

Quantificação da Atividade Inflamatória em Lesões na Esclerose Múltipla usando Imagens PET Cerebrais com [¹¹C]-(R)-PK11195

Lesions Inflammatory Activity Quantification in Multiple Sclerosis using [¹¹C]-(R)-PK11195 PET Brain Images

Phelipi N. Schuck, Lucas D. L. Narciso, Caroline M. Dartora, Ana M. Marques da Silva

Núcleo de Pesquisa em Imagens Médicas, PUCRS, Porto Alegre, Brasil

Resumo

Os critérios do diagnóstico da esclerose múltipla (EM) incluem a presença de lesões em regiões cerebrais, chamadas buracos negros (BNs), caracterizadas por baixo sinal em imagens de ressonância magnética ponderadas em T1. Estudos sugerem que as lesões na EM, caso haja um processo inflamatório, podem ser detectadas em imagens de PET com [¹¹C]-(R)-PK11195. O objetivo desse trabalho é investigar a captação de [¹¹C]-(R)-PK11195 nos BNs em imagens PET, buscando identificar atividade inflamatória nas lesões e em suas vizinhanças. Métodos semiquantitativos de SUV e de normalização da captação foram aplicados a imagens PET dinâmicas, em diferentes intervalos temporais, adquiridas de 8 pacientes com EM e 5 indivíduos saudáveis. Foi identificada maior captação nos BN e suas bordas nas imagens, em comparação com a substância branca do grupo controle, quando o método SUV é aplicado ($p < 0,01$, 40 a 60 min). Quando o método da normalização da captação é aplicado, é observada menor captação nos BNs e em suas bordas, quando comparada com substância branca aparentemente saudável ($p < 0,01$, 0 a 60 min).

Palavras-chave: [¹¹C]-(R)-PK11195; PET; esclerose múltipla; semiquantificação; SUV.

Abstract

The criteria for multiple sclerosis (MS) diagnosis include the presence of lesions in brain regions called black holes (BH), characterized by low signal on magnetic resonance imaging T1-weighted. Studies suggest that lesions in MS, if there is an inflammatory process, can be detected in PET imaging with [¹¹C]-(R)-PK11195. The aim of this study is to investigate the uptake of [¹¹C]-(R)-PK11195 in BH in PET images, searching for inflammation activity in lesions and neighborhoods. Semiquantitative methods of SUV and uptake normalization were applied to PET images, in different time intervals, acquired from 8 MS patients and 5 healthy controls. Higher uptake was identified in BH and its edges, when compared with health controls white matter, when the SUV method is applied ($p < 0,01$, 40 to 60 min). When uptake normalization method is applied, smaller uptake in black holes and its your edges is observed, when compared with white matter apparently healthy ($p < 0,01$, 0 to 60 min).

Keywords: [¹¹C]-(R)-PK11195; PET; multiple sclerosis; semiquantification; SUV.

1. Introdução

A tomografia por emissão de pósitrons ou PET (do inglês, *Positron Emission Tomography*) utiliza radiotraçadores *in vivo* para aquisição de imagens e, juntamente de imagens de ressonância magnética ou MRI (do inglês, *Magnetic Resonance Imaging*), tem sido amplamente utilizada em estudos de doenças neurodegenerativas^{1,2}.

Dentre as doenças neurodegenerativas, a esclerose múltipla ou MS (do inglês, *Multiple Sclerosis*) possui grande impacto social por afetar adultos jovens, embora seja de baixa prevalência. Os critérios do diagnóstico da MS incluem a presença de uma ou mais lesões em duas das quatro regiões consideradas características da doença: justacortical, periventricular, infratentorial e medula espinhal³.

Lesões de MS denominadas buracos negros (BNs) são caracterizadas por hipossinal em MRI ponderada em T1 (correspondendo a hipersinal em

T2), representando a perda axonal⁴. Essas lesões, em imagens PET, usualmente aparecem hipocaptantes quando não ativas e hipercaptantes caso ainda ativa⁴.

Estudos indicam que a ativação microglial está presente em mais de 75% dos BNs identificados em MRI ponderada em T1, sugerindo a presença de atividade inflamatória nas lesões de MS⁴. Ativação microglial pode ser identificada através de um traçador denominado PK11195⁵.

