1998.
- AXEL, L. Cerebral blood flow determination by rapid-sequence computed tomography: theoretical analysis. *Radiology*, v.137, n.3, Dec, p.679-86. 1980.
- AXEL, L. Tissue mean transit time from dynamic computed tomography by a simple deconvolution technique. *Invest. Radiol.*, v.18, n.1, Jan-Feb, p.94-9. 1983.
- BARBIER, E. L., *et al.* Perfusion analysis using dynamic arterial spin labeling (DASL). *Magn. Reson. Med.*, v.41, n.2, Feb, p.299-308. 1999.
- BARBIER, E. L., *et al.* Perfusion imaging using dynamic arterial spin labeling (DASL). *Magn. Reson. Med.*, v.45, n.6, Jun, p.1021-9. 2001.
- BELLIVEAU, J. W., *et al.* Functional cerebral imaging by susceptibility-contrast NMR. *Magn. Reson. Med.*, v.14, n.3, Jun, p.538-46. 1990.
- BLOCH, F., *et al.* Nuclear Induction. *Physical Review*, v.69, n.3-4, p.127-127. 1946.
- BOTTOMLEY, P. A.; HARDY, C. J. Two-dimensional spatially selective spin inversion and spin-echo refocusing with a single nuclear magnetic resonance pulse. *J. Appl. Phys.*, v.62, n.10, p.4284-4290. 1987.
- CALAMANTE, F., *et al.* A model for quantification of perfusion in pulsed labelling techniques. *NMR Biomed.*, v.9, n.2, Apr, p.79-83. 1996.
- CAMPBELL, A. M.; BEAULIEU, C. Comparison of multislice and single-slice acquisitions for pulsed arterial spin labeling measurements of cerebral perfusion. *Magn. Reson. Imaging*, v.24, n.7, Sep, p.869-76. 2006.
- CATAFAU, A. M. Brain SPECT in clinical practice. Part I: perfusion. *J. Nucl. Med.*, v.42, n.2, Feb, p.259-71. 2001.

- CHA, S. Perfusion MR imaging: basic principles and clinical applications. *Magn. Reson. Imaging Clin. N. Am.*, v.11, n.3, Aug, p.403-13. 2003.
- CLINE, H. E., *et al.* Fast MR cardiac profiling with two-dimensional selective pulses. *Magn. Reson. Med.*, v.17, n.2, Feb, p.390-401. 1991.
- COYLE, P. Different susceptibilities to cerebral infarction in spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive Sprague-Dawley rats. *Stroke*, v.17, n.3, May-Jun, p.520-5. 1986.
- COYLE, P. Dorsal cerebral collaterals of stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP) and Wistar Kyoto rats (WKY). *Anat. Rec.*, v.218, n.1, May, p.40-4. 1987.
- DANKER, J. F.; DUONG, T. Q. Quantitative regional cerebral blood flow MRI of animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Brain Res.*, v.1150, May 30, p.217-24. 2007.
- DAVIES, N. P.; JEZZARD, P. Selective arterial spin labeling (SASL): perfusion territory mapping of selected feeding arteries tagged using two-dimensional radiofrequency pulses. *Magn. Reson. Med.*, v.49, n.6, Jun, p.1133-42. 2003.
- DETRE, J. A., *et al.* Perfusion imaging. *Magn. Reson. Med.*, v.23, n.1, Jan, p.37-45. 1992.
- DETRE, J. A., *et al.* Tissue specific perfusion imaging using arterial spin labeling. *NMR Biomed.*, v.7, n.1-2, Mar, p.75-82. 1994.
- DIXON, W. T., *et al.* Projection angiograms of blood labeled by adiabatic fast passage. *Magn. Reson. Med.*, v.3, n.3, Jun, p.454-62. 1986.
- DRAYER, B. P., *et al.* Xenon enhanced CT for analysis of cerebral integrity, perfusion, and blood flow. *Stroke*, v.9, n.2, Mar-Apr, p.123-30. 1978.
- DUONG, T. Q., *et al.* Effect of hyperoxia, hypercapnia, and hypoxia on cerebral interstitial oxygen tension and cerebral blood flow. *Magn. Reson. Med.*, v.45, n.1, Jan, p.61-70. 2001.
- DUPUIS, F., *et al.* Comparative effects of the angiotensin II receptor blocker, telmisartan, and the angiotensin-converting enzyme inhibitor, ramipril, on cerebrovascular structure in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.*, v.23, n.5, May, p.1061-6. 2005.
- EASTWOOD, J. D., *et al.* Magnetic resonance imaging with lateralized arterial spin labeling. *Magn. Reson. Imaging*, v.20, n.8, Oct, p.583-6. 2002.
- EDELMAN, R. R., *et al.* Magnetic resonance imaging of flow dynamics in the circle of Willis. *Stroke*, v.21, n.1, Jan, p.56-65. 1990.
- EDELMAN, R. R., *et al.* Qualitative mapping of cerebral blood flow and functional localization with echo-planar MR imaging and signal targeting with alternating radio frequency. *Radiology*, v.192, n.2, Aug, p.513-20. 1994.

