



ESCOLA
SUPERIOR
DE TECNOLOGIA
DA SAÚDE
DE LISBOA



INSTITUTO
POLITÉCNICO
DE LISBOA

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

**AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DA
BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA NUM
MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE
ALZHEIMER – ESTUDOS DE PERFUSÃO
EM RESSONÂNCIA MAGNÉTICA**

MARTA CLÁUDIA FERNANDES BATISTA

ORIENTADOR: DOUTOR JOÃO MIGUEL SEABRA CASTELHANO – ICNAS –
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

CO-ORIENTADOR: DOUTOR LUÍS MANUEL CARVALHO FREIRE – ESCOLA
SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

Mestrado em Radiações Aplicadas Radiações às Tecnologias da Saúde

Ramo: Imagem por Ressonância Magnética

Lisboa, 2018

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

**AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DA
BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA NUM
MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE
ALZHEIMER – ESTUDOS DE PERFUSÃO
EM RESSONÂNCIA MAGNÉTICA**

MARTA CLÁUDIA FERNANDES BATISTA

ORIENTADOR: DOUTOR JOÃO MIGUEL SEABRA CASTELHANO – ICNAS –
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

CO-ORIENTADOR: DOUTOR LUÍS MANUEL CARVALHO FREIRE – ESCOLA
SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

JÚRI:

PRESIDENTE: Doutor Nuno Teixeira – Escola Superior De Tecnologia Da Saúde
De Lisboa

ARGUENTE: Doutora Patrícia Margarida Piedade Figueiredo – Instituto Superior
Técnico– Universidade de Lisboa

ARGUENTE: Doutora Maria Margarida Ribeiro - Escola Superior De Tecnologia Da
Saúde De Lisboa

Mestrado em Radiações Aplicadas Radiações às Tecnologias da Saúde

Ramo: Imagem por Ressonância Magnética

Lisboa, 2018

© Copyright by Marta Cláudia Fernandes Batista, ESTeSL/IPL, IPL

A Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa e o Instituto Politécnico de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho de mestrado através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

A realização e conclusão deste trabalho apenas foi possível graças ao apoio e disponibilidade de tantas pessoas a quem não posso deixar de agradecer.

Antes de mais agradeço ao meu Orientador, Doutor João Castelhana, pela dedicação, disponibilidade, apoio e ajuda nas horas mais difíceis, e ao meu Co-Orientador, Doutor Luís Freire, por me apoiar e guiar ao longo deste trabalho.

Agradeço ainda à direcção do ICNAS, Professor Doutor Miguel Castelo Branco e Doutor Antero Abrunhosa, que me permitiu a realização deste projecto de investigação nessa instituição; e ao Doutor José Sereno que me aceitou e acolheu de braços abertos, a quem agradeço especialmente a preciosa ajuda na compreensão dos conceitos técnicos por trás da aquisição das imagens utilizadas neste estudo.

Finalmente, mas não menos importante, agradeço à minha família por tudo, pelo suporte e motivação que sempre me deram.

O meu obrigada muito especial ao meu marido e companheiro de luta que esteve sempre ao meu lado, me motivou e suportou, principalmente nos momentos mais difíceis, e à minha pequena Alice que me acompanhou, mais do que ninguém, ao longo destes meses de projecto. Vocês fazem com que todos os sacrifícios e dificuldades valham a pena.

Financiamento

Este projecto teve o apoio financeiro da Santa Casa da Misericórdia, através do Prémio Mantero Belard (2015), MB-1049-2015, liderado pelo Doutor Francisco Ambrósio; BIGDATIMAGE (CENTRO-01-0145-FEDER-000016), COMPETE, POCI-01-0145-FEDER-007440, FCT-UID/NEU/04539/2013, UID/NEU/04539/2016, Bial Fellowship Programme Application Numbers 206/ 373/2014. COMPETE FEDER POCI Project 030852.

Resumo

A Barreira Hematoencefálica é uma estrutura cujas funções estão envolvidas na manutenção do normal funcionamento das células neuronais. O interesse na avaliação da sua permeabilidade através de Imagem por Ressonância Magnética (IRM), nomeadamente através de estudos de perfusão, tem vindo a aumentar devido ao facto de permitir identificar *in vivo*, e de forma minimamente invasiva, a existência de lesões que alterem o seu normal funcionamento. Diversas patologias parecem afectar a permeabilidade da Barreira Hematoencefálica, sendo premente identificar e quantificar essa alteração para detecção, diferenciação e estadiamento deste tipo de lesões e desenvolvimento de novas metodologias terapêuticas.

O objectivo deste estudo foi identificar a existência de alterações da permeabilidade da Barreira Hematoencefálica na Doença de Alzheimer e perceber se esse facto é característico de alguma das regiões anatómicas de interesse analisadas (Córtex Visual, Córtex Pré-Frontal, Córtex Estriado e Hipocampo).

Para tal, foram realizados estudos de perfusão em IRM, com recurso à técnica DCE (*Dynamic Contrast Enhancement*), em 8 ratinhos transgénicos, portadores de três mutações genéticas, e em 8 ratinhos saudáveis, aos 4, 8, 12 e 16 meses de idade. Posteriormente, foram calculados os parâmetros de perfusão Área Sob a Curva (*Area Under the Curve* - AUC), Tempo de Pico (*Time to Peak* - TTP), Amplitude do Pico de perfusão (*Peak Amplitude* - Pamp), Índice de Permeabilidade da Barreira Hematoencefálica (*Blood-Brain Barrier Permeability Index* - BBBi) e *Wash-Out* (WO).

Comparando os parâmetros de perfusão entre os dois grupos de ratinhos, não se identificaram diferenças significativas, independentemente do parâmetro DCE considerado, para as regiões anatómicas do Córtex Visual nem para o Córtex Pré-Frontal. No entanto, alguns parâmetros apresentaram diferenças significativas entre os grupos de ratinhos, no Córtex Estriado e no Hipocampo, para os estadios mais avançados da doença (12 e 16 meses).

Concluiu-se que as diferenças encontradas entre os dois grupos podem efectivamente estar relacionadas com alterações neurovasculares associadas à Doença de Alzheimer, no entanto, podem estar apenas relacionadas com o envelhecimento normal dos animais. Por este motivo, propõe-se a realização de estudos complementares a este, que possam permitir um melhor esclarecimento destas situações.

Palavras-Chave: Barreira Hematoencefálica, Doença de Alzheimer, Perfusão em Ressonância Magnética, DCE, Córtex Visual, Córtex Pré-Frontal, Córtex Estriado, Hipocampo, Área Sob a Curva, Tempo de Pico, Amplitude do Pico de Perfusão, Índice de Permeabilidade da Barreira Hematoencefálica, *Wash-Out*.

Abstract

The Blood-Brain Barrier is a structure responsible for maintaining the normal functioning of the neuronal cells. The interest in the evaluation of its permeability through Magnetic Resonance Imaging (MRI), namely through perfusion studies, has been increasing because it allows to identify *in vivo*, and in a less invasive way, the existence of lesions that affect their normal behaviour. Several pathologies seem to affect the integrity of the Blood-Brain Barrier, being of crucial importance to identify and quantify this variation to detect, differentiate and staging this type of lesions and allow the development of new therapeutically approaches.

The aim of this study was to identify disfunctions of the Blood-Brain Barrier in Alzheimer Disease and understand if this variation in her permeability is usual in any of the anatomical regions analysed (Visual Cortex, Prefrontal Cortex, Striatum and Hippocampus).

Therefore, perfusion studies in MRI, using a Dynamic Contrast Enhancement (DCE) technique, were performed in 8 transgenic mice, with 3 genetical mutations, and in 8 healthy mice, at the ages of 4, 8, 12 and 16 months. Afterwards, the perfusion parameters Area Under the Curve (AUC), Time to Peak (TTP), Peak Amplitude (Pamp), Blood-Brain Barrier Permeability Index (BBBi) and Wash-Out (WO) were calculated.

Comparing the perfusion parameters between the study groups, no significant differences were found, regardless of the DCE parameter considered, for the Visual Cortex or Prefrontal Cortex, however, some parameters showed significant differences between the groups in the Striatum and in the Hippocampus, in advanced stages of the disease (12 and 16 months).

It was concluded that the differences detected between the groups may effectively be related with neurovascular changes associated to Alzheimer Disease, however, can be

just related with the normal aging of the animals. For this reason, it is proposed to perform complementary studies to have a better understanding of these situations.

Keywords: Blood-brain Barrier, Alzheimer's Disease, Magnetic Resonance Perfusion, DCE, Visual Cortex, Prefrontal Cortex, Striatum, Hippocampus, Area Under the Curve, Time to Peak, Peak Amplitude, Blood-brain Barrier Permeability Index, Wash-Out.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract.....	v
Índice de Figuras	viii
Índice de Tabelas	ix
Índice de Gráficos	x
Índice de Equações	x
Lista de Abreviaturas	xi
I. Introdução	1
1.1. Barreira Hematoencefálica	3
1.2. Doença de Alzheimer	5
1.3. Ressonância Magnética em animais de pequeno porte	7
1.4. Sequências de Ressonância Magnética.....	9
1.4.1. Sequência Turbo RARE	9
1.4.2. Sequência FLASH	10
1.5. Perfusão em Ressonância Magnética.....	11
1.5.1. Agentes de contraste T1	11
1.5.2. Técnica DCE	13
1.5.3. Modelos Cinéticos.....	14
1.5.4. DCE – Aplicações recentes à Doença de Alzheimer.....	16
II. Material e Métodos.....	19
III. Resultados	26
IV. Discussão / Conclusão	32
V. Referências Bibliográficas.....	36
VI. Webgrafia	41
VII. Anexo 1 – Estatística descritiva	42

Índice de Figuras

Figura I.1 – Figura esquemática de uma unidade neurovascular (Adaptado de: <i>Assessment of blood–brain barrier disruption using dynamic contrast-enhanced MRI. A systematic review</i> (43)).	3
Figura I.2 – Imagens da mesma estrutura anatómica, adquiridas com os mesmos parâmetros técnicos, num equipamento de 7T (à esquerda) e num equipamento de 16,4T (à direita) (Adaptado de: <i>MRI in Rodent Models of Brain Disorders</i> (30)).	8
Figura I.3 – Esquema representativo da sequência RARE (ETL=4) (Adaptado de: http://www.magnetic-resonance.org/ch/08-02.html (I)).	9
Figura I.4 – Esquema representativo de uma sequência GE Spoiled (Adaptado de: http://mriquestions.com/spoiling---what-and-how.html (II)).	11
Figura I.5 – Variação da intensidade de sinal ao longo da curva do tempo de relaxação de um tecido com e sem administração de Gadolínico. A diminuição do tempo de relaxação T1 resulta num aumento da intensidade de sinal em imagens adquiridas com uma ponderação T1 (TR curto). Se forem utilizados TRs longos não se verificará nenhuma alteração do sinal do tecido, a não ser pelo aumento do efeito T2 resultante da presença de elevadas concentrações do agente de contraste nesse tecido (Adaptado de: <i>How does MRI work An Introduction to the Physics and Function of Magnetic Resonance Imaging</i> (32)).	12
Figura I.6 – Esquema representativo de uma aquisição sequencial DCE em determinado plano de corte. Esta deve iniciar antes da injeção do agente de contraste, para obtenção de imagens de referência sem contraste (baseline), e continuar após a injeção. (Adaptado de: <i>Perfusion and vascular permeability: Basic concepts and measurement in DCE-CT and DCE-MRI</i> (42)).	13
Figura I.7 – Imagens FLAIR e respectivos mapas de permeabilidade de BHE (Ktrans), cortes correspondentes em três pacientes (coluna à esquerda) e três participantes do grupo de controlo (à direita) (Adaptado de: <i>Quantitative measurement of blood-brain barrier permeability in human using dynamic contrast-enhanced MRI with fast T1 mapping</i> (4)).	14
Figura I.8 – Esquemas representativos do modelo da troca de dois compartimentos (à esquerda), do modelo de Tofts (centro) e do modelo Patlak (à direita) (Adaptado de:	

<i>Tracer kinetic modelling for DCE-MRI quantification of subtle blood–brain barrier permeability</i> (10)).....	16
Figura II.1 – Ratinho transgênico (modelo triplo transgênico para Alzheimer 3×Tg-AD) (Adaptado de: https://www.jax.org/strain/004807 (IV)).	20
Figura II.2 – Exemplo de posicionamento do ratinho (Adaptado de: https://www.researchgate.net/figure/MRI-equipment-Mouse-prepared-for-MRI-scan-monitoring-the-vital-parameters-breathing_fig1_49793597 (V)).	21
Figura II.3 – Delimitação das ROIs em imagem anatômica (T2 coronal). Amarelo - PFC; Vermelho - Str; Azul - Hip; Verde - VC.....	23
Figura II.4 – Curva padrão de perfusão (Adaptado de: http://mriquestions.com/how-is-dce-analyzed.html (VI)).	24

Índice de Tabelas

Tabela II.1 – Características técnicas do equipamento de RM Bruker - BioSpec 94/20 USR (Adaptado de: https://www.bruker.com/products/mr/preclinical-mri/biospec/technical-details.html (III)).	20
Tabela II.2 – Protocolo de aquisição – Cortesia ICNAS	22
Tabela III.1 – Resultados do Teste ANOVA para medidas repetidas, aplicado a cada um dos grupos para identificação de diferenças significativas nos diversos parâmetros mencionados, considerando o envelhecimento dos animais.....	29

Índice de Gráficos

Gráfico I.1 – Gráficos DCE intensidade de sinal vs tempo, obtidos através de ROIs no Hipocampo direito (à esquerda), Hipocampo esquerdo (no centro) e Cerebelo (à direita) em pacientes com DCL (vermelho) e grupo de controlo (azul) (Adaptado de: Vascular volume and blood-brain barrier permeability measured by dynamic contrast enhanced MRI in hippocampus and cerebellum of patients with MCI and normal controls (13)).....	17
Gráfico III.1 – Gráficos DCE intensidade de sinal vs. unidades de tempo, no Córtex Visual (VC) em ratinhos transgénicos (TG) e ratinhos de controlo (WT).	27
Gráfico III.2 - Gráficos DCE intensidade de sinal vs. unidades de tempo, no Córtex Pré-Frontal (PFC) em ratinhos transgénicos (TG) e ratinhos de controlo (WT).	27
Gráfico III.3 - Gráficos DCE intensidade de sinal vs. unidades de tempo, no Córtex Estriado (Str) em ratinhos transgénicos (TG) e ratinhos de controlo (WT).	28
Gráfico III.4 - Gráficos DCE intensidade de sinal vs. unidades de tempo, no Hipocampo (Hip) em ratinhos transgénicos (TG) e ratinhos de controlo (WT).	28
Gráfico III.5 – Gráficos AUC obtidos para as várias ROIs, para as diferentes idades dos ratinhos.	30
Gráfico III.6 – Gráficos Pamp (esquerda) e BBBi (direita) médios, obtidos para o Córtex Estriado, para os vários estádios da doença (*pun=0,0221; **pcor=0,0082).	30
Gráfico III.7 - Gráficos Pamp (em cima, à esquerda), BBBi (em cima, à direita) e WO (em baixo) médios, obtidos para o Hipocampo, para os vários estádios da doença (*pun=0,0385; **pcor<0,0047).	31

Índice de Equações

Equação I.1	10
-------------------	----

Lista de Abreviaturas

2CXM	<i>Two-compartment exchange model</i> - Modelo da Troca entre Dois Compartimentos
ACI	Artéria Carótida Interna
ACM	Artéria Cerebral Média
AIF	<i>Arterial Input Functions</i>
AUC	<i>Area under the curve</i> – Área sob a curva
AVC	Acidente Vascular Cerebral
ATP	Adenosina Trifosfato
Aβ	Proteínas β -amilóides
BBBi	<i>Blood-Brain Barrier Permeability Index</i> - Índice de permeabilidade da Barreira Hematoencefálica
BHE	Barreira Hematoencefálica
CBF	<i>Cerebral Blood Flow</i> – Fluxo Sanguíneo Cerebral
CBV	<i>Cerebral Blood Volume</i> – Volume Sanguíneo Cerebral
CNR	<i>Contrast-noise ratio</i> – Relação contraste ruído
DCE	<i>Dynamic Contrast Enhancement</i>
DCL	Défice Cognitivo Ligeiro
EEE	Espaço Extravascular Extracelular
EG	Eco de Gradiente
EM	Esclerose Múltipla
ESP	<i>Echo Spacing</i>
ETL	<i>Echo Train Length</i>
FA	<i>Flip Angle</i>
FLAIR	<i>Fluid Attenuation Inversion Recovery</i>
FLASH	<i>Fast Low-Angle Shot</i>
FOV	<i>Field of View</i>
F_p	Fluxo Plasmático
FSE	<i>Fast Spin Echo</i>
Gd	Gadolíneo
GKM	<i>General Kinetic Model</i> – Modelo Cinético Geral
H	Hidrogénio
Hip	Hipocampo
IRM	Imagem por Ressonância Magnética
LCR	Líquido Cefalorraquidiano

M_T	Magnetização Transversal
MRI	<i>Magnetic Resonance Image</i>
NEX	Número de Excitações
N_{pe}	Número de Codificações de Fase
Pamp	<i>Peak Amplitude</i> - Amplitude do pico de perfusão
PFC	<i>Prefrontal Cortex</i> - Córtex Pré-Frontal
p-Tau	Proteína Tau hiperfosforilada
PS	<i>Permeability-surface área product</i>
PS1	Presenilina 1
PS2	Presenilina 2
r₁	Relaxividade T1
RARE	<i>Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement</i>
RF	Radiofrequência
RM	Ressonância Magnética
ROI	<i>Region of Interest</i> - Região de interesse
SAR	<i>Specific Absorption Rate</i>
SE	Spin Eco
SNC	Sistema Nervoso Central
SNR	<i>Signal-to-Noise ratio</i> - Relação Sinal Ruído
Str	<i>Striatum</i> - Córtex Estriado
T_{aq}	Tempo de Aquisição
TE	Tempo de Eco
TG	Transgênico
TR	Tempo de Repetição
TSE	<i>Turbo Spin Echo</i>
TTP	<i>Time to Peak</i> - Tempo de pico
VC	<i>Visual Cortex</i> - Córtex Visual
v_p	Volume plasmático
v_e	Volume intersticial
WO	<i>Wash-Out</i>
WT	<i>Wild Type</i>
βAPP	Precursor da proteína β-amilóide

I. Introdução

Com o crescente envelhecimento populacional a nível mundial, e o aumento da incidência de doenças neurodegenerativas, existe um interesse renovado no estudo dos mecanismos dessas doenças de maneira a descobrir potenciais alvos terapêuticos. Estudos que têm vindo a ser desenvolvidos na área das doenças neurodegenerativas, como por exemplo Doença de Alzheimer, Parkinson ou Doença de Huntington, pretendem compreender se neste tipo de patologias existem alterações no sistema neurovascular, de que forma estas afectam a progressão/instalação das doenças e identificar novas metodologias terapêuticas. Sabe-se que, em estudos envolvendo administração de contraste endovenoso, situações de grande extravasamento de contraste, que implicam uma grande lesão da Barreira Hematoencefálica (BHE), são facilmente detectadas, no entanto, lesões subtis são de difícil identificação e quantificação, exigindo técnicas avançadas de imagem, controlo dos artefactos envolvidos na sua aquisição, excelente relação sinal-ruído (SNR – *Signal-to-Noise ratio*) e boa resolução temporal, para que possa ser feito o diagnóstico diferencial entre lesão subtil e BHE intacta.