Quando ligado ao radioisótopo ¹¹C, o radiotraçador [¹¹C]-(R)-PK11195 apresenta grande afinidade com a micróglia⁵. Estudos de quantificação das imagens PET adquiridas com [¹¹C]-(R)-PK11195 utilizam, em sua maioria, a captação relativa a uma região de referência ou aplicam o modelo simplificado de tecido de referência⁶, na ausência de amostragem de sangue arterial⁷⁻¹⁰.

Análises simplificadas vem sendo propostas com métodos de semiquantificação, baseados na

normalização da concentração de atividade em uma região de interesse ou ROI (do inglês, *region of interest*), para uma região de referência ou, no caso do SUV (do inglês *Standard Uptake Value*), para a razão da atividade injetada por massa do paciente. O método proposto por Hammoud e colaboradores (2005) considera como referência a média da concentração de atividade na matéria branca¹¹, resultando em aumento de ligação específica de [¹¹C]-(R)-PK11195 em imagens de pacientes portadores do vírus HIV¹¹.

O objetivo deste trabalho é investigar a captação de [¹¹C]-(R)-PK11195 nos BNs em imagens PET, buscando identificar atividade inflamatória nos BNs ou em suas vizinhanças.

2. Materiais e Métodos

Foram adquiridas imagens de PET utilizando [¹¹C]-(R)-PK11195 e de MR de indivíduos voluntários do projeto "Avaliação da ativação microglial pelo PET/CT e associação com o aparecimento de lesões na Ressonância Magnética em pacientes com Esclerose Múltipla remitente-recorrente submetidos a tratamento com fingolimode" (CAAE 23949813.7.0000.5336, parecer 1.094.228). Os voluntários foram divididos em dois grupos: cinco indivíduos saudáveis, do grupo controle [(24 ± 2) anos, mínimo 20 anos e máximo 28 anos, e (74 ± 10) kg], e oito diagnosticados com MS do tipo remitente-recorrente [(26 ± 6) anos, mínimo 18 anos e máximo 35 anos, e (67 ± 16) kg].

Ambas as aquisições (PET e MRI) aconteceram no mesmo dia, sendo a atividade administrada aos pacientes de (540 ± 100) MBq de [¹¹C]-(R)-PK11195 [(15 ± 3) mCi, 390 MBq a 740 MBq] para aquisição das imagens PET. O radiotraçador foi produzido pelo laboratório do Centro de Produção de Radiofármacos do Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul da PUCRS.

As aquisições foram realizadas em modo lista em um equipamento de PET/CT da marca GE Healthcare, modelo *Discovery 600*, com cristais detectores tipo óxido de germânio bismuto (BGO). As imagens PET foram reconstruídas com 300 mm de campo de visão, utilizando o algoritmo iterativo *VUE Point HD*, frequência de corte do filtro de suavização de 4,0 mm, 32 subconjuntos e duas iterações. A matriz da imagem possui 192x192 pixels, 16-bits por pixel (resolução de 0,640 pixels/mm), tamanho de pixel de 1,56mmx1,56 mm e 47 cortes axiais de 3,27 mm de espessura cada. A atenuação foi corrigida utilizando a imagem de tomografia computadorizada adquirida anteriormente ao início da aquisição da imagem PET. As demais correções para quantificação (normalização, decaimento, espalhamento e detecções aleatórias) também foram aplicadas.

As imagens de MR foram adquiridas em um equipamento de ressonância magnética *GE Healthcare Signa HDxt* de 3,0 T. Foram adquiridas

imagens de MR estruturais de alta resolução ponderadas em T1 utilizando sequência BRAVO™ (volume do cérebro, do inglês, *brain volume*), da *GE Healthcare*, com tempo de repetição de 2400 ms; tempo de eco de 16 ms; campo de visão de 220 mm; com *voxels* isotrópicos de 1 mm. As imagens ponderadas em T1 apresentam matriz de 512x512x196 pixels (240,03x240,03x196,00 mm³), 16-bits por pixel, resolução de 2,133 pixels/mm, tamanho de voxel de 0,47x0,47x1,00 mm³, e intervalo de quadros de 6,12 ms.

2.1. Pré-processamento

Nas etapas de pré-processamento de corregragem entre as imagens PET e MR e na segmentação da MRI em substância cinzenta ou GM (do inglês, *gray matter*), substância branca ou WM (do inglês, *WM*) e fluido cefalorraquidiano, foi utilizado o programa SPM8 (<http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/>). MRI foram corrigidas para não homogeneidade do campo magnético do equipamento¹² utilizando FSL¹³.