- EICHLING, J. O., *et al.* Evidence of the limitations of water as a freely diffusible tracer in brain of the rhesus monkey. *Circ. Res.*, v.35, n.3, Sep, p.358-64. 1974.
- ERNST, R. R.; ANDERSON, W. A. Applications of Fourier transform spectroscopy to magnetic resonance. *Review of Scientific Instrument*, v.37, p.93-102. 1966.
- FURST, G., *et al.* Selective MR angiography and intracranial collateral blood flow. *J. Comput. Assist. Tomogr.*, v.17, n.2, Mar-Apr, p.178-83. 1993.
- GARRAUX, G., *et al.* CASL fMRI of subcortico-cortical perfusion changes during memory-guided finger sequences. *Neuroimage*, v.25, n.1, Mar, p.122-32. 2005.
- GOLAY, X., *et al.* Pulsed star labeling of arterial regions (PULSAR): a robust regional perfusion technique for high field imaging. *Magn. Reson. Med.*, v.53, n.1, Jan, p.15-21. 2005.
- GUNTHER, M. Efficient visualization of vascular territories in the human brain by cycled arterial spin labeling MRI. *Magn. Reson. Med.*, v.56, n.3, Sep, p.671-5. 2006.
- GUR, D., *et al.* In vivo mapping of local cerebral blood flow by xenon-enhanced computed tomography. *Science*, v.215, n.4537, Mar 5, p.1267-8. 1982.
- HANSEN, T. D., *et al.* Distribution of cerebral blood flow during halothane versus isoflurane anesthesia in rats. *Anesthesiology*, v.69, n.3, Sep, p.332-7. 1988.
- HEISTAD, D. D., *et al.* Impaired dilatation of cerebral arterioles in chronic hypertension. *Blood Vessels*, v.27, n.2-5, p.258-62. 1990.
- HENDRIKSE, J., *et al.* Flow territory mapping of the cerebral arteries with regional perfusion MRI. *Stroke*, v.35, n.4, Apr, p.882-7. 2004.
- HENDRIKSE, J., *et al.* Altered flow territories after extracranial-intracranial bypass surgery. *Neurosurgery*, v.57, n.3, Sep, p.486-94;. 2005.
- HENDRIKSE, J., *et al.* Distribution of cerebral blood flow in the circle of Willis. *Radiology*, v.235, n.1, Apr, p.184-9. 2005.
- HERSCOVITCH, P.; RAICHLE, M. E. What is the correct value for the brain--blood partition coefficient for water? *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, v.5, n.1, Mar, p.65-9. 1985.
- HOEFFNER, E. G. Cerebral perfusion imaging. *J. Neuroophthalmol.*, v.25, n.4, p.313-20. 2005.
- HOFFMAN, J. M.; COLEMAN, R. E. Perfusion quantitation using positron emission tomography. *Invest. Radiol.*, v.27 Suppl 2, Dec, p.S22-6. 1992.
- HOOD, J. H. *Cerebral blood flow: Physiologic and clinical aspects*. New York: McGraw-Hill. 1987

ITO, T., *et al.* Protection against ischemia and improvement of cerebral blood flow in genetically hypertensive rats by chronic pretreatment with an angiotensin II AT1 antagonist. *Stroke*, v.33, n.9, Sep, p.2297-303. 2002.

JAGER, H. R. Diagnosis of stroke with advanced CT and MR imaging. *Br. Med. Bull.*, v.56, n.2, p.318-33. 2000.