Na presente investigação, realizada com recurso a estudos de Perfusão por Ressonância Magnética (RM), e utilizando a técnica DCE, calcularam-se parâmetros de perfusão simples de forma a tentar perceber se é possível detectar alterações da permeabilidade da BHE, em animais transgénicos ($3 \times \text{Tg-AD}^1$), portadores de três mutações genéticas que se pensa estarem associadas à Doença de Alzheimer ($\text{PS1}_{\text{M146V}}$, APP_{Swe} , e $\text{tau}_{\text{P301L}}$), e identificar as regiões anatómicas mais afectadas pela doença.

¹ Modelo triplo transgénico para a Doença de Alzheimer.

Para tal, foram comparados parâmetros de DCE (Área Sob a Curva (AUC – *Area Under the Curve*), Tempo de Pico (TTP – *Time to Peak*), Amplitude do Pico de Perfusão (Pamp – *Peak Amplitude*), Índice de Permeabilidade da BHE (BBBi – *Blood-Brain Barrier Permeability Index*) e o *Wash-Out* (WO)), calculados através de métodos matemáticos simples com base na intensidade de sinal, em várias regiões anatómicas de interesse (Córtex Visual (VC – *Visual Cortex*), Córtex Pré-Frontal (PFC – *Prefrontal Cortex*), Córtex Estriado (Str - *Striatum*) e Hipocampo (Hip)) em dois grupos de estudo, sendo o primeiro composto por 8 animais transgênicos e o segundo por 8 animais de controlo, saudáveis. Deste modo, pretendia-se identificar a existência ou não de diferenças significativas na permeabilidade da BHE entre os dois grupos e perceber se estas poderiam estar relacionadas com o envelhecimento ou com estadios mais avançados da doença; neste caso, a análise foi feita considerando as diferentes fases de evolução da doença e quais as regiões anatómicas mais afectadas.

A presente dissertação inicia-se por um enquadramento teórico sobre o tema, em que são abordadas a anatomia e clínica associada às alterações da permeabilidade da BHE, que se pensa estarem associadas à Doença de Alzheimer, bem como a motivação para a escolha desta doença no âmbito das doenças neurodegenerativas. De seguida, faz-se uma breve introdução à importância da utilização de pequenos animais para este tipo de estudos e quais os desafios técnicos a isso associados. Por fim, neste enquadramento teórico, são abordadas as sequências utilizadas no presente estudo, as suas características técnicas e explicada a importância e especificações dos estudos de perfusão, principalmente com recurso a técnicas dinâmicas que utilizam agentes de contraste endovenosos (DCE). Apesar deste estudo ser realizado com base em parâmetros matemáticos simples, que visam confirmar a existência de alterações da permeabilidade da BHE, existem já vários estudos que recorrem a métodos matemáticos elaborados, modelos cinéticos, que permitem quantificar essa alteração, e que serão também sumariamente abordados neste capítulo.

De seguida é explicada a metodologia utilizada, os resultados obtidos e por fim é feita a análise dos resultados, apresentadas as limitações deste estudo e sugestões para estudos futuros nesta área.

1.1. Barreira Hematoencefálica

A BHE é uma estrutura multicelular complexa que separa a circulação sanguínea do líquido cerebral extracelular (1–5) e é constituída pelas células endoteliais das paredes dos capilares cerebrais, ligadas por uniões proteicas próximas, por pericitos, lâmina basal e pelas terminações dos astrócitos (Figura I.1) (3,4,6–8). Esta estrutura tem como principais funções regular de forma rigorosa a passagem de iões, oxigénio, água, nutrientes e células para o cérebro e protegê-lo contra invasores tóxicos e/ou patogénicos (1,2,5,7,9), de forma a manter um ambiente bioquímico estável e garantir o funcionamento normal das células neuronais (5,9–11).

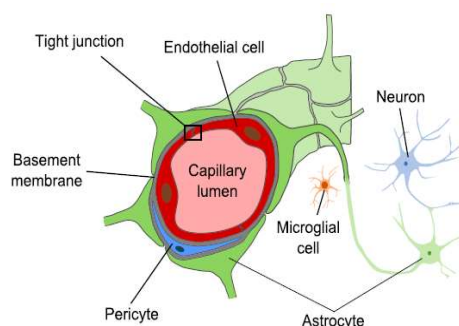


Figura I.1 – Figura esquemática de uma unidade neurovascular (Adaptado de: *Assessment of blood–brain barrier disruption using dynamic contrast-enhanced MRI. A systematic review* (48)).

As células endoteliais da BHE não são perfuradas e apresentam características específicas, quando comparadas com as células endoteliais periféricas, que lhe permitem manter um grande controlo dos produtos que entram e saem do Sistema Nervoso Central (SNC) (9). A baixa taxa de transcitose, que restringe significativamente os movimentos transcelulares de solutos mediados por vesículas sinápticas; o elevado número de mitocôndrias, importante para a produção de ATP (Adenosina Trifosfato) que é utilizado na criação de gradientes iónicos utilizados nas funções de transporte; e ainda o baixo nível de moléculas de ligação aos leucócitos, que limita o número de células imunitárias que entram no SNC, são algumas dessas características (9). Adicionalmente, pensa-se existir um metabolismo vascular diferencial nestas células capaz de alterar as propriedades físicas das moléculas, alterando a sua reactividade, solubilidade e propriedades de transporte (9). A combinação das propriedades físicas e moleculares da barreira, assim como a existência de transportadores específicos para determinados nutrientes, permitem que as células endoteliais exerçam um controlo apertado da homeostase do SNC (9).

Estas células endoteliais mantêm-se unidas através de uniões proteicas muito próximas que criam uma barreira paracelular de elevada resistência à passagem de moléculas e iões, polarizando os compartimentos luminal e extraluminal (9,12).

Os pericitos são células que se encontram na membrana basal vascular, na superfície extraluminal do endotélio vascular (5,9). Estes têm como função controlar, em resposta à actividade neuronal, a contratilidade dos vasos, alterando o seu diâmetro e consequentemente o fluxo sanguíneo, e ainda têm um papel importante na regulação da angiogénese, deposição de matriz extracelular e controlo da passagem de células imunitárias (5,9). Estas células são também muito importantes na regulação do desenvolvimento da BHE durante a fase embrionária, assim como na manutenção da sua integridade e das suas funções neuronais na idade adulta (5,9). Adicionalmente, os pericitos têm ainda a função de guiar as terminações dos astrócitos para as paredes vasculares cerebrais, aumentando a complexa interdependência dos diversos componentes das unidades neurovasculares (5). Keaney *et. al.* referem que estudos recentes reportam o envolvimento destas células no desenvolvimento de algumas doenças neurodegenerativas, nomeadamente na Doença de Alzheimer, pois a sua redução progressiva num modelo animal da Doença de Alzheimer acelerou o aparecimento de alterações conhecidas desta patologia como o aumento dos níveis de proteínas β -amilóides ($A\beta$) cerebrais e perda neuronal precoce (5).

A membrana basal funciona como âncora para vários sinalizadores no sistema vascular mas também como uma barreira adicional que as moléculas e células terão de atravessar antes de acederem ao tecido neuronal (9,12).

Os astrócitos fazem a ligação entre os circuitos neuronais e os vasos sanguíneos, permitindo a transmissão de sinais que fazem a modulação das características funcionais e morfológicas dos capilares do SNC (9,12), são responsáveis pela regulação da quantidade de água no cérebro (5) e estão envolvidos na formação e manutenção das uniões proteicas impermeáveis (5,12).

Diferentes regiões do cérebro têm BHE com diferentes propriedades, que se adequam às necessidades das estruturas que aí se encontram. Por exemplo, em algumas regiões específicas junto ao terceiro e quarto ventrículos identificaram-se veias com uma muito maior permeabilidade passiva comparativamente a outras regiões cerebrais (9).

Todos estes componentes e as suas relações permitem estabelecer e manter as vias de transporte transcelulares e paracelulares das células endoteliais cerebrais, cuja quebra poderá resultar em alterações incontroláveis da permeabilidade da BHE

(5).Vários estudos indicam que situações de traumatismo craniano (4,9,10), Esclerose Múltipla (EM) (9,13,14), Acidentes Vasculares Cerebrais (AVCs) (1,9,10,13), infecções cerebrais (1) e Tumores cerebrais (13,15) causam grandes compromissos da BHE. No entanto, estudos recentes relatam também uma relação cada vez mais significativa entre patologias neurodegenerativas e alterações neurovasculares (13,16–18), incluindo alteração da permeabilidade da BHE, ou seja, alterações no processo de síntese das proteínas envolvidas nas uniões das células endoteliais, o que facilita o acesso de agentes externos, como células periféricas ou agentes patogénicos, ao SNC (10,11,14,16).

1.2. Doença de Alzheimer

O constante aumento do número de casos de patologias neurodegenerativas faz com que estas sejam actualmente consideradas um dos maiores desafios a nível social e dos cuidados de saúde, tendo impacto na gestão socioeconómica dos tratamentos e, consequentemente, na sustentabilidade dos sistemas de saúde de muitos países (19–21). Segundo Meyer *et al.*, estima-se que na Europa o número de pacientes com este tipo de patologias praticamente duplique entre 2001 (7,7 milhões) e 2040 (15,9 milhões), com cerca de 53,7% dos casos devidos a Doença de Alzheimer, dos quais 15,8% com causas vasculares (19). Por isso, compreender melhor este tipo de doenças poderá permitir o desenvolvimento de mecanismos de prevenção e tratamento mais eficientes (19,21,22).

A Doença de Alzheimer é uma patologia neurodegenerativa irreversível, associada ao envelhecimento, e clinicamente caracterizada por alterações cognitivas como diminuição progressiva do conhecimento e da memória, principalmente de curto prazo, e alterações comportamentais, nomeadamente nas tarefas de vida diárias, na linguagem e em aspectos característicos da personalidade (23–26). Por este motivo, no presente estudo foram calculados os parâmetros de perfusão em regiões anatómicas que se considera estarem relacionadas com essas funções cognitivas caracteristicamente afectadas na Doença de Alzheimer, como o Córtex Visual, o Córtex Pré-Frontal, o Córtex Estriado e o Hipocampo.

A função do Córtex Visual está relacionada com a representação a nível neuronal do que é visto pelo indivíduo, pensando-se que em estadios iniciais da Doença de Alzheimer os pacientes possam ter dificuldade em distinguir objectos semelhantes, o que pode interferir com algumas das suas tarefas diárias e consequentemente com a

sua independência (diferenciação entre medicamentos de aspecto semelhante, por exemplo) (27).

O Córtex Pré-Frontal é responsável por processos cognitivos complexos como o raciocínio ou a planificação, mas também tem uma importante função de controlo emocional e da personalidade (28). Além disso, é também onde são guardadas as memórias de longo prazo (29).

Considera-se que o Córtex Estriado está associado ao controlo motor voluntário, relacionado com a antecipação, início e execução dos movimentos (30). No entanto, pelas suas características estruturais, parece ser também um mediador entre os circuitos neuronais e os comportamentos sociais, assumindo um papel importante nos processos cognitivos desencadeados pelo comportamento social, contribuindo assim para o sucesso das interações sociais (30).

O Hipocampo é uma região anatómica relacionada com a aprendizagem; além disso, participa na organização da memória espacial, emocional e memória de longo prazo, pensando-se ainda que está envolvido na transferência de informação da memória de curto prazo para a de longo prazo, localizada no Córtex Pré-Frontal, e em processos de gestão de *stress* e ansiedade (29,31).

Wang *et al.* referem que provavelmente as alterações vasculares cerebrais, como por exemplo a degeneração dos capilares cerebrais, provocada pela toxicidade das proteínas A β , antecedem as lesões neuronais e o início da doença, nos pacientes com Doença de Alzheimer (17). Actualmente, sabe-se que nesta doença há evidências morfológicas e bioquímicas que estão na origem de rupturas da BHE, o que permite a passagem para o cérebro de proteínas A β circulantes, desencadeando um conjunto de processos amilóides neurotóxicos, como o aumento da formação de placas amilóides extracelulares, formação de emaranhados neurofibrilares, associados a acumulação de proteínas Tau hiperfosforiladas (p-Tau), e o desenvolvimento de angiopatia amilóide cerebral (17,21–26,32). Estas lesões estão associadas a perdas neuronais, processos inflamatórios e disfunções sinápticas (20,22–25), frequentemente ao nível de estruturas relacionadas com a memória, como o Hipocampo (26).

Segundo Oddo *et al.*, a Doença de Alzheimer pode manifestar-se esporadicamente ou ser transmitida geneticamente (característica autossómica dominante), tendo sido descobertos três *loci* genéticos associados a esta patologia: β APP (precursor da proteína A β) no cromossoma 21, PS1 (Presenilina 1) no cromossoma 14, e PS2 (Presenilina 2) no cromossoma 1 (24).

Os animais transgênicos, alterados geneticamente, têm sido extremamente valiosos no estudo da patogênese desta patologia apesar de, segundo Oddo *et al.*, nenhum modelo reproduzir completamente o espectro neuropatológico da doença (24,33). No entanto, Oddo e a sua equipa reportaram uma derivação tripla para um modelo transgênico, os ratinhos transgênicos 3×Tg-AD, que têm três genes mutados (PS1_{M146V}, APP_{Swe}, e tau_{P301L}) (24,33). Considera-se que a expressão dessas três mutações estará relacionada com o desenvolvimento de regiões cerebrais normalmente afectadas pelo envelhecimento e regiões específicas onde normalmente se encontram agregados de proteínas β-amilóides (Aβ) e proteínas Tau hiperfosforiladas (p-Tau), assim como compromissos nas funções sinápticas e cognitivas, as quais simulam a progressão da doença nos humanos (23,24). Por este motivo, neste estudo foram utilizados estes ratinhos transgênicos como possível modelo da doença de Alzheimer nos humanos.

1.3. Ressonância Magnética em animais de pequeno porte

Os estudos por RM são uma ferramenta amplamente utilizada na clínica médica e na investigação de patologias neurológicas em humanos. No entanto, o surgimento de equipamentos específicos para o estudo de animais de pequeno porte, nomeadamente para estudos do SNC, têm tornado este tipo de estudos cada vez mais frequentes (34).

A fácil manutenção das colónias de ratos/ratinhos e a grande disponibilidade de animais transgênicos, aliadas à facilidade de criação de novos modelos geneticamente modificados, que permitam uma reprodução satisfatória das patologias e seus efeitos nos humanos, são as grandes vantagens apontadas à utilização destes animais na investigação de patologias do SNC (34). A este nível, podem ser estudados modelos de AVC, modelos para patologia traumática do cérebro e espinal medula, tumores cerebrais e doenças neurodegenerativas, por exemplo (34).