Os BNs foram segmentados a partir das imagens por MR ponderadas em sequência FLAIR isotrópico utilizando a ferramenta LST (<http://www.applied-statistics.de/lst.html>) do SPM8, sendo a segmentação feita pelo algoritmo de crescimento de lesão ou LGA (do inglês, *Lesion Growth Algorithm*)¹⁴. Para incluir a vizinhança das lesões, foi realizada uma operação de abertura morfológica. As máscaras dos BNs foram colocadas no mesmo espaço das imagens por MR ponderadas em T1, previamente corregradas com as imagens PET.

2.2. Análises semiquantitativas

A extração dos valores de concentração de atividade nos BNs e suas bordas foi realizada utilizando as máscaras segmentadas como descrito anteriormente. Os dados foram extraídos utilizando o programa *ImageJ* (<https://imagej.nih.gov/ij/>). A Figura 1 mostra um exemplo de máscara de BNs sobreposta à imagem por MR ponderada em T1, onde a região branca representa os BNs.

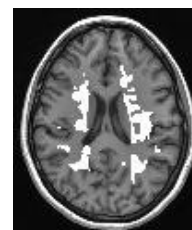


Figura 1. Exemplo de máscara de BNs sobreposta à MRI ponderada em T1, onde a região em branco representa os BNs.

Na análise da concentração de atividade de [¹¹C]-(R)-PK11195 nos BNs e suas vizinhanças das imagens PET cerebrais, foram aplicados métodos semiquantitativos em duas imagens: Imagem A - obtida a partir da média do intervalo temporal de 40 a 60 min^{11,15-18}; Imagem B - obtida

a partir da média do intervalo temporal de 0 a 60 min⁴.

O método de SUV foi aplicado na imagem A, enquanto o método de normalização para concentração de atividade média na WM¹¹, aqui denominada Hammoud et al. (2005), aplicado na imagem B. Os valores de concentração de atividade da WM utilizados para normalização foram obtidos utilizando a máscara da região de WM segmentada anteriormente.

Valores de SUV foram adquiridos da WM aparentemente saudável da imagem A para comparação com a WM saudável dos indivíduos do grupo controle.

2.3. Análises Estatísticas

Diferenças entre os grupos (pacientes com MS e controles) foram avaliadas com a aplicação de teste *t* de Student. A normalidade dos dados foi testada com o teste Shapiro-Wilk utilizando o programa SPSS versão 17.0.0 (SPSS, Heverlee, Bélgica). Valores estão expressos em termos de média ± um desvio padrão.

O coeficiente de correlação de postos de Spearman foi utilizado na verificação de correlação de EDSS (Escala Expandida do Estado de Incapacidade de Kurtzke), tempo de doença, número de surtos e idade com os valores resultantes da aplicação dos métodos descritos nesse estudo.

Após análises estatísticas, verificou-se a possível existência de valores atípicos (*outliers*) utilizando diagramas de blocos.

3. Resultados

As tabelas a seguir apresentam os resultados obtidos a partir da aplicação dos métodos semiquantitativos utilizados nesse estudo. A Tabela 1 apresenta os valores de SUV nos BNs e suas vizinhanças obtidos a partir das imagens (A), para os pacientes com MS e grupo controle. A tabela seguinte (Tabela 2) mostra os valores de concentração de atividade normalizada pelo método Hammoud et al. (2005) nos BNs e suas vizinhanças obtidos a partir das imagens (B), para os pacientes com MS e grupo controle.

Tabela 1. Valores de SUV nas lesões (BNs) e suas vizinhanças obtidos a partir da imagem média (40 a 60 min), para os pacientes com MS e grupo controle.

SUV (g/mL)	
Lesões (BNs)	
Média Pacientes	0,39 ± 0,11
Média Controles (WM saudável)	0,28 ± 0,07
Valor p	0,05
Bordas das Lesões (BNs)	
Média Pacientes	0,39 ± 0,11
	0,28 ± 0,07
Valor p	0,05

Tabela 2. Valores de concentração de atividade normalizada pelo método Hammoud et al. (2005) nas lesões (BNs) e suas vizinhanças obtidos a partir da imagem média (0 a 60 min), para os pacientes com MS e grupo controle.