JONES, C. E., *et al.* Structural MRI of carotid artery atherosclerotic lesion burden and characterization of hemispheric cerebral blood flow before and after carotid endarterectomy. *NMR Biomed.*, v.19, n.2, Apr, p.198-208. 2006.

KALENDER, W. A., *et al.* Brain perfusion studies by xenon-enhanced CT using washin/washout study protocols. *J. Comput. Assist. Tomogr.*, v.15, n.5, Sep-Oct, p.816-22. 1991.

KANNEL, W. B., *et al.* Epidemiologic assessment of the role of blood pressure in stroke. The Framingham study. *Jama*, v.214, n.2, Oct 12, p.301-10. 1970.

KETY, S. S.; SCHMIDT, C. F. The Nitrous Oxide Method for the Quantitative Determination of Cerebral Blood Flow in Man: Theory, Procedure and Normal Values. *J. Clin. Invest.*, v.27, n.4, Jul, p.476-83. 1948.

KIM, S. G. Quantification of relative cerebral blood flow change by flow-sensitive alternating inversion recovery (FAIR) technique: application to functional mapping. *Magn. Reson. Med.*, v.34, n.3, Sep, p.293-301. 1995.

KIM, S. G., *et al.* Multi-slice perfusion-based functional MRI using the FAIR technique: comparison of CBF and BOLD effects. *NMR Biomed.*, v.10, n.4-5, Jun-Aug, p.191-6. 1997.

KITA, H., *et al.* Cerebral blood flow and glucose metabolism of the ischemic rim in spontaneously hypertensive stroke-prone rats with occlusion of the middle cerebral artery. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, v.15, n.2, Mar, p.235-41. 1995.

KRUCKER, T., *et al.* Magnetic resonance angiography and vascular corrosion casting as tools in biomedical research: application to transgenic mice modeling Alzheimer's disease. *Neurol. Res.*, v.26, n.5, Jul, p.507-16. 2004.

KWONG, K. K., *et al.* Dynamic magnetic resonance imaging of human brain activity during primary sensory stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v.89, n.12, Jun 15, p.5675-9. 1992.

KWONG, K. K., *et al.* MR perfusion studies with T1-weighted echo planar imaging. *Magn. Reson. Med.*, v.34, n.6, Dec, p.878-87. 1995.

LAD, S. P., *et al.* Cerebral perfusion imaging in vasospasm. *Neurosurg. Focus*, v.21, n.3, p.E7. 2006.

LATCHAW, R. E. Cerebral perfusion imaging in acute stroke. *J. Vasc. Interv. Radiol.*, v.15, n.1 Pt 2, Jan, p.S29-46. 2004.

- LE BIHAN, D. Theoretical principles of perfusion imaging. Application to magnetic resonance imaging. *Invest. Radiol.*, v.27 Suppl 2, Dec, p.S6-11. 1992.
- LIEBESKIND, D. S. Collateral circulation. *Stroke*, v.34, n.9, Sep, p.2279-84. 2003.
- LIEKE, E. E., *et al.* Optical imaging of cortical activity: real-time imaging using extrinsic dye-signals and high resolution imaging based on slow intrinsic-signals. *Annu. Rev. Physiol.*, v.51, p.543-59. 1989.
- LIU, T. T.; BROWN, G. G. Measurement of cerebral perfusion with arterial spin labeling: Part 1. Methods. *J. Int. Neuropsychol. Soc.*, v.13, n.3, May, p.517-25. 2007.
- MACCOTTA, L., *et al.* The efficiency of adiabatic inversion for perfusion imaging by arterial spin labeling. *NMR Biomed.*, v.10, n.4-5, Jun-Aug, p.216-21. 1997.
- MCLAUGHLIN, A. C., *et al.* Effect of magnetization transfer on the measurement of cerebral blood flow using steady-state arterial spin tagging approaches: a theoretical investigation. *Magn. Reson. Med.*, v.37, n.4, Apr, p.501-10. 1997.
- MEIER, P.; ZIERLER, K. L. On the theory of the indicator-dilution method for measurement of blood flow and volume. *J. Appl. Physiol.*, v.6, n.12, Jun, p.731-44. 1954.
- MILDNER, T., *et al.* Functional perfusion imaging using continuous arterial spin labeling with separate labeling and imaging coils at 3 T. *Magn. Reson. Med.*, v.49, n.5, May, p.791-5. 2003.
- MIN, J. H.; LEE, Y. S. Transcranial Doppler ultrasonographic evaluation of vertebral artery hypoplasia and aplasia. *J. Neurol. Sci.*, v.260, n.1-2, Sep 15, p.183-7. 2007.
- NISHIMURA, D. G., *et al.* MR angiography by selective inversion recovery. *Magn. Reson. Med.*, v.4, n.2, Feb, p.193-202. 1987.
- OGAWA, S., *et al.* Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v.87, n.24, Dec, p.9868-72. 1990.
- OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn. Circ. J.*, v.27, Mar, p.282-93. 1963.
- PAIVA, F. F., *et al.* Measurement of cerebral perfusion territories using arterial spin labelling. *NMR Biomed.*, v.20, n.7, Nov, p.633-42. 2007.
- PARK, J. H., *et al.* Hypoplastic vertebral artery; Frequency and associations with ischemic Stroke territory. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, Nov 10. 2006.
- PELL, G. S., *et al.* Implementation of quantitative FAIR perfusion imaging with a short repetition time in time-course studies. *Magn. Reson. Med.*, v.41, n.4, Apr, p.829-40. 1999.
- PERTHEN, J. E., *et al.* Is quantification of bolus tracking MRI reliable without deconvolution? *Magn. Reson. Med.*, v.47, n.1, Jan, p.61-7. 2002.