No entanto, existem vários motivos que tornam diferentes os estudos de RM realizados em pequenos animais comparativamente aos estudos realizados em humanos, sendo o principal o tamanho das estruturas em estudo (34). A maioria dos equipamentos de RM desenvolvidos especificamente para estudos de pequenos animais opera com altas intensidades de campo, 4,7 a 11,7 T, enquanto que os equipamentos maioritariamente utilizados na clínica médica têm campos com intensidades até 3T (34). A principal vantagem das intensidades de campo elevadas é

o aumento da SNR, tal como pode ser visto no exemplo da Figura 1.2. No entanto, também existem algumas desvantagens como, por exemplo, o aumento local da temperatura nos tecidos, associada ao aumento da deposição de energia (SAR - *Specific Absorption Rate*), e o aumento proporcional de artefactos de susceptibilidade magnética e desvio químico, entre outros (34). Estes artefactos, apesar de já se encontrarem presentes em estudos realizados em campos mais baixos, tornam-se mais evidentes com o aumento da intensidade de campo (34). Isto faz com que tenham de ser investigadas/desenvolvidas técnicas que permitam reduzir esses artefactos. Um exemplo disto é a aplicação de sequências FSE (*Fast Spin Echo*) / RARE (*Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement*) , que utiliza um conjunto de impulsos de radiofrequência (RF) que permitem reduzir os efeitos da falta de homogeneidade de campo e conseqüentemente os artefactos de susceptibilidade magnética (34).

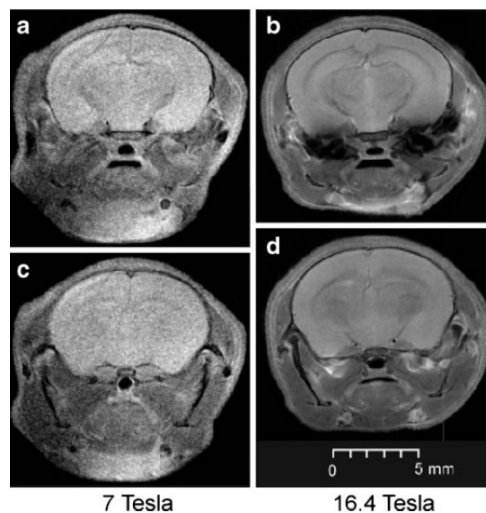


Figura 1.2 – Imagens da mesma estrutura anatómica, adquiridas com os mesmos parâmetros técnicos, num equipamento de 7T (à esquerda) e num equipamento de 16,4T (à direita) (Adaptado de: *MRI in Rodent Models of Brain Disorders* (34)).

Idealmente, pretende-se realizar estudos com elevada SNR e boa resolução espacial num curto período temporal (boa resolução temporal). No entanto, estes três factores são interdependentes pois, normalmente, uma boa SNR implica pior resolução espacial e/ou aumento do tempo de aquisição, enquanto que estudos com elevadas SNR e boa resolução espacial implicam tempos de aquisição superiores (34). Assim, tem de se encontrar um compromisso de modo a obter a melhor qualidade de imagem possível, num tempo aceitável e mantendo a segurança do paciente/animal em estudo.

1.4. Sequências de Ressonância Magnética

São vários os estudos realizados com aplicação da técnica DCE, no entanto, existe uma grande heterogeneidade nos protocolos de IRM utilizados, nomeadamente no que se refere aos equipamentos e parâmetros técnicos. São referidos vários tipos de sequências pré-contraste, com diferentes ponderações (T1 idêntica à aquisição DCE, T2 e/ou T2 FLAIR (*Fluid Attenuation Inversion Recovery*), por exemplo), para delimitação das zonas de lesão, selecção das regiões de interesse (ROI – *Region of Interest*) ou análises *voxel-a-voxel*, mediante a patologia e os objectivos de cada estudo. Parece, no entanto, haver alguma coerência na selecção de sequências rápidas EG (Eco de Gradiente) *Spoiled*, as quais são adequadas à aquisição das imagens dinâmicas, mas os parâmetros técnicos são também bastante variáveis (10,17).

Desta forma, e por parecer não haver consenso nas sequências a utilizar, no presente estudo foi utilizada uma sequência Turbo RARE para aquisição de imagens anatómicas, a qual permitiu, com boa resolução espacial e minimizando os possíveis artefactos de susceptibilidade magnética, a delimitação das ROIs pretendidas e, à semelhança da maioria dos estudos, foi utilizada uma sequência EG *spoiled*, 2D DCE-FLASH (*Fast Low-Angle Shot*), para as aquisições dinâmicas.

1.4.1. Sequência Turbo RARE

A sequência Turbo RARE, também conhecida como sequência *Turbo Spin Echo* (TSE) ou *Fast Spin Echo* (FSE), é uma sequência de imagem rápida que utiliza um impulso de RF seguido de um conjunto de impulsos de 180° (ETL - *Echo Train Length*) que permitem recuperar a coerência da magnetização transversal (M_T) disponível, originando múltiplos ecos no mesmo tempo de repetição (TR) (ver Figura I.3) (35–37).

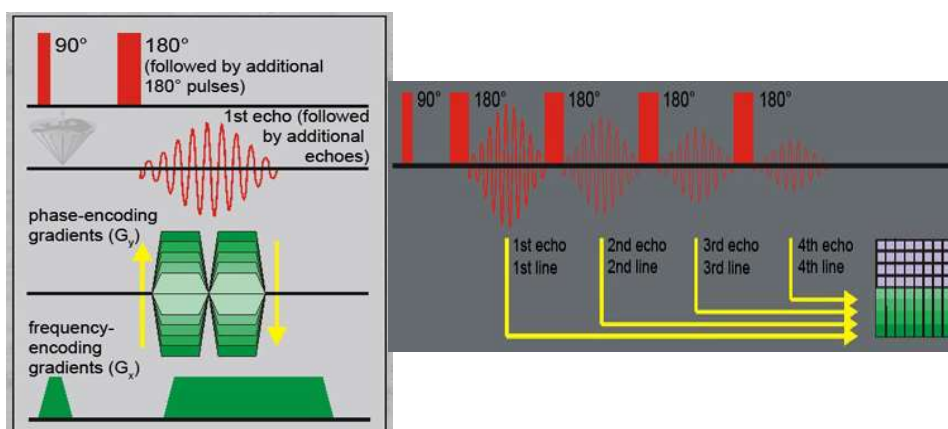


Figura I.3 – Esquema representativo da sequência RARE (ETL=4) (Adaptado de: <http://www.magnetic-resonance.org/ch/08-02.html> (1)).

Esta sequência substituiu quase na totalidade as sequências *Spin Eco* (SE) convencionais pois, apesar de estas continuarem a ser consideradas as mais reprodutíveis em RM, são longas e têm uma má resolução temporal.

Nas sequências Turbo RARE são realizadas várias codificações de fase (N_{pe}) para cada impulso de radiofrequência de 90° , uma para cada impulso de 180° , o que permite uma aquisição de imagem mais rápida. Por exemplo, se se considerar uma sequência com ETL=8, poderão ser codificadas 8 linhas do espaço K de uma imagem para o mesmo TR, reduzindo em 8 vezes o tempo de aquisição (T_{aq}) de cada corte, de acordo com a Equação I.1:

Equação I.1

$$T_{aq} = \frac{TR \times N_{pe} \times NEX}{ETL}$$

em que NEX é o número de excitações, ou seja, o número de vezes que o sinal é medido no corte.

Por utilizar TR longos, esta sequência é ideal para aquisições ponderadas em T2 (37,38). Para além das vantagens associadas à redução do tempo de aquisição, esta também é uma sequência bastante utilizada por ser pouco sensível a artefactos de falta de homogeneidade do campo B_0 e de susceptibilidade magnética (35).

1.4.2. Sequência FLASH

A sequência FLASH (Figura I.4) é uma sequência EG *Spoiled* que usa impulsos de RF com um *flip angle* (FA) inferior a 90° , seguido da aplicação de gradientes de leitura reversíveis para produção de um sinal de gradiente de eco. O *flip angle* pequeno permite criar uma magnetização longitudinal em estado estacionário, sendo a magnetização transversal eliminada pela aplicação de um gradiente forte (*Spoiler*) (35,38). Desta forma, quando é aplicado um novo impulso de RF, já não existe magnetização transversal, o que permite a utilização de TRs mais curtos do que nas sequências EG convencionais. Como permite utilizar TR e TE (Tempo de Eco) muito curtos, esta sequência possibilita a obtenção de imagens ponderadas em T1, com boa resolução temporal, ideais para estudos dinâmicos (35,37).

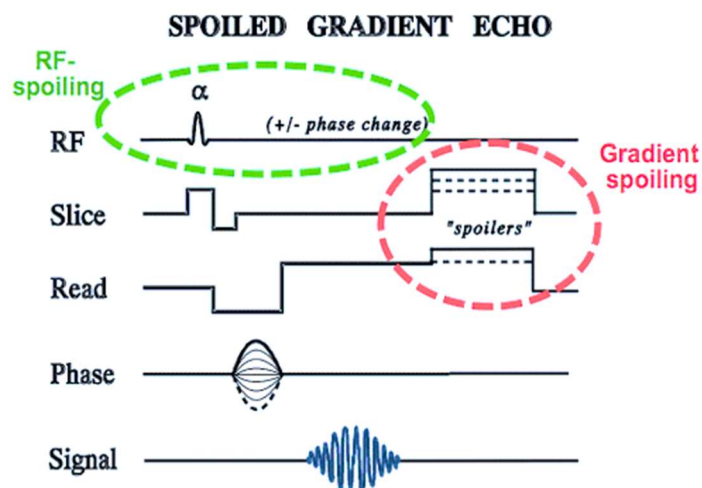


Figura 1.4 – Esquema representativo de uma sequência GE Spoiled (Adaptado de: <http://mriquestions.com/spoiling---what-and-how.html> (11))

1.5. Perfusão em Ressonância Magnética

Tradicionalmente, a quantificação de alterações da permeabilidade da BHE pode ser realizada através da análise da albumina plasmática presente no líquido cefalorraquidiano, que é um procedimento bastante invasivo (13), ou através do teste histológico *Evans Blue*, que implica o sacrifício dos animais em estudo ou aplicação em cadáveres, não permitindo seguir as lesões longitudinalmente (4,10). Por este motivo, as técnicas imagiológicas actualmente disponíveis, como a IRM, assumem uma grande importância no estudo das alterações da permeabilidade da BHE em patologias neurodegenerativas (10,18), permitindo identificar e quantificar, *in vivo* e de forma não invasiva, alterações cerebrais funcionais e estruturais (4,10,13).

1.5.1. Agentes de contraste T1

Em IRM, o contraste entre as estruturas resulta de diferenças nas intensidades de sinal dos diferentes tecidos, diferenças essas que podem ser realçadas pela utilização de agentes de contraste (36). Para tal, estes agentes têm de ter características físico-químicas e farmacocinéticas específicas que permitam alterar as propriedades intrínsecas de contraste dos tecidos biológicos, podendo fazê-lo alterando a sua densidade protónica, o campo magnético local ou as propriedades de ressonância dos tecidos. Assim, as propriedades de relaxamento dos prótons de Hidrogénio (H) dos tecidos são alteradas, levando a uma alteração nos seus valores característicos de T1, tempo de relaxação correspondente à recuperação de 63% da magnetização

longitudinal, e T2, tempo de relaxação correspondente à perda de 37% da magnetização transversal (Figura I.5) (36).

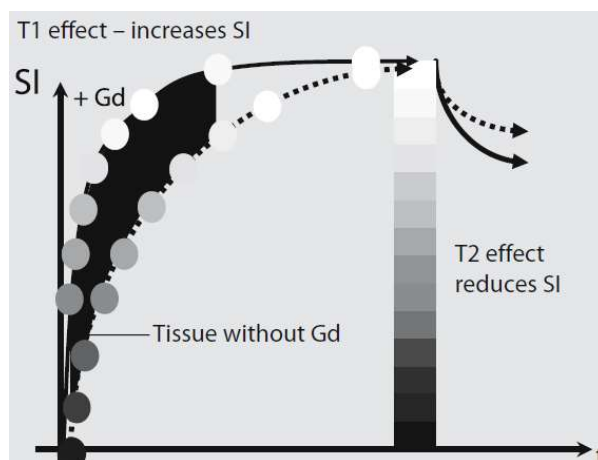


Figura I.5 – Variação da intensidade de sinal ao longo da curva do tempo de relaxação de um tecido com e sem administração de Gadolínio. A diminuição do tempo de relaxação T1 resulta num aumento da intensidade de sinal em imagens adquiridas com uma ponderação T1 (TR curto). Se forem utilizados TRs longos não se verificará nenhuma alteração do sinal do tecido, a não ser pelo aumento do efeito T2 resultante da presença de elevadas concentrações do agente de contraste nesse tecido (Adaptado de: *How does MRI work An Introduction to the Physics and Function of Magnetic Resonance Imaging* (36)).

Os meios de contraste à base de Gadolínio (Gd) são medicamentos com características paramagnéticas, frequentemente utilizados nos estudos de IRM (36,39,40) para detecção e identificação de diversas patologias (6,39), inclusive para identificar regiões de perda de continuidade da BHE (13,40), e permitir a definição de estadios de doença. Quando a BHE está intacta, não permite a passagem do agente de contraste do sangue para os tecidos do SNC, contrariamente ao que acontece quando há descontinuidades/lesões (4,40). Nestes casos, há alteração local da susceptibilidade magnética (15,41), aumento da taxa de relaxação dos prótons de H e consequentemente aumento da intensidade do sinal das imagens ponderadas em T1, realçando regiões lesadas da BHE (15,39,40,42). Por este motivo, torna-se particularmente importante incluir uma avaliação quantitativa da permeabilidade da BHE nos estudos patofisiológicos, permitindo o diagnóstico, prognóstico e previsão da resposta terapêutica de várias patologias (1), podendo ainda possibilitar o desenvolvimento e optimização de algumas intervenções terapêuticas (3,4,10). No entanto, essa quantificação usando técnicas de RM em humanos pode implicar alguns desafios técnicos, como a necessidade de administrar agentes de contraste endovenoso, o uso de técnicas de imagem com boa resolução temporal, que permita a realização de estudos dinâmicos, e de elevada qualidade (bom contraste e SNR) (1,43).

1.5.2. Técnica DCE

Os estudos de perfusão, com recurso a técnicas dinâmicas com administração de contraste endovenoso, como a DCE, implicam a aquisição de várias imagens da estrutura anatómica em estudo antes, durante e após a administração de um *bolus* de contraste endovenoso (Figura I.6) (1,39,44), possibilitando assim estudos longitudinais, de forma minimamente invasiva, nas regiões de interesse (3,6,10,13,41). Analisando as características específicas de cada *voxel*, ao longo do estudo e nas várias imagens obtidas, torna-se possível estabelecer uma relação temporal entre a sua intensidade de sinal e a concentração de agente de contraste (39,44). Contrariamente às imagens ponderadas em T1 convencionais, que são influenciadas pelos diversos parâmetros técnicos de aquisição, a DCE permite a avaliação quantitativa da difusibilidade dos agentes de contraste T1 (paramagnéticos) através da BHE (1,10,39,40), tornando possível quantificar a integridade do sistema neurovascular (15) de forma mais robusta do que quando se pretende avaliar a alteração da permeabilidade da BHE baseando-se apenas na intensidade de sinal dos pixels (1). Em estudos recentes, realizados em cobaias com recurso à técnica DCE, e conforme já referido anteriormente, a SNR e a resolução temporal das imagens dinâmicas têm sido melhoradas utilizando campos magnéticos elevados e sequências rápidas de EG (10).

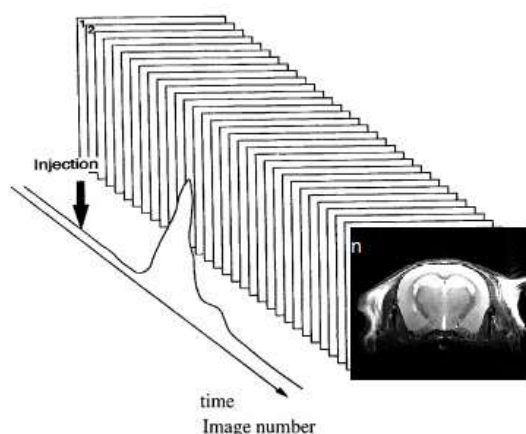


Figura I.6 – Esquema representativo de uma aquisição sequencial DCE em determinado plano de corte. Esta deve iniciar antes da injeção do agente de contraste, para obtenção de imagens de referência sem contraste (*baseline*), e continuar após a injeção. (Adaptado de: *Perfusion and vascular permeability: Basic concepts and measurement in DCE-CT and DCE-MRI* (46)).

