

Quantificação da Área de Infarto usando-se SPECT de Perfusão Miocárdica de Alta Resolução em Ratos

Myocardial Infarction Area Quantification using High-Resolution SPECT Images in Rats

Luciano Fonseca Lemos de Oliveira¹, Jorge Mejia², Eduardo Elias Vieira de Carvalho¹, Renata Maria Lataro¹, Sarita Nasbine Frassetto¹, Rubens Fazan Jr.³, Hélio Cesar Salgado³, Orfa Yineth Galvis-Alonso², Marcus Vinícius Simões¹
Divisão de Cardiologia, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo¹, Ribeirão Preto, SP; Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto², São José do Rio Preto, SP; Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo³, Ribeirão Preto, SP – Brasil

Resumo

Fundamento: Técnicas de imageamento *in vivo* permitem avaliar sequencialmente a morfologia e a função dos órgãos em diversos modelos experimentais. Desenvolvemos um dispositivo de adaptação de uma gama-câmara clínica para obter imagens tomográficas por emissão de fótons singulares (SPECT) de alta resolução, baseado em colimador pinhole.

Objetivo: Determinar a acurácia desse sistema na quantificação da área de infarto miocárdico em ratos.

Métodos: Treze ratos Wistar machos (250 g) foram submetidos a infarto do miocárdio por oclusão da artéria coronária esquerda. Após 4 semanas, foram adquiridas imagens tomográficas com o sistema desenvolvido, 1,5 hora após a injeção endovenosa de 555MBq de ^{99m}Tc-Sestamibi. Na reconstrução tomográfica, utilizamos *software* especialmente desenvolvido baseado no algoritmo de Máxima Verossimilhança. Comparamos as médias e analisamos a correlação entre a extensão dos defeitos perfusionais detectados pela cintilografia e a extensão da fibrose miocárdica avaliada pela histologia.

Resultados: As imagens apresentaram ótima relação órgão-alvo/fundo, com apropriada visualização das paredes e da cavidade do ventrículo esquerdo. Todos os animais exibindo áreas de infarto foram corretamente identificados pelas imagens de perfusão. Não houve diferença entre a área do infarto medida pelo SPECT (21,1 ± 21,2%) e pela histologia (21,7 ± 22,0%; $p = 0,45$), obtendo forte correlação entre os valores da área de infarto mensurada pelos dois métodos ($r = 0,99$; $p < 0,0001$).

Conclusão: O sistema desenvolvido apresentou resolução espacial adequada e elevada acurácia para detecção e quantificação das áreas de infarto miocárdico, sendo uma opção de baixo custo e grande versatilidade na obtenção de imagens em SPECT de alta resolução de órgãos de pequenos roedores. (Arq Bras Cardiol. 2013;101(1):59-67)

Palavras-chave: Infarto do Miocárdio, Ratos, Tomografia Computadorizada de Emissão, Epidemiologia Experimental.

Abstract

Background: Imaging techniques enable *in vivo* sequential assessment of the morphology and function of animal organs in experimental models. We developed a device for high-resolution single photon emission computed tomography (SPECT) imaging based on an adapted pinhole collimator.

Objective: To determine the accuracy of this system for quantification of myocardial infarct area in rats.

Methods: Thirteen male Wistar rats (250 g) underwent experimental myocardial infarction by occlusion of the left coronary artery. After 4 weeks, SPECT images were acquired 1.5 hours after intravenous injection of 555 MBq of ^{99m}Tc-Sestamibi. The tomographic reconstruction was performed by using specially developed software based on the Maximum Likelihood algorithm. The analysis of the data included the correlation between the area of perfusion defects detected by scintigraphy and extent of myocardial fibrosis assessed by histology.

Results: The images showed a high target organ/background ratio with adequate visualization of the left ventricular walls and cavity. All animals presenting infarction areas were correctly identified by the perfusion images. There was no difference of the infarct area as measured by SPECT (21.1 ± 21.2%) and by histology (21.7 ± 22.0%; $p=0.45$). There was a strong correlation between individual values of the area of infarction measured by these two methods.

Conclusion: The developed system presented adequate spatial resolution and high accuracy for the detection and quantification of myocardial infarction areas, consisting in a low cost and versatile option for high-resolution SPECT imaging of small rodents. (Arq Bras Cardiol. 2013;101(1):59-67)

Keywords: Myocardial Infarction; Rats; Tomography, Emission-Computed.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Marcus Vinícius Simões •

Divisão de Cardiologia - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Av. Bandeirantes 3900 - CEP: 14048-900 - Ribeirão Preto - São Paulo

Email: msimoes@fmrp.usp.br

Artigo recebido em 1/9/12, revisado em 17/9/12, aceito em 6/3/13.

DOI: 10.5935/abc.20130110

Introdução

Nas últimas décadas, animais de laboratório tornaram-se importante ferramenta em pesquisas pré-clínicas¹. Em cardiologia, pequenos animais têm sido usados com sucesso para reprodução de diversos modelos de cardiopatias e seus resultados têm permitido o estudo de novas drogas, assim como os estudos dos mecanismos fisiopatológicos de doenças cardíacas²⁻⁵.