- PHELPS, M. E., *et al.* Study of cerebral function with positron computed tomography. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, v.2, n.2, p.113-62. 1982.
- 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.
- PURCELL, E. M., *et al.* Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. *Physical Review*, v.69, n.1-2, p.37-38. 1946.
- RAICHLE, M. E., *et al.* Brain blood flow measured with intravenous H₂(15)O. II. Implementation and validation. *J. Nucl. Med.*, v.24, n.9, Sep, p.790-8. 1983.
- RAKIC, P. Evolving concepts of cortical radial and areal specification. *Prog. Brain Res.*, v.136, p.265-80. 2002.
- REESE, T., *et al.* Magnetic resonance angiography of the rat cerebrovascular system without the use of contrast agents. *NMR Biomed.*, v.12, n.4, Jun, p.189-96. 1999.
- RIESEBERG, S., *et al.* Two-dimensional spatially-selective RF excitation pulses in echo-planar imaging. *Magn. Reson. Med.*, v.47, n.6, Jun, p.1186-93. 2002.
- ROSEN, B. R., *et al.* Perfusion imaging by nuclear magnetic resonance. *Magn. Reson. Q.*, v.5, n.4, Oct, p.263-81. 1989.
- ROSEN, B. R., *et al.* Perfusion imaging with NMR contrast agents. *Magn. Reson. Med.*, v.14, n.2, May, p.249-65. 1990.
- ROWLEY, H. A.; ROBERTS, T. P. Clinical perspectives in perfusion: neuroradiologic applications. *Top. Magn. Reson. Imaging*, v.15, n.1, Feb, p.28-40. 2004.
- RYDBERG, J., *et al.* Multisection CT: scanning techniques and clinical applications. *Radiographics*, v.20, n.6, Nov-Dec, p.1787-806. 2000.
- SARDASHTI, M., *et al.* Spin-labeling angiography of the carotids by presaturation and simplified adiabatic inversion. *Magn. Reson. Med.*, v.15, n.2, Aug, p.192-200. 1990.
- SCHWARZBAUER, C., *et al.* Quantitative magnetic resonance imaging of perfusion using magnetic labeling of water proton spins within the detection slice. *Magn. Reson. Med.*, v.35, n.4, Apr, p.540-6. 1996.
- SICARD, K., *et al.* Regional cerebral blood flow and BOLD responses in conscious and anesthetized rats under basal and hypercapnic conditions: implications for functional MRI studies. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, v.23, n.4, Apr, p.472-81. 2003.
- SILVA, A. C., *et al.* Multi-slice MRI of rat brain perfusion during amphetamine stimulation using arterial spin labeling. *Magn. Reson. Med.*, v.33, n.2, Feb, p.209-14. 1995.
- SOKOLOFF, L., *et al.* The [14C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J. Neurochem.*, v.28, n.5, May, p.897-916. 1977.

SORENSEN, A. G., *et al.* Hyperacute stroke: evaluation with combined multisection diffusion-weighted and hemodynamically weighted echo-planar MR imaging. *Radiology*, v.199, n.2, May, p.391-401. 1996.