Heye *et al.* referem que existem diversos estudos em que a estimativa da alteração da permeabilidade da barreira é baseada em métodos simples e directos, que não partem de nenhum modelo e que não requerem técnicas avançadas de processamento de imagem, em que se faz a comparação da variação da intensidade de sinal em curvas

temporais ou calculando a área sob a curva (13). No entanto, consideram que os resultados obtidos através destas metodologias podem ser influenciados por diversas variáveis, nomeadamente pelos parâmetros técnicos de aquisição, não permitem distinguir o contraste nos espaços intra e extra-vasculares e tornam difícil estabelecer comparações inter ou intra-indivíduos. Por esse motivo, têm surgido diversos modelos matemáticos cada vez mais complexos que permitem identificar, quantificar e comparar alterações subtis da permeabilidade da BHE compensando desta forma as limitações dos primeiros modelos (13).

1.5.3. Modelos Cinéticos

Usar modelos cinéticos com imagens adquiridas através da técnica DCE aplicada a estudos de RM cerebral permite, com bastante precisão e de forma não invasiva (1), estudar e quantificar parâmetros hemodinâmicos, como sejam o fluxo sanguíneo cerebral (CBF – *cerebral blood flow*) e o volume sanguíneo cerebral (CBV – *cerebral blood volume*), e parâmetros fisiológicos, como o coeficiente de transferência de volume entre o plasma sanguíneo e o espaço extravascular extracelular (EEE ou espaço intersticial) (K_{trans}) e a fracção de volume intersticial (v_e) (10,13,39,41). Actualmente, diversos estudos referem que K_{trans} é o parâmetro que melhor reflecte as alterações da permeabilidade dos tecidos (Figura I.7) (10,14,15,45), pois corresponde à taxa de transferência de moléculas, por exemplo de um agente de contraste, dos vasos sanguíneos para o espaço intersticial (3,6,13,15), por unidade de tempo, volume de tecido e concentração do agente de contraste no plasma sanguíneo (ml/min/100ml) (13,39), ou seja, tem em consideração factores estruturais, fisiológicos e o agente de contraste utilizado (6,15).

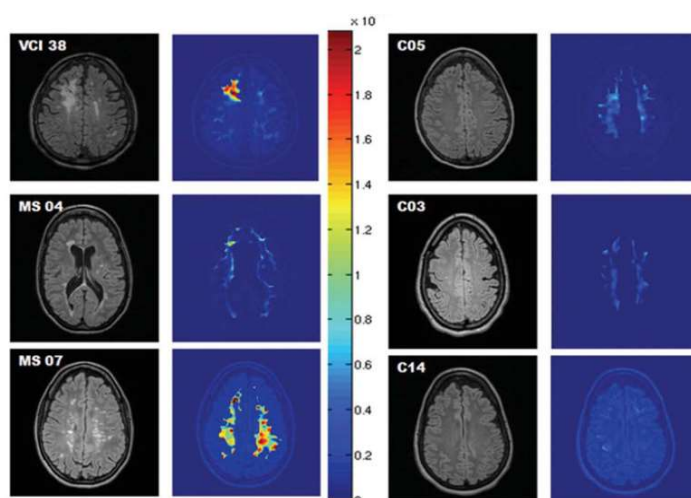


Figura I.7 – Imagens FLAIR e respectivos mapas de permeabilidade de BHE (K_{trans}), cortes correspondentes em três pacientes (coluna à esquerda) e três participantes do grupo de controlo (à direita) (Adaptado de: *Quantitative measurement of blood-brain barrier permeability in human using dynamic contrast-enhanced MRI with fast T1 mapping* (1)).

Conforme já referido, a maioria dos estudos de DCE no cérebro são relativos a lesões significativas da BHE em que há um grande extravasamento do agente de contraste para o espaço extravascular com um rápido realce do seu sinal (1,13), em vez de alterações subtis na BHE em que são necessárias aquisições de imagem durante mais tempo para permitir a passagem de mais contraste para o espaço intersticial (1,13,15,44). Quando há uma ruptura da BHE, o valor K_{trans} aumenta rapidamente devido ao aumento da permeabilidade entre os vasos e o tecido cerebral, sendo de aproximadamente zero quando a BHE está intacta (1,6,15,42). Neste caso, ou quando há lesões subtis na BHE, como em algumas patologias crónicas como doenças neurodegenerativas (1), o valor K_{trans} é, no mínimo, uma ou duas vezes inferior a quando existe um grande compromisso da BHE, tornando bastante difícil a sua quantificação (15).

O desenvolvimento de modelos matemáticos aplicados às imagens de RM tem como objectivo obter critérios quantitativos que permitam relacionar o sinal dos tecidos em estudo com parâmetros fisiológicos como o volume plasmático, o volume intersticial e o fluxo de extracção (quantidade de contraste transferida dos vasos sanguíneos para o espaço intersticial e vice-versa (PS – *Permeability-surface área product*)) (13). De entre os vários modelos matemáticos existentes, os mais frequentemente referidos são o Modelo da Troca entre Dois Compartimentos (2CXM - *Two-compartment exchange model*), o Modelo Modificado Tofts - Modelo Cinético Geral (GKM - *General Kinetic Model*) e o Modelo *Patlak*, que diferem entre si na complexidade dos dados envolvidos e no tipo e quantidade de variáveis que consideram. Em todos eles é necessário calcular a cinética associada ao realce das estruturas vasculares da área de estudo, designada por *Arterial Input Functions* (AIF) (1,6,10), considerando como referência a artéria cerebral média (ACM) (6), a artéria carótida interna (ACI) (14,41) ou ainda o seio sagital superior, sendo este último considerado o menos sensível a artefactos de volume parcial (1,10).

O 2CXM (13,42) foi desenvolvido com o objectivo de ser um modelo robusto para medição de parâmetros fisiológicos como o extravasamento da BHE. Sourbron *et al.* descreveram este modelo – ver Figura 1.8- que permite, através de uma série de equações, relacionar parâmetros como o fluxo plasmático (F_p), as fracções de volumes dos compartimentos plasmático (v_p) e intersticial (v_e) e a quantidade de contraste transferida entre estes dois compartimentos (PS). Este modelo pode ser aplicado em estudos com baixa SNR, em casos em que exista ou não ruptura da BHE (41).

O GKM ou Modelo Modificado Tofts (6,13,39) é referido como sendo o modelo cinético mais utilizado para descrever alterações na concentração de Gd nos vasos sanguíneos em diferentes regiões cerebrais, com e sem alteração da permeabilidade da BHE (6,39). Este modelo pode ser aplicado a um tecido com dois compartimentos (Figura 1.8), onde existe elevada perfusão ($F_p=\infty$), considerando que o contraste é transportado do fluxo vascular para o espaço intersticial e regressa ao primeiro pela via inversa (13).

O Modelo *Patlak* considera que, em determinado momento, uma substância marcadora no plasma, como por exemplo um agente de contraste, passa para o tecido cerebral de forma unidireccional e irreversível, ou seja, não regressa ao fluxo sanguíneo, pelo que apenas permite o cálculo dos parâmetros K_{trans} e v_p (Figura 1.8) (1,7,13,14).

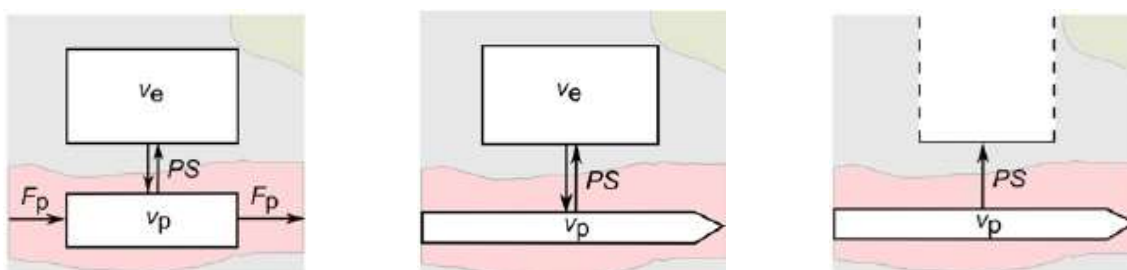


Figura 1.8 – Esquemas representativos do modelo da troca de dois compartimentos (à esquerda), do modelo de Tofts (centro) e do modelo *Patlak* (à direita) (Adaptado de: *Tracer kinetic modelling for DCE-MRI quantification of subtle blood–brain barrier permeability* (13)).

1.5.4. DCE – Aplicações recentes à Doença de Alzheimer

Relativamente à aplicação da técnica DCE no estudo de doenças neurodegenerativas, em particular na Doença de Alzheimer, há ainda muito por explicar. Starr *et al.* realizaram um estudo com 30 participantes (15 pacientes com Doença de Alzheimer e 15 participantes de controlo saudáveis, cônjuges dos pacientes) com idades similares, nos quais seleccionaram 167 ROIs de 9 *voxels* (substância cinzenta profunda - 12 ROIs, substância cinzenta cortical - 72 ROIs, substância branca - 72 ROIs, LCR (Líquido Cefalorraquidiano) - 8 ROIs e artérias basilar e carótidas internas - 3 ROIs), distribuídas em zonas correspondentes em ambos os hemisférios cerebrais e cuja intensidade de sinal foi medida ao longo de 30 minutos (18). Os autores referem que determinar a existência de um aumento da permeabilidade da BHE em pacientes com Doença de Alzheimer é difícil, sugerindo que nestes casos a BHE é permeável mesmo em estadios iniciais da doença, não tendo, no entanto, conseguido quantificar a diferença no extravasamento entre os grupos (18). Este estudo aponta ainda para o

facto de a idade, e as alterações vasculares a ela associadas, poderem estar relacionadas com alterações da permeabilidade da BHE, sendo este um factor a ter em conta neste tipo de estudos (18).

Wang *et al.* realizaram um estudo com a técnica DCE aplicada a 22 participantes (11 pacientes com Déficit Cognitivo Ligeiro (DCL) e 11 participantes de controlo saudáveis), sem recurso a modelos cinéticos complexos, em que sugerem que quando se compara o grupo de controlo com pacientes com DCL, que consideram ser um estado inicial de Doença de Alzheimer, estes apresentam uma diminuição da perfusão vascular e possivelmente descontinuidade na BHE no Hipocampo mas que não se verifica no Cerebelo, que parece manter-se preservado durante o desenvolvimento desta patologia (17). No Gráfico I.1, pode ver-se que no grupo de participantes saudáveis há um pico de intensidade de sinal 50 s após a injeção do agente de contraste, seguido de um decaimento mais rápido do sinal, comparativamente aos pacientes (17). Estes apresentam um realce mais precoce de sinal, que sugere um volume vascular baixo e um decaimento mais lento, que consideram estar possivelmente relacionados com extravasamento de contraste através de uma descontinuidade da BHE (17). Este comportamento parece ser semelhante nos Hipocampus direito e esquerdo, no entanto, no Cerebelo as curvas de ambos os grupos são praticamente idênticas (17). Na análise estatística deste estudo utilizaram ainda o índice de permeabilidade da BHE (BBBi), definido como sendo a razão entre o realce tardio (4 – 5 min) e o valor do pico (50 s), tendo concluído que os pacientes apresentam um volume vascular inferior e um BBBi superior nos Hipocampus, comparativamente com o grupo de controlo, não tendo encontrado diferenças ao nível do Cerebelo (17).

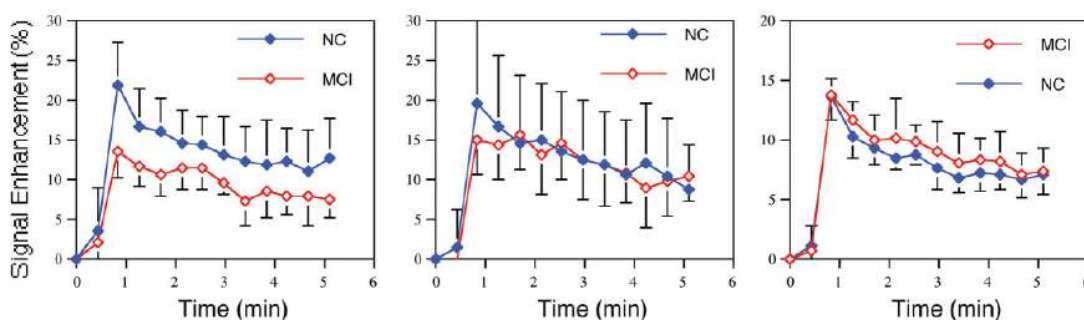


Gráfico I.1 – Gráficos DCE intensidade de sinal vs tempo, obtidos através de ROIs no Hipocampo direito (à esquerda), Hipocampo esquerdo (no centro) e Cerebelo (à direita) em pacientes com DCL (vermelho) e grupo de controlo (azul) (Adaptado de: *Vascular volume and blood-brain barrier permeability measured by dynamic contrast enhanced MRI in hippocampus and cerebellum of patients with MCI and normal controls* (17)).

Heye *et al.* consideram que os protocolos de DCE utilizados na investigação de alterações subtis da permeabilidade da BHE deverão privilegiar a resolução espacial, a cobertura da totalidade do volume cerebral, a relação contraste-ruído (CNR – *Contrast-noise ratio*) e a taxa de sobre-amostragem (SNR) de forma a permitir a análise de pequenos extravasamentos, que ocorrem lentamente, através das estruturas cerebrais (13). Sugerem ainda que em estudos futuros se procure otimizar os protocolos de aquisição de imagem, de modo a permitir uma melhoria na detecção e quantificação de alterações subtis da permeabilidade da BHE e controlar os artefactos, nomeadamente de volume parcial (17,41) ou distorções da *baseline* do sinal inerentes ao processo de aquisição (*drifts*), principalmente em estudos realizados sem administração de contraste endovenoso (13). Além disso, Li *et al.* referem que este é um tema que ainda carece de desenvolvimentos pois a IRM K_{trans} apresenta normalmente baixa SNR e más resoluções temporal e espacial (10). No entanto, estudos recentes têm utilizado campos magnéticos elevados para aumentar a SNR e sequências rápidas EG (10) para melhorar a resolução temporal, permitindo estudos dinâmicos com elevada qualidade de imagem (10).

Outros estudos, realizados com campos magnéticos elevados e com recurso a modelos cinéticos complexos, identificaram que o parâmetro K_{trans} em grupos de controlo é baixo mas não é igual a zero, pelo que se torna pertinente aprofundar este tipo de estudos para melhorar a diferenciação entre BHE intacta e BHE com alterações subtis da permeabilidade, que se verificam frequentemente em estados patológicos iniciais (15).

Apesar dos diversos estudos de RM realizados com a técnica DCE e das diferenças técnicas existentes entre eles, parece comum o facto de estudos que impliquem um pequeno extravasamento de contraste para o espaço intersticial serem realizados durante períodos mais longos, com aquisição de mais imagens que permitam identificar essa ligeira alteração de concentração/sinal. Apesar de todas as variabilidades encontradas, considera-se unânime que aplicar estes métodos a doenças neurodegenerativas é difícil por se tratarem de estudos em que há alterações subtis da permeabilidade da BHE, de difícil identificação e quantificação (18), que exige imagens de elevada qualidade, com elevada SNR e contraste, e com boa resolução temporal que permitam estudos dinâmicos para seguir fidedignamente a progressão do contraste na estrutura em estudo (rápido no sistema vascular, lento quando há extravasamentos).

II. Material e Métodos

Este projecto de investigação foi realizado no ICNAS (Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde), no âmbito do Mestrado de Radiações aplicadas às Tecnologias da Saúde – Ramo de Ressonância Magnética, da Escola Superior de Tecnologias da Saúde do Instituto Politécnico de Lisboa (ESTeSL-IPL), e teve como objectivo, através de um estudo exploratório longitudinal, identificar a existência ou não de alterações da permeabilidade da BHE em diversas regiões cerebrais de interesse, em animais transgénicos portadores de mutações genéticas que se considera estarem associadas à Doença de Alzheimer.

À semelhança das restantes experiências envolvendo animais levadas a cabo nesta instituição, o presente projecto de investigação foi previamente aprovado pela Organização Responsável pelo Bem-Estar dos Animais da Faculdade de Medicina e Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra (ORBEA e FMUC/CNC, Coimbra, Portugal) e foi realizado em conformidade com a directiva 86/609/CEE da Comunidade Europeia para o cuidado e uso de animais de laboratório. Os investigadores que manipularam os animais receberam formação adequada, através do curso certificado FELASA, e certificação das autoridades portuguesas, através da Direcção Geral de Veterinária de Lisboa, Portugal.

As imagens de RM foram adquiridas num equipamento de Ressonância Magnética supercondutor para pequenos animais, 9,4 T de intensidade (Bruker - BioSpec 94/20 USR), cujas características técnicas se encontram listada na Tabela II.1. Foram ainda utilizadas uma antena de volume transmissora (86mm de diâmetro interno e 112mm de diâmetro externo) e uma antena receptora de superfície, com arranjo em quadratura (*Bruker Biospin, Ettlingen, Germany*).

Tabela II.1 – Características técnicas do equipamento de RM Bruker - BioSpec 94/20 USR (Adaptado de: <https://www.bruker.com/products/mr/preclinical-mri/biospec/technical-details.html> (III)).