Hammoud et al. (2005)	
Lesões (BNs)	
Média Pacientes	0,83 ± 0,08
Média Controles (WM saudável)	1,00
Valor p	< 0,01
Bordas das Lesões (BNs)	
Média Pacientes	0,88 ± 0,08
Média Controles (WM saudável)	1,00
Valor p	< 0,01

Os valores de SUV nos BNs dos pacientes com MS [média (0,39 ± 0,11) g/mL] diferem de forma estatisticamente significativa dos valores de SUV na WM saudável dos indivíduos saudáveis [média (0,28 ± 0,07) g/mL] ($p = 0,04$). Entretanto, não existe diferença significativa entre os valores de SUV nos BNs e nas bordas ($p > 0,20$), com médias iguais de (0,39 ± 0,11) g/mL.

O método de normalização de Hammoud et al. (2005) resulta em diferença estatisticamente significativa quando comparado à concentração de atividade normalizada nos BNs [média (0,83 ± 0,08)] e suas bordas [média (0,88 ± 0,08)] dos pacientes com MS com a concentração de atividade normalizada na WM do grupo controle ($p < 0,01$).

Após a retirada dos valores atípicos, os valores médios de SUV foram alterados, conforme mostra a Tabela 3. Os valores médios de SUV nos BNs dos pacientes com MS e na WM saudável dos indivíduos saudáveis passaram a ser, respectivamente, (0,43 ± 0,06) g/mL e (0,25 ± 0,02) g/mL ($p < 0,01$).

Tabela 3. Valores de SUV nas lesões (BNs) e suas bordas obtidos a partir da imagem média (40 a 60 min), para os pacientes com MS e grupo controle após a retirada dos valores atípicos (*outliers*).

SUV (g/mL)	
Lesões (BNs)	
Média Pacientes	0,43 ± 0,06
Média Controles (WM saudável)	0,25 ± 0,02
Valor p	< 0,01
Bordas das Lesões (BNs)	
Média Pacientes	0,43 ± 0,06
Média Controles (WM saudável)	0,25 ± 0,02
Valor p	< 0,01

Os SUVs nos BNs dos pacientes com MS [média (0,39 ± 0,11) g/mL] não diferem de forma estatisticamente significativa ($p > 0,20$) dos SUVs na WM aparentemente saudável obtidos a partir das imagens (A) [média (0,39 ± 0,12) g/mL].

Uma correlação estatisticamente significativa foi encontrada entre EDSS e os valores de concentração de atividade normalizada pelo método Hammoud et al. (2005) das imagens (B) ($p < 0,01$). Não foi encontrada nenhuma outra correlação estatisticamente significativa.

4. Discussão

Os resultados das análises dos valores de SUV indicam que a captação nos pacientes é maior nos BNs e em suas vizinhanças quando comparada com a WM saudável dos indivíduos pertencentes ao grupo controle ($p < 0,01$).

Contudo, os valores de SUV nos BNs não apresentam diferença significativa dos valores de SUV na WM aparentemente saudável em pacientes com MS ($p > 0,20$).

Os resultados da aplicação do método Hammoud *et al.* (2005) indicam que existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos para os valores de concentração normalizada nos BNs e suas bordas. Como este método normaliza a captação para a concentração de atividade na WM aparentemente saudável do próprio indivíduo, os valores obtidos de ($0,83 \pm 0,08$) indicam que a captação nas lesões é menor que a captação na WM aparentemente saudável ($p < 0,01$).

Os resultados desse estudo estão de acordo com estudo anterior de Giannetti e colaboradores⁴, no qual a captação de [¹¹C]-(*R*)-PK11195 é maior nos BNs.

5. Conclusões

Conclui-se que a captação de [¹¹C]-(*R*)-PK11195 nos buracos negros e suas vizinhanças em imagens cerebrais de PET é maior quando o método semiquantitativo SUV é aplicado, embora não tenha sido observada diferença significativa nos buracos negros quando comparados com a substância branca aparentemente saudável.

Quando o método semiquantitativo proposto por Hammoud e colaboradores (2005) é aplicado, uma captação menor é observada nos buracos negros e em suas vizinhanças quando comparada com substância branca aparentemente saudável. Esse resultado parece indicar que pode ser possível diferenciar buracos negros com processo inflamatório em imagens PET adquiridas com [¹¹C]-(*R*)-PK11195, embora o método padrão ainda seja o imageamento por MR.