STAIR. Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke*, v.30, n.12, p.2752-8. 1999.

STAROSELSKAYA, I. A., *et al.* Relationship between magnetic resonance arterial patency and perfusion-diffusion mismatch in acute ischemic stroke and its potential clinical use. *Arch. Neurol.*, v.58, n.7, July 1, 2001, p.1069-1074. 2001.

STRANDGAARD, S.; PAULSON, O. B. Cerebral autoregulation. *Stroke*, v.15, n.3, May-Jun, p.413-6. 1984.

TALAGALA, S. L., *et al.* Whole-brain 3D perfusion MRI at 3.0 T using CASL with a separate labeling coil. *Magn. Reson. Med.*, v.52, n.1, Jul, p.131-40. 2004.

TAOKA, T., *et al.* Distinguishing between anterior cerebral artery and middle cerebral artery perfusion by color-coded perfusion direction mapping with arterial spin labeling. *Am. J. Neuroradiol.*, v.25, n.2, Feb, p.248-51. 2004.

THOMAS, D. L., *et al.* Regional variation of cerebral blood flow and arterial transit time in the normal and hypoperfused rat brain measured using continuous arterial spin labeling MRI. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, v.26, n.2, Feb, p.274-82. 2006.

THOMPSON, H. K., JR., *et al.* Indicator transit time considered as a gamma variate. *Circ. Res.*, v.14, Jun, p.502-15. 1964.

TOFTS, P. S.; KERMODE, A. G. Measurement of the blood-brain barrier permeability and leakage space using dynamic MR imaging. 1. Fundamental concepts. *Magn. Reson. Med.*, v.17, n.2, Feb, p.357-67. 1991.

TRAMPEL, R., *et al.* Continuous arterial spin labeling using a local magnetic field gradient coil. *Magn. Reson. Med.*, v.48, n.3, Sep, p.543-6. 2002.

TSEKOS, N. V., *et al.* Quantitative measurements of cerebral blood flow in rats using the FAIR technique: correlation with previous iodoantipyrine autoradiographic studies. *Magn. Reson. Med.*, v.39, n.4, Apr, p.564-73. 1998.

TUTTLE, J. L., *et al.* Impaired collateral artery development in spontaneously hypertensive rats. *Microcirculation*, v.9, n.5, Oct, p.343-51. 2002.

VAN LAAR, P. J., *et al.* In vivo flow territory mapping of major brain feeding arteries. *Neuroimage*, v.29, n.1, Jan 1, p.136-44. 2006.

VAN LAAR, P. J., *et al.* Symptomatic carotid artery occlusion: flow territories of major brain-feeding arteries. *Radiology*, v.242, n.2, Feb, p.526-34. 2007.

VAN LAAR, P. J., *et al.* Effect of cerebrovascular risk factors on regional cerebral blood flow. *Radiology*, v.246, n.1, Jan, p.198-204. 2008.