Equipamento de RM	
Intensidade do campo	9,4 T
Dimensões do equipamento	Comprimento: 1,49 m
	Diâmetro: 1,652 m
Campo marginal (5G)	± 3 m (axial) / ± 2 m (radial)
Diâmetro do bore	200 mm
Sistema de gradientes	<i>Shielding</i> activo
<i>Shimming</i>	Integrado de segunda ordem
Amplitude do gradiente	440 mT/m
<i>Slew Rate</i> máxima	3440 T/m/s
Linearidade	80/50 mm DSV: < ± 4,5%, < ± 1,0%
Sistema de arrefecimento	Água (sistema de gradientes)
	Hélio (magneto principal)

Os animais, instalados no biotério do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra, foram obtidos através do laboratório Dr. Frank LaFerla (*Department of Neurobiology and Behavior and Institute for Brain Aging and Dementia, University of California, Irvine, USA*). Foram mantidos em caixas tipo II de *Makrolon*, com sistema de ventilação (*VentiRack Bioscreen™*) num ambiente com temperatura controlada (22 a 24° C), com humidade relativa de 45 a 65% e com ciclos de 12/12 horas de luz/escuro, tendo sido fornecidas comida ((4RF25-GLP *Mucedola, SRL, Settimo Milanese, Italy*) e água *ad libitum*.

A recolha de dados teve a duração de cerca de 25 meses (8 de Outubro de 2015 a 7 de Novembro de 2017), tendo sido analisados 16 animais do género masculino, 8 de controlo (WT: C57BL6/129 sv, Não-Tg) e 8 animais transgénicos (TG: 3×Tg-AD) (Figura II.1), aos 4, 8, 12 e 16 meses de idade.



Figura II.1 – Ratinho transgénico (3×Tg-AD) (Adaptado de: <https://www.jax.org/strain/004807> (IV)).

Para realização deste estudo, os animais foram anestesiados por inalação, inicialmente durante cerca de 4 minutos, com Isoflurano 1000mg/g (*Iso Vet²*) a 4%,

² Líquido para inalação por vaporização, para indução e manutenção de anestesia geral.

misturado com oxigênio, e entre 1 e 2% continuamente no decorrer da aquisição, através do equipamento E-Z SA800, *Euthanex, Palmer, USA*.

Posteriormente, sobre uma plataforma, colocou-se o animal em decúbito ventral, *head first* (Figura II.2), adaptaram-se os sistema de sedação e de monitorização de parâmetros vitais (equipamento 1030, *SA Instruments Inc., Stony Brook, NY, USA*), de forma a manter a temperatura corporal e a frequência respiratória dentro dos intervalos $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e 40 a 60 resp/min. A manutenção da temperatura foi feita colocando-se sobre o animal um cobertor de aquecimento, acoplado a tubos de circulação de água cuja temperatura poderia ser ajustada pelo operador, a partir da sala de controlo, no decorrer do exame através de um sistema de banho de água quente (*Haake SC 100, Thermo Scientific, USA*).

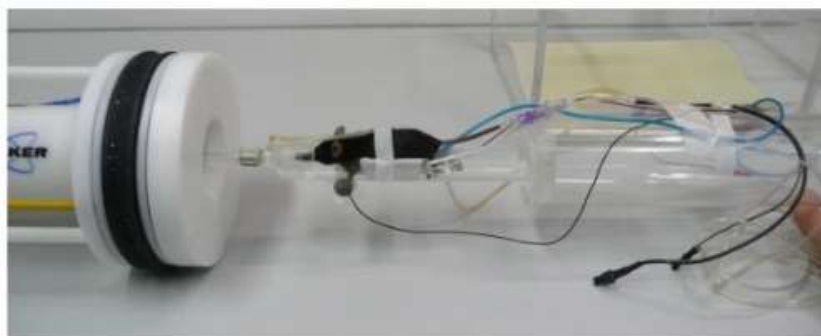


Figura II.2 – Exemplo de posicionamento do ratinho (Adaptado de: https://www.researchgate.net/figure/MRI-equipment-Mouse-prepared-for-MRI-scan-monitoring-the-vital-parameters-breathing_fig1_49793597 (V)).

Foram adquiridas várias imagens utilizando sequências específicas, nomeadamente uma sequência T2-TurboRARE para aquisição de imagens anatómicas, e sequências dinâmicas de perfusão (2D DCE-FLASH), cujos parâmetros técnicos se encontram listados na Tabela II.2.

Para a realização das sequências DCE, foi administrado manualmente, na cavidade intra-peritoneal e ao longo de cerca de 10 s, um contraste à base de Gadolínio - *Gadovist* 1,0 mmol/ml (6 μ L/gr) e foram adquiridas imagens de DCE do volume, ao longo de 1 h 23 min 18 s 746 ms, antes, durante e após a administração desse agente de contraste, num total de 40 aquisições dinâmicas.

Tabela II.2 – Protocolo de aquisição – Cortesia ICNAS

Protocolo de Aquisição		
Sequências	Parâmetros Técnicos	
Imagem anatômica - T2_TurboRARE	TR	3800,0 ms
	TE	33,00 ms
	ETL	8
	FA	90° - 180°
	FOV	20 × 20 mm
	Matriz	78 × 78 µm
	Espessura de Corte	0,5 mm
	NEX	5
	ESP (<i>Echo Spacing</i>)	11,0 ms
	Plano de aquisição	Coronal
	Tempo aquisição	10 m 8 s 0 ms
	2D DCE_FLASH	TR
TE		2,5 ms
FA		70°
FOV		20 × 20 mm
Matriz		128 × 235 µm
Número de cortes		24
NEX		7
Espessura de corte		0,5 mm
Plano de aquisição		Coronal
Tempo aquisição		1 h 23 m 18 s 746 ms
Tempo entre aquisições dinâmicas (correspondente a uma unidade de tempo)		2 m 4 s 968 ms
Total de dinâmicas		40
Nº de imagens pré-contraste		8

De seguida foram delimitadas manualmente ROIs (MRICron – versão de 1 de Junho de 2015), conforme exemplificado na Figura II.3, de forma a incluir os voxels correspondentes ao Córtex Visual (VC), Córtex Pré-Frontal (PFC), Hipocampo (Hip) e Córtex Estriado (Str) onde foram medidas as intensidades médias de sinal (Matlab 2013), para cada aquisição dinâmica, considerando a totalidade do volume das ROIs.

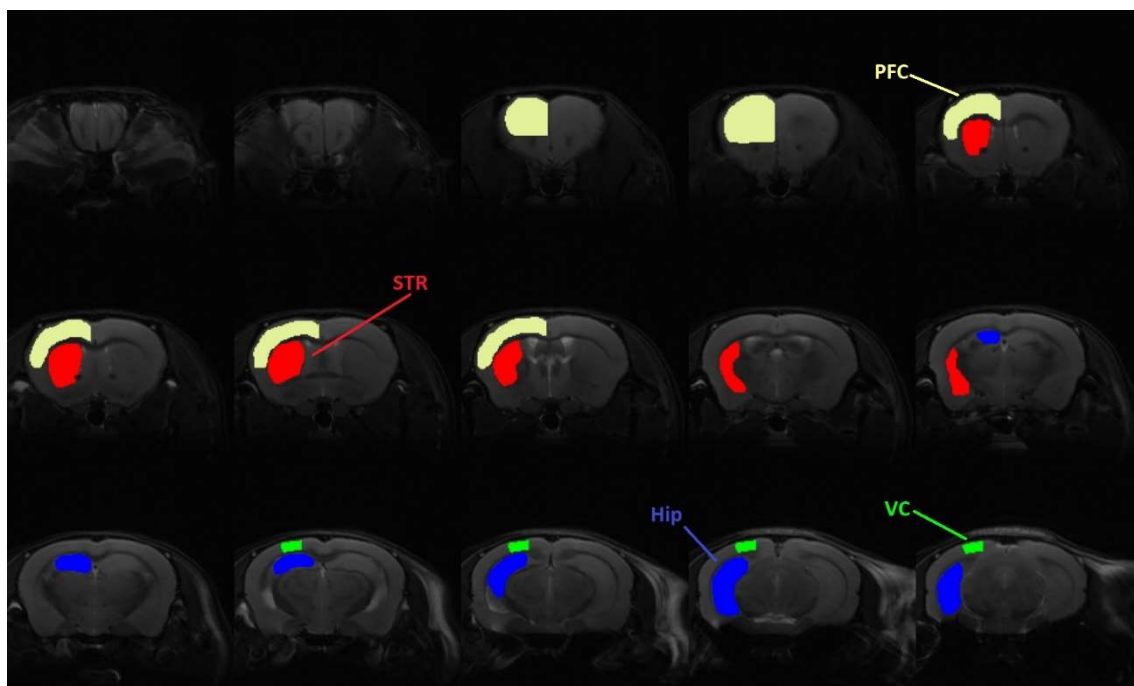


Figura II.3 – Delimitação das ROIs em imagem anatômica (T2 coronal). Amarelo - PFC; Vermelho - Str; Azul - Hip; Verde - VC.

Posteriormente calcularam-se os parâmetros de DCE (Windows - Excel 2016): Área Sob a Curva (AUC), Tempo de Pico (TTP), Amplitude do Pico (Pamp), Índice de Permeabilidade da BHE (BBBi) e o *Wash-Out* (WO) (Figura II.4).

- AUC – É o integral sob a curva de intensidade de sinal e corresponde à acumulação total do agente de contraste na ROI. Este é considerado um parâmetro robusto ao ruído e não requer um modelo matemático de base (46).
- TTP – Tempo decorrido desde o início da aquisição dinâmica até se atingir a intensidade de sinal máxima (pico de perfusão), na primeira fase de passagem do contraste, e é correspondente à actividade vascular na ROI (17).
- Pamp – Intensidade máxima de sinal obtida na ROI na primeira fase de passagem do contraste, corresponde ao pico de perfusão e é proporcional à quantidade de agente de contraste presente na ROI.
- BBBi – Parâmetro que corresponde à acumulação tardia de contraste após injeção (média da intensidade de sinal na ROI nas últimas 10 aquisições dinâmicas) , normalizada ao volume vascular (amplitude do pico de perfusão) (17). Este parâmetro corresponde ao extravasamento do agente de contraste endovenoso para o espaço intersticial da ROI (17).

- WO – Tendência para a saída/retenção do contraste na ROI, relacionada com a progressão da intensidade do sinal após atingir o seu valor de pico. Pode ser calculado como sendo o declive da linha de tendência da curva (tangente à curva) que intercepta o pico de intensidade de sinal. Decaimentos lentos correspondem a uma maior retenção do agente de contraste no espaço intersticial e conseqüentemente um maior extravasamento da BHE (17).

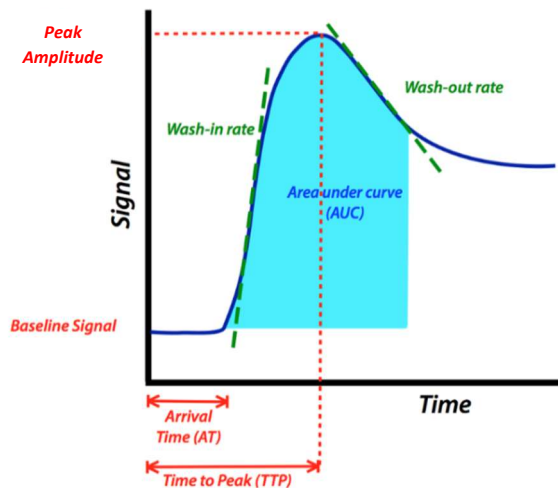


Figura II.4 – Curva padrão de perfusão (Adaptado de: <http://mriquestions.com/how-is-dce-analyzed.html> (VI)).

De modo a sumarizar, e para melhor descrever os dados, foi realizada a análise descritiva para os diferentes parâmetros de perfusão e para as várias idades, calculando a média, desvio padrão, máximo e mínimo. Foram ainda elaboradas, para cada parâmetro de perfusão e para cada ROI, as curvas de perfusão entre grupos, através de gráficos de intensidade de sinal em função do tempo.

A análise estatística foi realizada utilizando o programa *GraphPad Prism* 6.01 (*GraphPad Software, San Diego, CA, USA*). Realizou-se um Teste ANOVA medidas repetidas, para avaliar as alterações longitudinais ocorridas nas diversas ROIs nos grupos de estudo pois, apesar de a amostra não ter uma dimensão suficiente para se comprovar a normalidade dos dados, é um teste robusto para a não normalidade. Esta pode ser considerada uma limitação do estudo. Dada a não normalidade dos dados, realizou-se ainda um teste não paramétrico, Teste U de Mann-Whitney, para avaliação dos parâmetros de perfusão nas diversas ROIs, tendo sido considerado o nível de significância $p < 0,05$. Foram excluídos desta análise os dados de intensidade de sinal comprometidos por artefactos de movimento ($N_{TG}=8$ e $N_{WT}=6$). Nos casos em que o movimento ocorreu esporadicamente ao longo de uma aquisição dinâmica, foi feita uma correcção do valor da intensidade de sinal com recurso ao cálculo de uma média móvel, calculando a sua média nas imagens imediatamente antes e após o momento

em que se identificou o movimento. Foi ainda realizada uma correcção para as comparações múltiplas (p_{cor}) (*False Discovery Rate*, Matlab 2013), para confirmação do grau de significância das diferenças estatísticas encontradas.

III. Resultados

Com base nos valores da intensidade de sinal medidos em cada instante nas diversas ROIs, realizou-se uma análise descritiva dos dados, calculando as médias, desvio padrão, máximos e mínimos (ver Anexo 1) e elaboraram-se as respectivas curvas de perfusão que permitiram comparar a acumulação de contraste ao longo do tempo entre os grupos em estudo. Esta análise permitiu calcular e avaliar os parâmetros de perfusão anteriormente descritos.

Considerando a análise descritiva, verifica-se que a variabilidade intra-grupo é, para a maioria dos parâmetros analisados, menor no grupo de animais de controlo do que no grupo de animais transgénicos. Esta situação inverte com o aumento da idade dos animais, sendo aos 12 e 16 meses de idade que a variabilidade de alguns parâmetros de perfusão se torna superior no grupo de animais de controlo, principalmente nas regiões do Córtex Pré-Frontal (TTP aos 12 meses e AUC, TTP, BBBi e WO aos 16 meses), Hipocampo (AUC, TTP, Pampl e WO aos 12 e 16 meses) e Córtex Estriado (TTP, Pampl e WO aos 12 e 16 meses e AUC aos 16 meses). Este aumento da variabilidade no grupo de animais de controlo parece afectar mais os parâmetros AUC e TTP. Aos 4 e 8 meses de idade, o Córtex Visual é a região anatómica em que o grupo de animais de controlo tem sempre uma variabilidade inferior comparativamente ao grupo de animais transgénicos, independentemente do parâmetro considerado.

Mediante a análise das curvas de perfusão (DCE) (Gráfico III.1 a Gráfico III.4) verifica-se uma diferença mais acentuada nas intensidades de sinal entre os grupos nos estadios mais avançados da doença (12 e 16 meses), independentemente da ROI considerada, sendo superior no grupo de controlo comparativamente aos animais transgénicos. Para além disso, verifica-se que aos 8 meses é quando a intensidade de sinal é mais semelhante entre os grupos e, no grupo controlo, a intensidade de sinal é inferior.

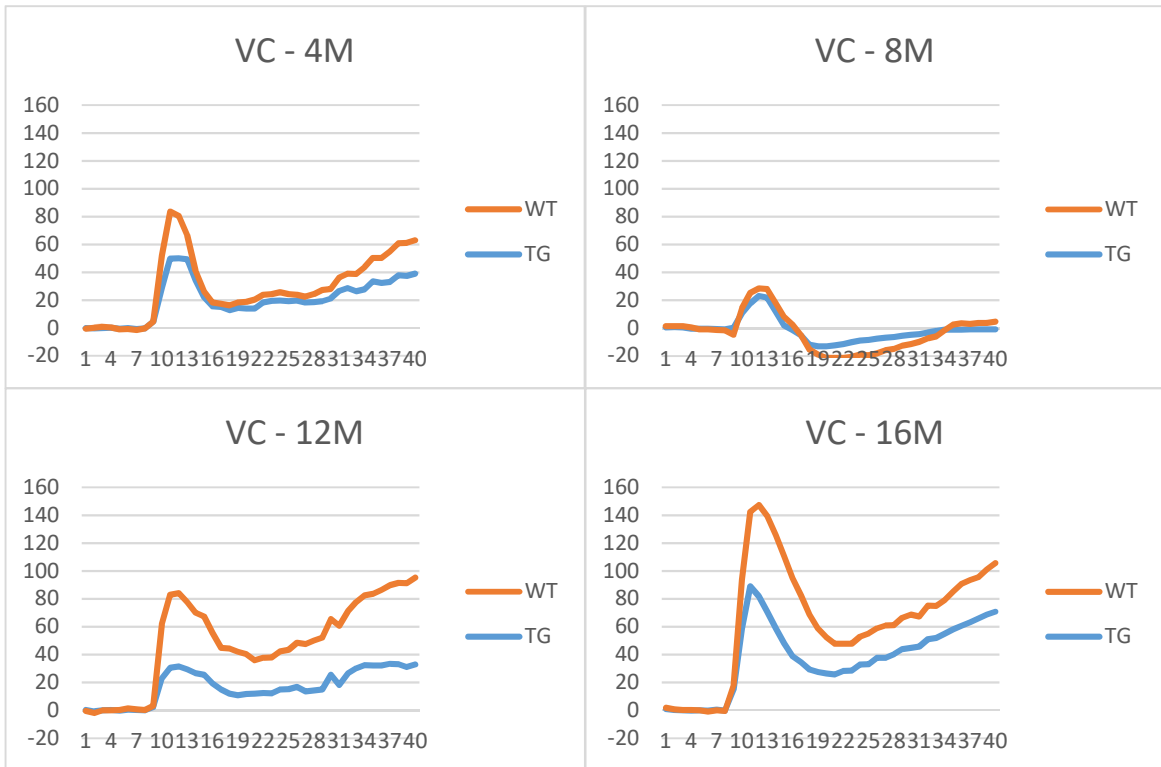


Gráfico III.1 – Gráficos DCE intensidade de sinal vs. unidades de tempo, no Córtex Visual (VC) em ratinhos transgênicos (TG) e ratinhos de controlo (WT).