A correlação entre EDSS e os valores de concentração de atividade normalizada pelo método Hammoud *et al.* (2005) indica que pode existir um limiar de concentração de atividade normalizada que indique evolução inflamatória da doença.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro. Este estudo foi apoiado financeiramente pela Novartis. Os autores não recebem qualquer reembolso ou benefícios financeiros e declaram que não têm interesses conflitantes. Novartis não desempenhou qualquer papel na concepção, métodos, gestão de dados ou análise ou na decisão de publicar.

Referências

1. Banati, R. B. *et al.* The peripheral benzodiazepine binding site in the brain in multiple sclerosis: quantitative in vivo imaging of microglia as a measure of disease activity. *Brain* *J. Neurol.* 123, 2321–37 (2000).
2. Chauveau, F., Boutin, H., Van Camp, N., Dolle, F. & Tavitian, B. Nuclear imaging of neuroinflammation: a comprehensive review of [¹¹C]PK11195 challengers. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35, 2304–2319 (2008).
3. Polman, C. H. *et al.* Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann. Neurol.* 69, 292–302 (2011).
4. Giannetti, P. *et al.* Microglia activation in multiple sclerosis black holes predicts outcome in progressive patients: an in vivo [(11)C](R)-PK11195-PET pilot study. *Neurobiol. Dis.* 65, 203–10 (2014).
5. Banati, R. B. Visualising microglial activation in vivo. *Glia* 40, 206–17 (2002).
6. Lammertsma, A. A. & Hume, S. P. Simplified reference tissue model for PET receptor studies. *Neuroimage* 4, 153–8 (1996).
7. Kropholler, M. A. *et al.* Evaluation of reference tissue models for the analysis of [(11)C](R)-PK11195 studies. *J. Cereb. blood flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 26, 1431–1441 (2006).
8. Kropholler, M. a *et al.* Development of a tracer kinetic plasma input model for (R)-[(11)C]PK11195 brain studies. *J. Cereb. blood flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 25, 842–51 (2005).
9. Schuitmaker, A. *et al.* SPM analysis of parametric (R)-[(11)C]PK11195 binding images: Plasma input versus reference tissue parametric methods. *Neuroimage* 35, 1473–1479 (2007).
10. Schuitmaker, A. *et al.* Evaluation of methods for generating parametric (R)-[(11)C]PK11195 binding images. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 1603–1615 (2007).
11. Hammoud, D. a *et al.* Imaging glial cell activation with [(11)C]-R-PK11195 in patients with AIDS. *J. Neurovirol.* 11, 346–355 (2005).
12. Juntu, J., Sijbers, J., Dyck, D. Van & Gielen, J. Bias field correction for mri images. *Comput. Recognit. Syst.* 30, 543–551 (2005).
13. Jenkinson, M., Beckmann, C. F., Behrens, T. E. J., Woolrich, M. W. & Smith, S. M. FSL. *Neuroimage* 62, 782–790 (2012).
14. Schmidt, P. *et al.* An automated tool for detection of FLAIR-hyperintense white-matter lesions in Multiple Sclerosis. *Neuroimage* 59, 3774–83 (2012).
15. Debruyne, J. C. *et al.* PET visualization of microglia in multiple sclerosis patients using [(11)C]PK11195. *Eur. J. Neurol.* 10, 257–264 (2003).
16. Debruyne, J. C. *et al.* Semiquantification of the peripheral-type benzodiazepine ligand [(11)C]PK11195 in normal human brain and application in multiple sclerosis patients. *Acta Neurol. Belg.* 102, 127–35 (2002).
17. Anderson, A. N. *et al.* A systematic comparison of kinetic modelling methods generating parametric maps for [(11)C]-(*R*)-PK11195. *Neuroimage* 36, 28–37 (2007).
18. Kumar, A. *et al.* Evaluation of age-related changes in translocator protein (TSPO) in human brain using [(11)C]-PK11195 PET. *J. Neuroinflammation* 9, 1–10 (2012).

Contato:

Phelipi Nunes Schuck
Av. Ipiranga, 6681, Pr. 96A sala 200, Partenon,
Porto Alegre, RS. CEP 90619-900.
E-mail: phelipi.schuck@acad.pucrs.br