- VAN LAAR, P. J., *et al.* Brain perfusion territory imaging: methods and clinical applications of selective arterial spin-labeling MR imaging. *Radiology*, v.246, n.2, Feb, p.354-64. 2008.
- VAN LAAR, P. J., *et al.* Magnetic resonance evaluation of the cerebral circulation in obstructive arterial disease. *Cerebrovasc. Dis.*, v.21, n.5-6, p.297-306. 2006.
- VAN OSCH, M. J., *et al.* Non-invasive visualization of collateral blood flow patterns of the circle of Willis by dynamic MR angiography. *Med. Image Anal.*, v.10, n.1, Feb, p.59-70. 2006.
- VAN ZIJL, P. C., *et al.* Quantitative assessment of blood flow, blood volume and blood oxygenation effects in functional magnetic resonance imaging. *Nat. Med.*, v.4, n.2, Feb, p.159-67. 1998.
- VILLRINGER, A.; DIRNAGL, U. Coupling of brain activity and cerebral blood flow: basis of functional neuroimaging. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.*, v.7, n.3, Fall, p.240-76. 1995.
- VILLRINGER, A., *et al.* Dynamic imaging with lanthanide chelates in normal brain: contrast due to magnetic susceptibility effects. *Magn. Reson. Med.*, v.6, n.2, Feb, p.164-74. 1988.
- WANG, J., *et al.* Amplitude-modulated continuous arterial spin-labeling 3.0-T perfusion MR imaging with a single coil: feasibility study. *Radiology*, v.235, n.1, Apr, p.218-28. 2005.
- WARACH, S. Measurement of the ischemic penumbra with MRI: it's about time. *Stroke*, v.34, n.10, Oct, p.2533-4. 2003.
- WEGENER, S., *et al.* Quantification of rodent cerebral blood flow (CBF) in normal and high flow states using pulsed arterial spin labeling magnetic resonance imaging. *J. Magn. Reson. Imaging*, v.26, n.4, Oct, p.855-62. 2007.
- WEISSKOFF, R. M., *et al.* Pitfalls in MR measurement of tissue blood flow with intravascular tracers: which mean transit time? *Magn. Reson. Med.*, v.29, n.4, Apr, p.553-8. 1993.
- WERNER, R., *et al.* Brain perfusion territory imaging applying oblique-plane arterial spin labeling with a standard send/receive head coil. *Magn. Reson. Med.*, v.52, n.6, Dec, p.1443-7. 2004.
- WERNER, R., *et al.* Continuous artery-selective spin labeling (CASSL). *Magn. Reson. Med.*, v.53, n.5, May, p.1006-12. 2005.
- WILLIAMS, D. S., *et al.* Magnetic resonance imaging of perfusion using spin inversion of arterial water. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v.89, n.1, Jan 1, p.212-6. 1992.
- WINKLER, S. S., *et al.* Xenon inhalation as an adjunct to computerized tomography of the brain: preliminary study. *Invest. Radiol.*, v.12, n.1, Jan-Feb, p.15-8. 1977.

- WINTERMARK, M., *et al.* Quantitative assessment of regional cerebral blood flows by perfusion CT studies at low injection rates: a critical review of the underlying theoretical models. *Eur. Radiol.*, v.11, n.7, p.1220-30. 2001.
- WINTERMARK, M., *et al.* Comparative overview of brain perfusion imaging techniques. *Stroke*, v.36, n.9, Sep, p.e83-99. 2005.
- WOLFF, S. D.; BALABAN, R. S. Magnetization transfer contrast (MTC) and tissue water proton relaxation in vivo. *Magn. Reson. Med.*, v.10, n.1, Apr, p.135-44. 1989.
- WONG, E. C. Vessel-encoded arterial spin-labeling using pseudocontinuous tagging. *Magn Reson Med*, v.58, n.6, Dec, p.1086-91. 2007.
- YAMAKAWA, H., *et al.* Normalization of endothelial and inducible nitric oxide synthase expression in brain microvessels of spontaneously hypertensive rats by angiotensin II AT1 receptor inhibition. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, v.23, n.3, Mar, p.371-80. 2003.
- YAMORI, Y., *et al.* Symptomatological classification in the development of stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Jpn. Circ. J.*, v.46, n.3, Mar, p.274-83. 1982.
- YE, F. Q., *et al.* H(2)(15)O PET validation of steady-state arterial spin tagging cerebral blood flow measurements in humans. *Magn. Reson. Med.*, v.44, n.3, Sep, p.450-6. 2000.
- ZAHARCHUK, G., *et al.* Multislice perfusion and perfusion territory imaging in humans with separate label and image coils. *Magn. Reson. Med.*, v.41, n.6, Jun, p.1093-8. 1999.
- ZHANG, W., *et al.* NMR measurement of perfusion using arterial spin labeling without saturation of macromolecular spins. *Magn. Reson. Med.*, v.33, n.3, Mar, p.370-6. 1995.
- ZHANG, W., *et al.* Measurement of brain perfusion by volume-localized NMR spectroscopy using inversion of arterial water spins: accounting for transit time and cross-relaxation. *Magn. Reson. Med.*, v.25, n.2, Jun, p.362-71. 1992.
- ZIMINE, I., *et al.* Dual vessel arterial spin labeling scheme for regional perfusion imaging. *Magn. Reson. Med.*, v.56, n.5, Nov, p.1140-4. 2006.
- ZIMINE, I., *et al.* Automatic planning for regional perfusion imaging. In: ISMRM 14th SCIENTIFIC MEETING & EXHIBITION, 14, 2006. Seattle. Proceedings... Seattle: 2006. p. 3426