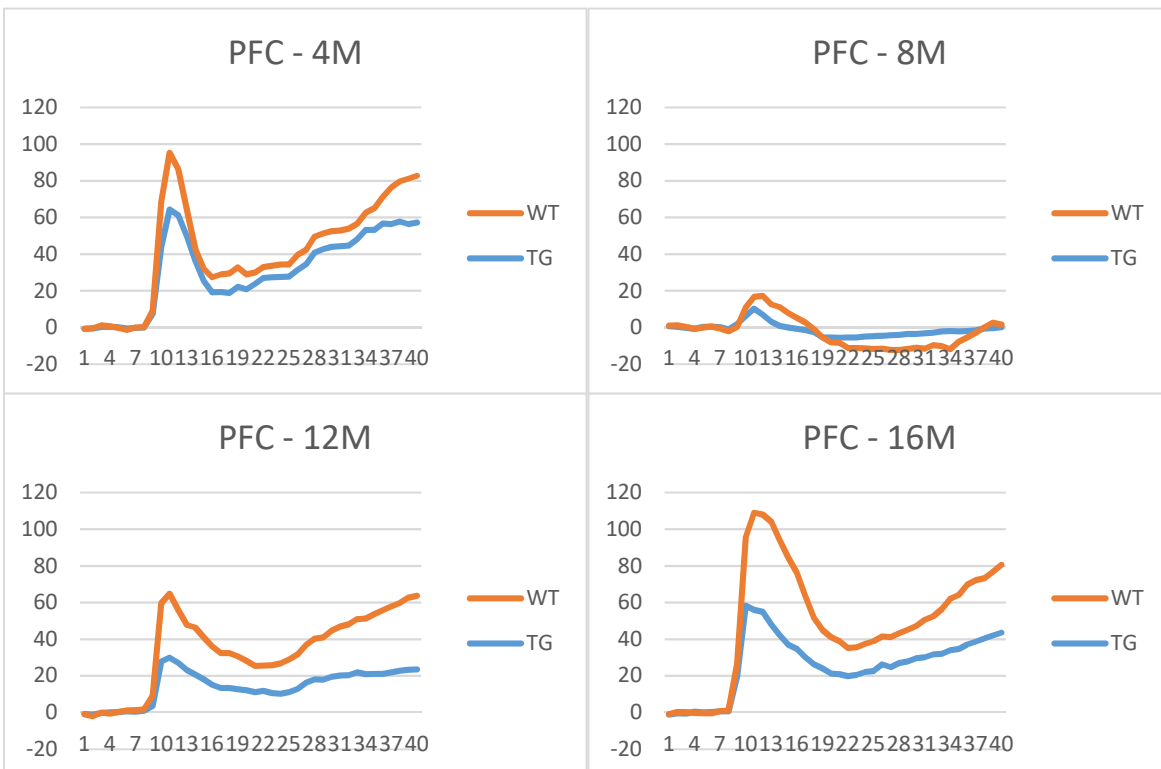


Gráfico III.2 - Gráficos DCE intensidade de sinal vs. unidades de tempo, no Córtex Pré-Frontal (PFC) em ratinhos transgênicos (TG) e ratinhos de controlo (WT).

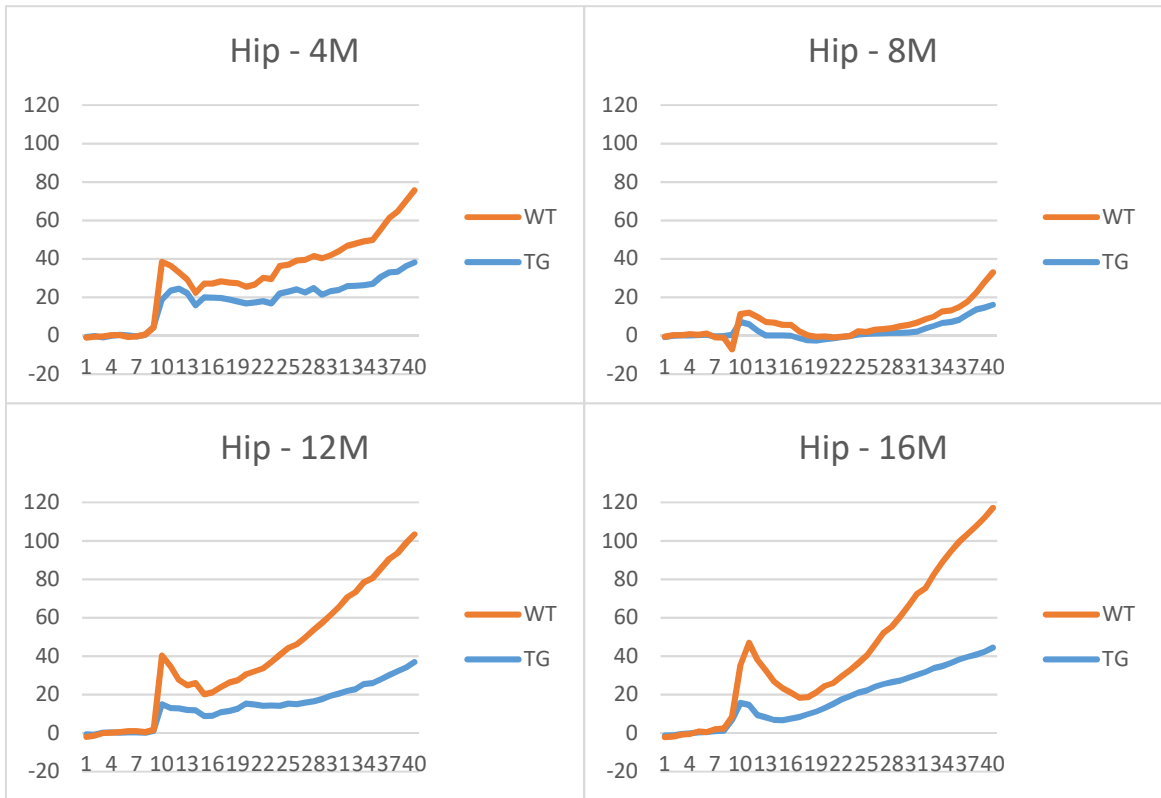


Gráfico III.3 - Gráficos DCE intensidade de sinal vs. unidades de tempo, no Hipocampo (Hip) em ratinhos transgênicos (TG) e ratinhos de controlo (WT).

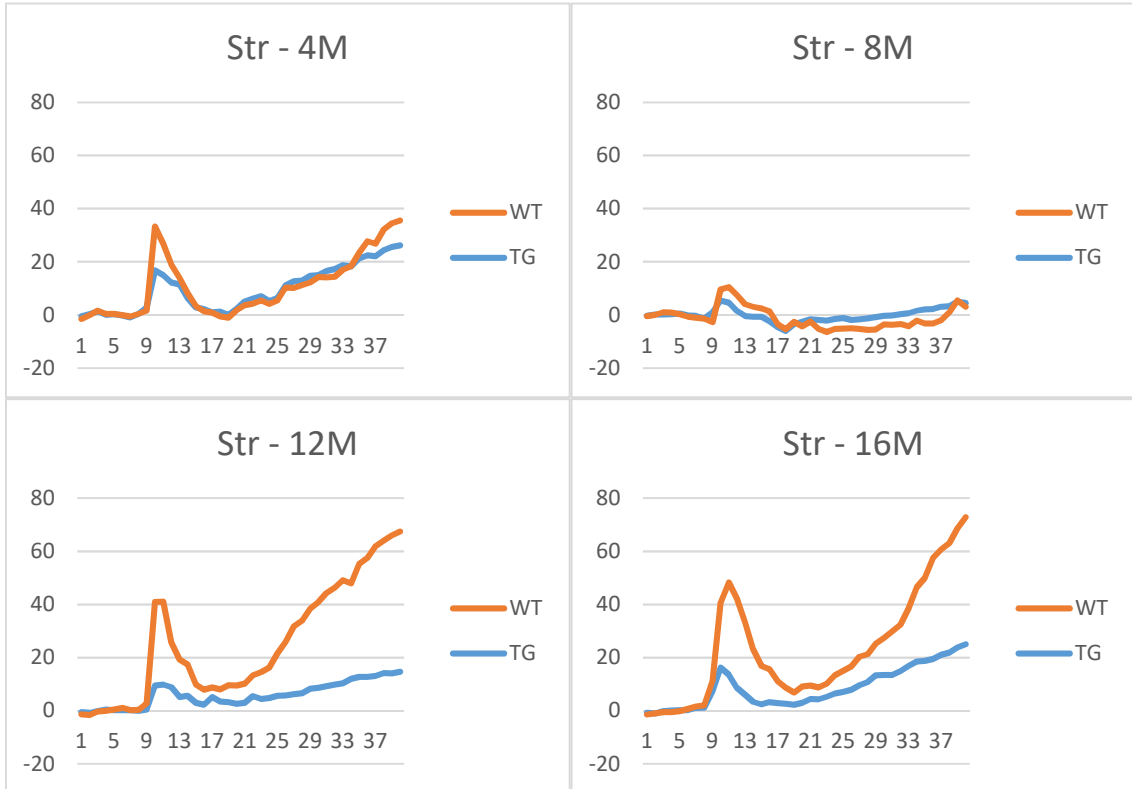


Gráfico III.4 - Gráficos DCE intensidade de sinal vs. unidades de tempo, no Córtex Estriado (Str) em ratinhos transgênicos (TG) e ratinhos de controlo (WT).

No grupo de controlo, para a análise do envelhecimento dos animais ao longo do tempo, foram identificadas tendências significativas, representando um efeito da idade, para vários parâmetros como a AUC (independentemente da região de interesse), a Pamp (VC, PFC e Str) e o BBBi (VC) (Tabela III.1). No grupo de animais transgênicos apenas se verificaram efeitos da idade no VC, nos parâmetros Pamp e BBBi (Tabela III.1).

Tabela III.1 – Resultados do Teste ANOVA para medidas repetidas, aplicado a cada um dos grupos para identificação de diferenças significativas nos diversos parâmetros mencionados, considerando o envelhecimento dos animais.

		VC		PFC		Hip		Str	
		TG	WT	TG	WT	TG	WT	TG	WT
ANOVA									
AUC	F	2,442	6,59	2,629	4,222	1,371	4,062	0,6099	3,297
	P value	0,0888	0,0028	0,0733	0,0182	0,2756	0,0209	0,6151	0,0416
	Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No	Yes
TTP	F	1,557	0,563	0,25	0,7246	0,1143	0,7294	0,4029	0,8859
	P value	0,2258	0,6457	0,8605	0,5491	0,9509	0,5465	0,7522	0,4653
	Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	No	No	No	No	No	No	No	No
Pamp	F	3,547	9,626	2,144	18,75	0,3383	2,06	0,3728	5,278
	P value	0,0295	0,0004	0,121	< 0,0001	0,7978	0,1378	0,7733	0,0076
	Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	Yes
BBBi	F	3,659	5,036	2,533	0,8654	1,232	0,9509	1,986	1,314
	P value	0,0265	0,0092	0,0809	0,4752	0,32	0,4349	0,1429	0,2976
	Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
WO	F	2,741	2,929	0,9814	1,57	1,525	5,662	1,149	5,251
	P value	0,0654	0,0587	0,418	0,2278	0,2336	0,0056	0,3496	0,0078
	Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	No	No	No	No	No	Yes	No	Yes

Relativamente à acumulação total de contraste (AUC) no período da aquisição, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre grupos. No entanto, há uma tendência para, nas idades mais precoces, os animais transgênicos apresentarem uma acumulação superior aos animais do grupo de controlo em todas as ROIs

analisadas, invertendo essa tendência nas idades mais avançadas, 12 e 16 meses, no Hipocampo e no Córtex Estriado (Gráfico III.5).

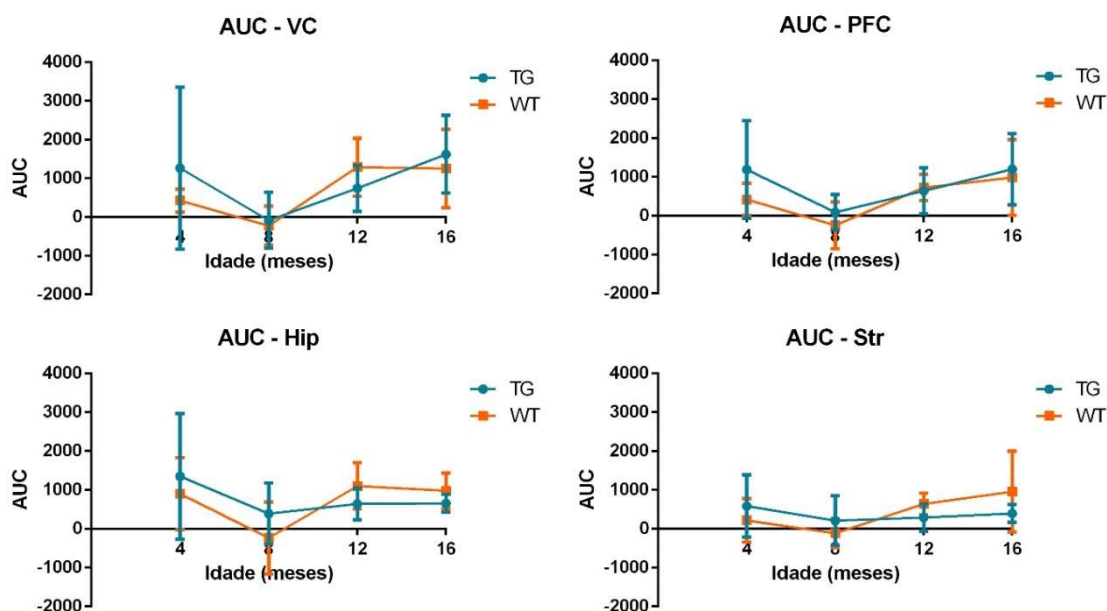


Gráfico III.5 – Gráficos AUC obtidos para as várias ROIs, para as diferentes idades dos ratinhos.

O Córtex Estriado apresenta diferenças entre grupos para os estádios mais avançados da doença (12 e 16 meses). Estas diferenças manifestam-se na amplitude do pico da curva de perfusão (12 meses: $U=5$, $p_{un}=0,0221$; 16 meses: $U=5$, $p_{un}=0,0221$), mas também no BBBi, indicador da ruptura da BHE (16 meses: $U=3$, $p_{cor}=0,0082$) (Gráfico III.6).

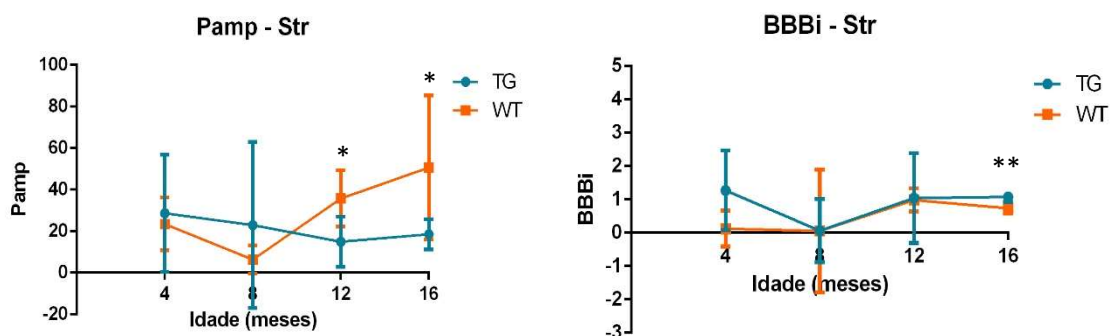


Gráfico III.6 – Gráficos Pamp (esquerda) e BBBi (direita) médios, obtidos para o Córtex Estriado, para os vários estádios da doença (* $p_{un}=0,0221$; ** $p_{cor}=0,0082$).

À semelhança do que acontece para o Córtex Estriado, também no Hipocampo se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre grupos nos estádios mais avançados da doença (12 e 16 meses). Para o estadió mais avançado (16 meses), as diferenças manifestam-se na amplitude do pico ($U=2$, $p_{cor}=0,0047$) e no BBBi ($U=1$,

$p_{\text{cor}}=0,0023$), enquanto que aos 12 meses a diferença se encontra no *Wash-Out* ($U=6,5$; $p_{\text{un}}=0,0385$) (Gráfico III.7).

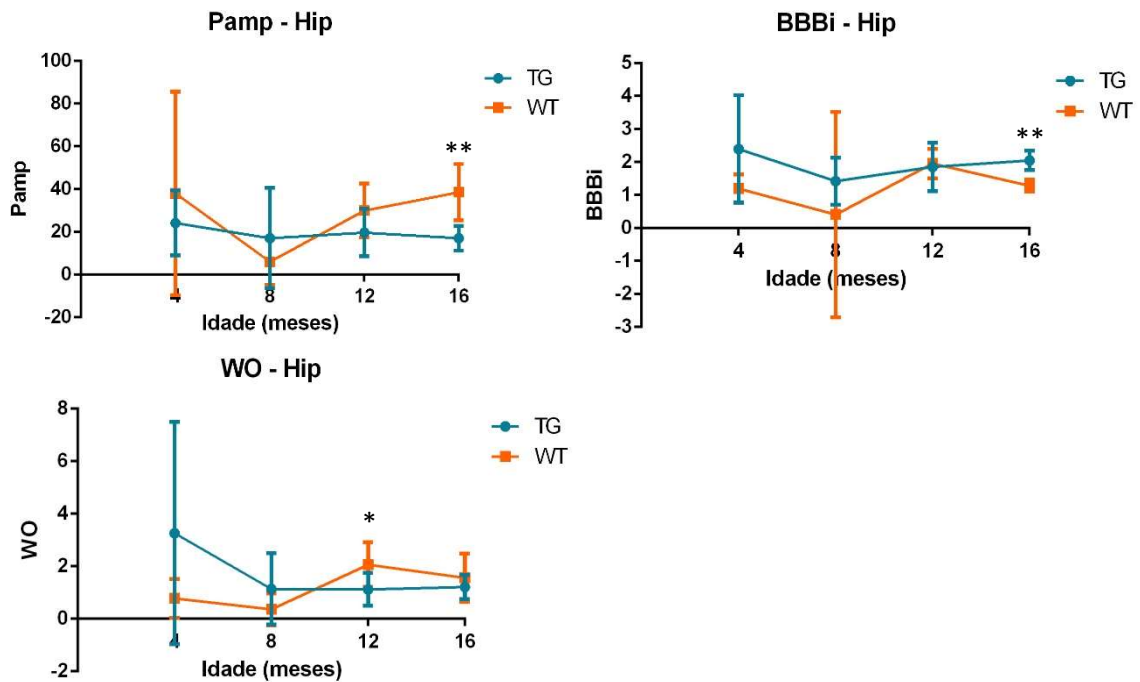


Gráfico III.7 - Gráficos Pamp (em cima, à esquerda), BBBi (em cima, à direita) e WO (em baixo) médios, obtidos para o Hipocampo, para os vários estadios da doença (* $p_{\text{un}}=0,0385$; ** $p_{\text{cor}}<0,0047$).

Não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, independentemente da idade ou do parâmetro de perfusão analisados, no Córtex Visual nem no Córtex Pré-Frontal.

IV. Discussão / Conclusão

A BHE é uma estrutura que tem uma função mediadora na passagem de água e nutrientes para o cérebro, protegendo-o da entrada de substâncias endógenas e exógenas, cujo acesso às estruturas neuronais podem causar danos, reversíveis ou não, nas suas funções (17). São várias as patologias que se sabe estarem relacionadas com alterações da permeabilidade da BHE pelo que se torna extremamente importante desenvolver métodos minimamente invasivos, como os estudos de perfusão por RM, nomeadamente com a técnica DCE, que permitem identificar e quantificar essas alterações *in vivo*, facto que se torna ainda mais relevante quando se trata de alterações subtis que podem facilmente passar despercebidas, sendo confundidas com a BHE intacta. Este tipo de situações tem vindo a ser descrito na literatura como estando presente em patologias neurodegenerativas, principalmente nos seus estadios iniciais de desenvolvimento.

Assim sendo, realizou-se um estudo longitudinal, com recurso à imagem por Ressonância Magnética com a técnica DCE, utilizando um agente de contraste à base de Gadolínio, para verificar a existência de alterações da permeabilidade da BHE em diversas áreas anatómicas (Córtex Visual, Córtex Pré-Frontal, Córtex Estriado e Hipocampo), cujas funções parecem estar afectadas na Doença de Alzheimer. Considerando a alteração na intensidade de sinal nas ROIs seleccionadas, o tempo de pico (TTP), decorrido entre a injeção do agente de contraste e o pico de perfusão, está relacionado com a função vascular nessas regiões (17), enquanto que a retenção tardia do contraste (BBBi) nessas áreas anatómicas dá indicações sobre a permeabilidade da BHE (17).

Neste estudo, pretendeu-se identificar a existência ou não de alterações na permeabilidade da BHE num modelo animal da Doença de Alzheimer e não quantificá-las, isto porque estudos mais sofisticados, envolvendo modelos cinéticos matematicamente mais complexos, são de difícil implementação. Por exemplo, a elevada concentração do agente de contraste nos vasos faz com que não seja correcto considerar simplesmente a intensidade do sinal da imagem ponderada em T1, mas sim a relaxividade T13 (r_1) (17,47). E ainda, como a maioria do Gd se acumula no plasma, maior constituinte do volume sanguíneo (cerca de 55%), deveria calcular-se o volume plasmático considerando o hematócrito de cada animal ou dados hemodinâmicos de referência da população em geral (17), parâmetro que não foi possível obter por não se considerar aceitável esta suposição face ao tipo de estudo realizado. As variabilidades intra-grupo identificadas parecem confirmar a influência do envelhecimento fisiológico normal nos vários parâmetros DCE considerados, principalmente no Hipocampo e no Córtex Estriado, dado que para estadios iniciais da doença a variabilidade é superior no grupo de animais transgénicos, facto que se vai tendencialmente invertendo nos estadios mais avançados da doença e com o envelhecimento dos animais do grupo de controlo. Este facto pode indicar que o envelhecimento normal provoca também um défice na BHE.

As diferenças nas curvas de perfusão dos grupos de estudo, para as diversas ROIs consideradas, parecem também confirmar a existência de alterações neurovasculares associadas ao envelhecimento/evolução da patologia, dado serem mais significativas aos 12 e 16 meses de idade. Estes efeitos podem, no entanto, estar apenas relacionados com o normal envelhecimento dos animais e não com aspectos relacionados com a doença provocada nos animais transgénicos.

Uma amplitude de pico (P_{amp}) inferior ($p_{un}<0,0221$), verificada no Córtex Estriado e Hipocampo dos animais transgénicos e mais evidente nos estadios mais avançados da doença (12 e 16 meses), parece sugerir um volume vascular inferior, enquanto que uma maior retenção tardia do contraste (BBBi) ($p_{cor}<0,0082$) poderá indicar um compromisso da permeabilidade da BHE. Fica assim em aberto a possibilidade de estes resultados poderem ser explicados pela redução do volume vascular nos animais transgénicos, o que também não permite um óptimo *Wash-Out* do agente de contraste.

Nas ROIs consideradas, estes efeitos parecem ser mais evidentes no Hipocampo. Esta é uma região que tem sido associada à Doença de Alzheimer pela sua

³ Alteração do tempo de relaxação em função da concentração dos quelatos de Gadolínio (47).

importância no processo de aprendizagem, gestão de *stress* e ansiedade e, acima de tudo, participação no processo de passagem das memórias de curto prazo para memórias de longo prazo (29), pelo que a existência de mais parâmetros afectados pela patologia nesta região anatómica vai ao encontro de conclusões retiradas em estudos prévios, como por exemplo o desenvolvido por Wang *et al.* (17).

Este estudo está limitado pelo facto de termos uma amostra de animais reduzida e por algumas questões técnicas associadas à aquisição e análise dos dados. Desta forma, neste projecto, levantamos algumas questões que poderão ser úteis à optimização de estudos futuros.

Note-se, por exemplo, o facto de a duração da aquisição dinâmica não ser suficientemente longa para acompanhar o *Wash-Out* do agente de contraste, uma vez que, no final da curva, a intensidade do sinal continua a aumentar em vez de decrescer como seria de esperar. Vários estudos já mencionados referem que, neste tipo de patologias, o extravasamento do contraste ocorre tão lentamente que apenas estudos com aquisição de imagem ao longo de bastante tempo conseguem detectar ligeiras alterações de concentração de contraste, caso contrário poderão facilmente ser confundidos com uma BHE normal (1,13,15,44).

Por outro lado, o envelhecimento parece ter um efeito na permeabilidade da BHE e, portanto, um estudo controlo com animais WT e mais medidas ao longo de mais tempo poderiam clarificar a progressão da permeabilidade da BHE com a idade, e desta forma talvez ajudar a perceber o porquê de aos 8 meses as diferenças entre grupos parecerem desaparecer, sendo a idade onde as intensidades de sinal são inferiores e aproximadamente as mesmas em ambos os grupos. Por outro lado, no grupo de controlo, o pico da intensidade de sinal é maior sempre aos 16 meses, independentemente da ROI mas o mesmo não se verifica nos animais transgénicos. É, assim, importante perceber como as mutações afectam a integridade da BHE e consequentemente a dinâmica do contraste. Estudos bioquímicos poderiam ajudar a clarificar alguns destes resultados.

Os resultados obtidos sugerem, portanto, uma tendência para baixa perfusão e, possivelmente, uma alteração na permeabilidade da BHE no Hipocampo e no Córtex Estriado nos animais transgénicos comparativamente aos animais de controlo, no entanto, estas conclusões estão limitadas, conforme foi discutido anteriormente.

Por se considerar que os grupos de estudo são demograficamente equivalentes, acredita-se que as diferenças relativas à dinâmica do contraste, encontradas nestes estudos de perfusão, como as amplitudes de pico, o índice de permeabilidade da BHE

ou o *Wash-Out*, são devidas a patologia neurovascular e, conseqüentemente, a alterações na permeabilidade da BHE relacionadas com a Doença de Alzheimer. Assim, as áreas anatómicas onde se identificaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram o Hipocampo, já referido em diversos estudos prévios, e o Córtex Estriado. No entanto, repetir o estudo com grupos de maiores dimensões e com aquisições dinâmicas ao longo de mais tempo, poderia aumentar o seu poder estatístico, permitir tirar mais conclusões relativamente às áreas anatómicas onde não foram encontradas diferenças entre os grupos (Córtex Visual e Córtex Pré-Frontal) ou ainda permitir identificar diferenças entre os grupos em mais parâmetros de perfusão do que os identificados.

A aplicação de modelos cinéticos mais complexos, com base nos parâmetros fisiológicos da microcirculação, que permitam não só identificar a existência de alterações da permeabilidade da BHE como também quantificá-la poderá dar resposta a algumas das questões aqui levantadas. Desta forma, a identificação das regiões anatómicas mais precocemente afectadas pelo desenvolvimento da patologia poderá ser vantajoso na escolha do modelo matemático mais adequado e permitir que a sua aplicação possa ser direccionada à região cerebral identificada, até porque alguns autores referem que as alterações vasculares antecedem a sintomatologia associada à patologia (17).

Neste sentido, também alargar o estudo a outras patologias neurodegenerativas poderá ser uma mais valia para clarificar as alterações que ocorrem na integridade da BHE tanto na presença de patologia como apenas associadas ao envelhecimento saudável.

Relativamente à pergunta de investigação proposta para este trabalho, sobre a existência de alterações na permeabilidade da BHE em patologias neurodegenerativas, mais precisamente na Doença de Alzheimer, e, em caso afirmativo, quais as regiões anatómicas mais afectadas, vários estudos recentes, mencionados anteriormente, apontam para a confirmação da existência de alterações subtis na BHE associadas a estas patologias. No entanto, e conforme já discutido, ainda são de difícil identificação e quantificação por poderem facilmente passar despercebidas quando comparadas com uma BHE intacta. Assim, o desenvolvimento deste tipo de estudos torna-se particularmente importante para que se consiga perceber a evolução destas patologias, mesmo num estadio pré-clínico, o que poderá permitir um maior controlo da sua evolução e aplicação de medidas terapêuticas mais eficientes.

V. Referências Bibliográficas

1. Taheri S, Gasparovic C, Shah NJ, Rosenberg GA. Quantitative measurement of blood-brain barrier permeability in human using dynamic contrast-enhanced MRI with fast T1 mapping. *Magn Reson Med* [Internet]. 2011 Apr;65(4):1036–42. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/mrm.22686>
2. Tabanor K, Lee P, Kiptoo P, Choi I-Y, Sherry EB, Eagle CS, et al. Brain Delivery of Drug and MRI Contrast Agent: Detection and Quantitative Determination of Brain Deposition of CPT-Glu Using LC–MS/MS and Gd-DTPA Using Magnetic Resonance Imaging. *Mol Pharm* [Internet]. 2016 Feb;13(2):379–90. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00607>
3. Samiotaki G, Konofagou EE. Dependence of the reversibility of focused-ultrasound-induced blood-brain barrier opening on pressure and pulse length in vivo. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* [Internet]. 2013 Nov;60(11):2257–65. Available from: <http://ieeexplore.ieee.org/document/6644731/>
4. Lin Y, Pan Y, Wang M, Huang X, Yin Y, Wang Y, et al. Blood–brain barrier permeability is positively correlated with cerebral microvascular perfusion in the early fluid percussion-injured brain of the rat. *Lab Invest* [Internet]. 2012 Nov 10;92(11):1623–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/labinvest.2012.118>
5. Keaney J, Campbell M. The dynamic blood – brain barrier. *FEBS J* [Internet]. 2015;282:4067–79. Available from: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/febs.13412>
6. Huang S-Y, Ko C-E, Chen G-S, Chung I-F, Yang F-Y. Focused Ultrasound Simultaneous Irradiation/MRI Imaging, and Two-Stage General Kinetic Model. Gozzi A, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014 Jun 20;9(6):e100280. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0100280>
7. Knight RA, Nagaraja TN, Ewing JR, Nagesh V, Whitton PA, Bershada E, et al. Quantitation and localization of blood-to-brain influx by magnetic resonance imaging and quantitative autoradiography in a model of transient focal ischemia. *Magn Reson Med* [Internet]. 2005 Oct;54(4):813–21. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/mrm.20629>
8. Haines DE. *Neurociência Fundamental para aplicações Básicas e Clínicas*. Third Ed. Elsevier; 2006.

9. Daneman R, Prat A. The Blood –Brain Barrier. 2015;1–23. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4292164/pdf/cshperspect-GLI-a020412.pdf>
10. Li W, Long JA, Watts LT, Jiang Z, Shen Q, Li Y, et al. A Quantitative MRI Method for Imaging Blood-Brain Barrier Leakage in Experimental Traumatic Brain Injury. Keep R, editor. PLoS One [Internet]. 2014 Dec 5;9(12):e114173. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0114173>
11. Goodnough CL, Gao Y, Li X, Qutaish MQ, Goodnough LH, Molter J, et al. Lack of dystrophin results in abnormal cerebral diffusion and perfusion in vivo. Neuroimage [Internet]. 2014 Nov;102(October 2009):809–16. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1053811914007277>
12. Lima JJP. Física em Medicina Nuclear Temas e Aplicações [Internet]. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra; 2008. Available from: <http://dx.doi.org/10.14195/978-989-26-0387-2>
13. Heye AK, Thrippleton MJ, Armitage PA, Valdés Hernández M del C, Makin SD, Glatz A, et al. Tracer kinetic modelling for DCE-MRI quantification of subtle blood–brain barrier permeability. Neuroimage [Internet]. 2016 Jan;125:446–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2015.10.018>
14. Cramer SP, Simonsen H, Frederiksen JL, Rostrup E, Larsson HBW. Abnormal blood–brain barrier permeability in normal appearing white matter in multiple sclerosis investigated by MRI. NeuroImage Clin [Internet]. 2014;4:182–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nicl.2013.12.001>
15. Barnes SR, Ng TSC, Montagne A, Law M, Zlokovic B V., Jacobs RE. Optimal acquisition and modeling parameters for accurate assessment of low K trans blood-brain barrier permeability using dynamic contrast-enhanced MRI. Magn Reson Med [Internet]. 2016 May;75(5):1967–77. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/mrm.25793>
16. Drouin-Ouellet J, Sawiak SJ, Cisbani G, Lagacé M, Kuan W-L, Saint-Pierre M, et al. Cerebrovascular and blood-brain barrier impairments in Huntington's disease: Potential implications for its pathophysiology. Ann Neurol [Internet]. 2015 Aug;78(2):160–77. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ana.24406>
17. Wang H, Golob EJ, Su M-Y. Vascular volume and blood-brain barrier permeability measured by dynamic contrast enhanced MRI in hippocampus and

- cerebellum of patients with MCI and normal controls. *J Magn Reson Imaging* [Internet]. 2006 Sep;24(3):695–700. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jmri.20669>
18. Starr JM, Farrall AJ, Armitage P, McGurn B, Wardlaw J. Blood–brain barrier permeability in Alzheimer’s disease: a case–control MRI study. *Psychiatry Res Neuroimaging* [Internet]. 2009 Mar;171(3):232–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.psychresns.2008.04.003>
 19. Mayer F, Di Pucchio A, Lacorte E, Bacigalupo I, Marzolini F, Ferrante G, et al. An Estimate of Attributable Cases of Alzheimer Disease and Vascular Dementia due to Modifiable Risk Factors: The Impact of Primary Prevention in Europe and in Italy. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra* [Internet]. 2018 Feb 21;60–71. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/487079>
 20. Cappa SF. The Quest for an Alzheimer Therapy. *Front Neurol* [Internet]. 2018 Mar 1;9(MAR):1–5. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fneur.2018.00108/full>
 21. Wang J, Gu BJ, Masters CL, Wang Y-J. A systemic view of Alzheimer disease — insights from amyloid- β metabolism beyond the brain. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2017 Sep 29;13(10):612–23. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrneurol.2017.111>
 22. Dominguez G, Maddelein M, Pucelle M, Nicaise Y, Maurage C, Duyckaerts C, et al. Neuronal sphingosine kinase 2 subcellular localization is altered in Alzheimer’s disease brain. *Acta Neuropathol Commun* [Internet]. 2018 Dec 3;6(1):25. Available from: <https://actaneurocomms.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40478-018-0527-z>
 23. Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM. Intraneuronal A β Causes the Onset of Early Alzheimer’s Disease-Related Cognitive Deficits in Transgenic Mice. *Neuron* [Internet]. 2005 Mar;45(5):675–88. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627305000784>
 24. Oddo S. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer’s disease. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2003 Dec;24(8):1063–70. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197458003002033>
 25. Pinheiro SI dos S. Efeito Do Óxido Nítrico Na Proteína Tau : Implicação Na

- Doença De Alzheimer [Internet]. Universidade da Beira Interior; 2010. Available from: <http://hdl.handle.net/10400.6/2947>
26. Welsh-Bohmer KA, White CL. Alzheimer disease: What changes in the brain cause dementia? *Neurology* [Internet]. 2009 Jan 27;72(4):e21–e21. Available from: <http://www.neurology.org/cgi/doi/10.1212/01.wnl.0000343818.11392.d9>
 27. Mason EJ, Hussey EP, Molitor RJ, Ko PC, Donahue MJ, Ally BA. Family History of Alzheimer’s Disease is Associated with Impaired Perceptual Discrimination of Novel Objects. Daffner K, editor. *J Alzheimer’s Dis* [Internet]. 2017 Apr 10;57(3):735–45. Available from: <http://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JAD-160772>
 28. Seruca TCM. Córtex Pré-Frontal, Funções Executivas e Comportamento Criminal [Internet]. ISPA - Instituto Universitário Ciências Psicológicas, Sociais e da Vida; 2013. Available from: http://repositorio.ispa.pt/bitstream/10400.12/2735/1/TES_SERU1.pdf%0A
 29. Leuner B, Gould E. Structural Plasticity and Hippocampal Function. *Annu Rev Psychol* [Internet]. 2010 Jan;61(1):111–40. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.psych.093008.100359>
 30. Báez-Mendoza R, Schultz W. The role of the striatum in social behavior. *Front Neurosci* [Internet]. 2013;7(7 DEC):1–14. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2013.00233/abstract>
 31. Seeley RR, Stephens TD, Tate P. *Anatomia e Fisiologia*. Terceira E. Lusodidacta - Sociedade Portuguesa de Material Didático, Lda.; 2001.
 32. Kumar A, Singh A, Ekavali. A review on Alzheimer’s disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacol Reports* [Internet]. 2015 Apr;67(2):195–203. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2014.09.004>
 33. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, et al. Triple-Transgenic Model of Alzheimer’s Disease with Plaques and Tangles. *Neuron* [Internet]. 2003 Jul;39(3):409–21. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627303004343>
 34. Denic A, Macura SI, Mishra P, Gamez JD, Rodriguez M, Pirko I. MRI in Rodent Models of Brain Disorders. *Neurotherapeutics* [Internet]. 2011 Jan 6;8(1):3–18.

Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13311-010-0002-4>

35. Bernstein MA, King KF, Zhou XJ. Handbook of MRI Pulse Sequences. Elsevier Academic Press; 2004.
36. Weishaupt D, Köchli VD, Marincek B. How does MRI work An Introduction to the Physics and Function of Magnetic Resonance Imaging. Second Ed. Heidelberg UH, editor. Springer Berlin Heidelberg; 2007.
37. Westbrook C. Handbook of MRI Technique. Second Ed. Blackwell Science; 1999.
38. Weishaupt D, Kochli VD, Marincek B, Kim EE. How Does MRI Work? An Introduction to the Physics and Function of Magnetic Resonance Imaging. J Nucl Med [Internet]. Second Ed. 2007 Nov 1;48(11):1910–1910. Available from: <http://jnm.snmjournals.org/cgi/doi/10.2967/jnumed.107.045104>
39. Singh A, Haris M, Rathore D, Purwar A, Sarma M, Bayu G, et al. Quantification of physiological and hemodynamic indices using T1 dynamic contrast-enhanced MRI in intracranial mass lesions. J Magn Reson Imaging [Internet]. 2007 Oct;26(4):871–80. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jmri.21080>
40. Schellenberg AE, Buist R, Yong VW, Del Bigio MR, Peeling J. Magnetic resonance imaging of blood–spinal cord barrier disruption in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. Magn Reson Med [Internet]. 2007 Aug;58(2):298–305. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/mrm.21289>
41. Sourbron S, Ingrisch M, Siefert A, Reiser M, Herrmann K. Quantification of cerebral blood flow, cerebral blood volume, and blood-brain-barrier leakage with DCE-MRI. Magn Reson Med [Internet]. 2009 Jul;62(1):205–17. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/mrm.22005>
42. Sourbron SP, Buckley DL. Tracer kinetic modelling in MRI: estimating perfusion and capillary permeability. Phys Med Biol [Internet]. 2012 Jan 21;57(2):R1–33. Available from: <http://stacks.iop.org/0031-9155/57/i=2/a=R1?key=crossref.d84ba3ad7b47936a6050433f387d6ebc>
43. Sourbron SP, Buckley DL. Classic models for dynamic contrast-enhanced MRI. NMR Biomed [Internet]. 2013 Aug;26(8):1004–27. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/nbm.2940>
44. Sourbron S. Technical aspects of MR perfusion. Eur J Radiol [Internet]. 2010 Dec;76(3):304–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejrad.2010.02.017>

45. Leigh R, Jen SS, Varma DD, Hillis AE, Barker PB. Arrival Time Correction for Dynamic Susceptibility Contrast MR Permeability Imaging in Stroke Patients. Herholz K, editor. PLoS One [Internet]. 2012 Dec 20;7(12):e52656. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0052656>
46. Cuenod CA, Balvay D. Perfusion and vascular permeability: Basic concepts and measurement in DCE-CT and DCE-MRI. Diagn Interv Imaging [Internet]. 2013;94(12):1187–204. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diii.2013.10.010>
47. Shen Y, Goerner FL, Snyder C, Morelli JN, Hao D, Hu D, et al. T1 Relaxivities of Gadolinium-Based Magnetic Resonance Contrast Agents in Human Whole Blood at 1.5, 3, and 7 T. Zurich Open Repos Arch [Internet]. 2015; Available from: <https://doi.org/10.5167/uzh-109077>
48. Heye AK, Culling RD, Valdés Hernández M del C, Thrippleton MJ, Wardlaw JM. Assessment of blood–brain barrier disruption using dynamic contrast-enhanced MRI. A systematic review. NeuroImage Clin [Internet]. 2014;6:262–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nicl.2014.09.002>

VI. Webgrafia

- I. <http://www.magnetic-resonance.org/ch/08-02.html> , consultado em 14/02/2018.
- II. <http://mriquestions.com/spoiling---what-and-how.html> , consultado em 14/02/2018.
- III. <https://www.bruker.com/products/mr/preclinical-mri/biospec/technical-details.html> , consultado em 28/03/2018.
- IV. <https://www.jax.org/strain/004807> , consultado a 12/04/2018.
- V. https://www.researchgate.net/figure/MRI-equipment-Mouse-prepared-for-MRI-scan-monitoring-the-vital-parameters-breathing_fig1_49793597 , consultado a 11/04/2018.
- VI. <http://mriquestions.com/how-is-dce-analyzed.html> , consultado em 14/03/2018.

VII. Anexo 1 – Estatística descritiva

			4m				
			AUC	TTP	Pampl	BBBi	WO
VC	WT	Média	425,03	13	40,27	0,32	-0,23
		DP	265,86	1,37	10,55	0,27	0,83
		Máximo	698,45	15	56,42	0,79	0,61
		Mínimo	-123,32	11	27,24	-0,01	-1,93
	TG	Média	1268,42	13	49,39	0,78	1,52
		DP	1939,50	1,40	51,35	0,52	2,63
		Máximo	5942,42	15	165,95	1,84	7,61
		Mínimo	32,59	11	11,48	0,26	-1,29
PFC	WT	Média	424,91	12	32,41	0,50	-0,47
		DP	375,95	1,34	11,34	0,25	1,26
		Máximo	1049,10	14	50,72	0,94	0,56
		Mínimo	7,55	11	19,41	0,13	-2,91
	TG	Média	1193,72	12	53,18	0,84	1,30
		DP	1166,57	1,16	31,35	0,68	3,51
		Máximo	3798,44	14	117,70	2,40	8,91
		Mínimo	12,01	11	15,37	0,38	-2,07
Hip	WT	Média	904,16	12	38,05	1,19	0,78
		DP	840,64	1,41	43,44	0,39	0,68
		Máximo	2775,98	14	135,00	1,72	2,11
		Mínimo	430,98	11	15,94	0,60	-0,15
	TG	Média	1351,33	12	24,18	2,40	3,26
		DP	1496,74	1,16	14,09	1,50	3,92
		Máximo	4831,53	14	57,23	5,02	11,67
		Mínimo	186,70	11	10,73	0,90	0,20
Str	WT	Média	219,55	12	23,49	0,13	-0,05
		DP	507,26	1,21	11,65	0,49	0,29
		Máximo	1291,52	14	47,52	0,77	0,34
		Mínimo	-185,99	11	13,17	-0,50	-0,53
	TG	Média	588,93	12	28,61	1,27	1,54
		DP	738,91	1,16	26,08	1,11	2,19
		Máximo	2147,55	14	87,76	2,98	5,63
		Mínimo	-181,47	11	9,77	-0,28	-0,23

			8m				
			AUC	TTP	Pampl	BBBi	WO
VC	WT	Média	-221,35	13	13,05	-0,49	-0,17
		DP	454,84	1,57	12,83	1,03	0,64
		Máximo	158,62	15	37,31	0,80	1,15
		Mínimo	-1137,50	11	-3,76	-2,34	-0,85
	TG	Média	-81,45	12	34,49	-1,48	-0,82
		DP	668,47	0,73	37,81	2,49	1,24
		Máximo	919,33	14	120,57	0,69	0,17
		Mínimo	-1224,84	12	1,28	-6,88	-3,73
PFC	WT	Média	-243,05	13	9,63	-0,83	-0,39
		DP	552,19	1,49	8,84	3,41	0,54
		Máximo	288,84	15	23,46	2,74	0,13
		Mínimo	-1224,94	11	-6,18	-7,93	-1,21
	TG	Média	90,32	12	23,76	-0,43	-0,17
		DP	421,00	0,83	26,84	0,86	0,31
		Máximo	745,92	13	84,00	0,73	0,24
		Mínimo	-394,79	11	3,90	-2,10	-0,82
Hip	WT	Média	-231,31	12	6,04	0,41	0,36
		DP	844,45	1,15	9,84	2,84	0,56
		Máximo	640,50	14	17,57	2,82	1,05
		Mínimo	-1718,79	11	-14,10	-5,72	-0,50
	TG	Média	393,97	12	17,06	1,42	1,14
		DP	729,77	0,88	21,75	0,66	1,26
		Máximo	2022,27	13	68,49	2,42	4,05
		Mínimo	-232,54	11	0,94	0,54	0,09
Str	WT	Média	-114,89	12	6,37	0,06	-0,14
		DP	346,20	1,46	6,24	1,68	0,34
		Máximo	323,53	15	11,81	2,36	0,21
		Mínimo	-616,83	11	-6,52	-2,92	-0,73
	TG	Média	213,13	12	22,96	0,06	0,49
		DP	586,17	0,90	37,06	0,87	0,86
		Máximo	1542,71	13	112,21	0,88	2,53
		Mínimo	-379,63	11	1,65	-1,84	-0,03

			12m				
			AUC	TTP	Pampl	BBBi	WO
VC	WT	Média	1294,75	13	62,28	0,83	0,87
		DP	684,63	1,77	25,29	0,22	0,93
		Máximo	2283,70	17	96,91	1,12	2,64
		Mínimo	406,63	12	29,29	0,41	-0,53
	TG	Média	746,84	14	51,63	0,45	-0,68
		DP	551,89	1,05	33,47	0,68	1,27
		Máximo	1500,19	15	118,92	1,46	1,09
		Mínimo	-224,09	12	18,31	-0,67	-3,37
PFC	WT	Média	727,58	13	36,86	0,79	0,42
		DP	311,95	1,61	4,80	0,31	0,62
		Máximo	1165,46	16	43,80	1,14	0,99
		Mínimo	343,88	11	31,44	0,18	-0,91
	TG	Média	642,59	13	36,76	0,41	-0,28
		DP	552,70	1,40	30,54	1,27	1,23
		Máximo	1488,52	15	99,33	1,93	1,03
		Mínimo	-303,04	11	4,05	-2,41	-3,14
Hip	WT	Média	1104,25	12	29,99	1,95	2,06
		DP	543,83	1,77	11,54	0,41	0,77
		Máximo	1994,47	16	49,53	2,41	3,06
		Mínimo	524,48	11	16,66	1,12	0,69
	TG	Média	643,35	12	19,69	1,86	1,12
		DP	380,07	1,03	10,30	0,68	0,58
		Máximo	1322,11	14	38,99	2,83	1,89
		Mínimo	34,50	11	6,18	0,95	0,24
Str	WT	Média	642,95	12	35,76	0,99	1,22
		DP	257,30	1,77	12,43	0,32	1,02
		Máximo	983,49	16	56,82	1,24	3,06
		Mínimo	254,27	11	19,16	0,29	-0,31
	TG	Média	293,28	12	14,98	1,04	0,45
		DP	322,95	1,55	11,19	1,24	0,45
		Máximo	946,54	15	41,16	3,91	1,26
		Mínimo	-191,37	11	4,32	-0,24	-0,24

			16m				
			AUC	TTP	Pampl	BBBi	WO
VC	WT	Média	1256,76	14	75,14	0,46	-0,61
		DP	927,29	2,24	24,96	0,21	0,89
		Máximo	3177,62	18	122,33	0,83	0,76
		Mínimo	178,78	11	38,22	0,26	-1,69
	TG	Média	1620,86	12	121,97	0,44	-0,83
		DP	930,03	1,05	71,99	0,13	1,23
		Máximo	2696,75	15	231,31	0,63	0,42
		Mínimo	336,61	12	37,43	0,32	-2,89
PFC	WT	Média	988,72	14	69,28	0,39	-0,60
		DP	889,89	2,21	20,36	0,30	0,65
		Máximo	2732,97	17	104,59	0,85	0,43
		Mínimo	-59,96	11	41,11	0,00	-1,62
	TG	Média	1202,51	12	72,14	0,55	-0,19
		DP	851,66	1,31	47,59	0,09	0,36
		Máximo	3079,66	15	183,10	0,68	0,25
		Mínimo	232,89	11	22,72	0,44	-0,64
Hip	WT	Média	981,72	13	38,60	1,28	1,57
		DP	417,27	2,21	12,11	0,16	0,84
		Máximo	1467,84	17	53,00	1,58	2,84
		Mínimo	314,61	11	19,04	1,12	0,75
	TG	Média	657,49	11	17,02	2,05	1,21
		DP	214,09	1,05	5,32	0,27	0,42
		Máximo	920,65	14	23,75	2,36	1,89
		Mínimo	297,08	11	7,75	1,50	0,61
Str	WT	Média	958,69	14	50,62	0,74	0,47
		DP	950,47	2,36	31,69	0,15	0,50
		Máximo	2970,89	17	112,16	0,93	1,07
		Mínimo	178,00	11	16,81	0,53	-0,41
	TG	Média	399,25	11	18,55	1,08	0,54
		DP	213,03	1,05	6,80	0,15	0,17
		Máximo	898,22	14	33,15	1,26	0,78
		Mínimo	205,36	11	9,51	0,79	0,31