Na exploração desses modelos animais, apesar de muitas variáveis experimentais poderem ser avaliadas *in vivo*, na maioria dos casos o animal deve ser sacrificado e o órgão de interesse deve ser excisado e processado para obtenção dos resultados. Esse processo elimina a possibilidade de avaliações múltiplas ao longo do tempo. Entretanto, o desenvolvimento recente de técnicas para a aquisição de imagens *in vivo* em pequenos animais passou a permitir a avaliação sequencial da estrutura e da função de órgãos de forma não invasiva, com economia de tempo, número de animais e redução de custos.

Os equipamentos de uso clínico, baseados na ultrassonografia e na ressonância nuclear magnética, exibem sensibilidade e resolução espacial suficientes para obtenção de imagens de órgãos de pequenos animais, que são, em média, 10 a 30 vezes menores em dimensões lineares do que os órgãos de seres humanos. Contudo, os equipamentos clínicos convencionais utilizados para obtenção de imagens cintilográficas tomográficas por emissão de fótons singulares (SPECT) fornecem uma resolução espacial em torno de 6 mm, não apropriada para órgãos de pequenos animais, cuja resolução espacial necessária é em torno de 1 mm.

Nosso grupo de pesquisa recentemente descreveu a implementação de um sistema de aquisição de imagens de SPECT de alta resolução baseado em um colimador pinhole (único orifício), um sistema rotacional de suporte do pequeno animal e ferramentas de *software* apropriadas adaptadas a uma gama-câmara de uso clínico^{6,7}. O objetivo do presente estudo foi validar esse sistema para quantificação *in vivo* da área de fibrose miocárdica em modelo experimental de infarto em ratos, tendo como padrão-ouro a medida *in vitro* da área de infarto pelo estudo histopatológico.

Métodos

Construção e adaptação do sistema de aquisição de imagens tomográficas

Uma gama-câmara clínica (DST/Sopha Medical Vision, Twinsburg, Ohio, USA) foi adaptada pela construção de um sistema de blindagem que permitiu a fixação de um colimador de orifício simples, com diâmetro de 1,5 mm e ângulo de abertura total de 150°. Essa blindagem teve um formato de tronco de pirâmide recoberta com uma manta de chumbo de 6 mm de espessura, adequada para fótons com energia na faixa de 150 keV. Adicionalmente, foi desenvolvido um suporte cilíndrico para o posicionamento do animal. Esse suporte é acoplado a um sistema motorizado, que permitiu rotacionar o alvo para as diferentes posições angulares, de acordo com o número de projeções a serem registradas ao longo dos 360° da aquisição tomográfica. Sincronizada com o protocolo de aquisição dinâmico da gama-câmara, a sequência de projeções foi registrada e armazenada em formato DICOM. Na Figura 1, ilustramos o conjunto do *hardware* construído.

Implementação do software de reconstrução

Após a aquisição das projeções, as imagens gravadas foram exportadas em formato DICOM para um computador pessoal, no qual foram processadas para obtenção do modelo tridimensional da distribuição do radiofármaco no alvo⁷. Para isso, desenvolvemos um *software* de reconstruções iterativas de imagens, baseado no algoritmo de Máxima Verossimilhança⁸. Os detalhes matemáticos dos cálculos de reconstrução iterativa podem ser consultados em publicação anterior⁷. Ainda que a reconstrução iterativa seja mais lenta do que o algoritmo clássico de retroprojeção filtrada, ela produz imagens de melhor qualidade, em termos de relação sinal-ruído e resolução espacial, e permite uma melhor modelagem do processo físico envolvido durante a aquisição das imagens^{9,10}. A ferramenta foi implementada em Linguagem C, usando um compilador *freeware* Dev-C++ (Bloodshed Software). Para visualização final das reconstruções, foi utilizado o *freeware* Amide Medical Image Data Examiner¹¹.

Imagens de fantoma

A fim de verificar a resolução espacial tomográfica alcançada pelo sistema, foram adquiridas imagens de um fantoma de barras quentes. Esse fantoma consiste de quatro conjuntos de espaços cilíndricos de diferentes diâmetros (1, 2, 3 e 4 mm), preenchidos com pertecnetato de sódio, sendo a distância entre eles igual ao dobro do seu diâmetro (Figura 2A). Na aquisição das imagens do fantoma, foram utilizados os mesmos parâmetros empregados para a aquisição de imagens dos animais experimentais.

Animais experimentais

Após aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal de nossa instituição, os experimentos foram realizados com 15 ratos Wistar machos com peso inicial de 250g. Os animais foram fornecidos pelo biotério central da mesma instituição, mantidos em alojamento climatizado, com acesso livre a água e ração padrão, submetidos a ritmo de 12 horas de luz/sombra e temperatura controlada. Em todos os procedimentos, máximo esforço foi feito para evitar o sofrimento desnecessário nos animais.

Indução do infarto do miocárdio experimental

O infarto miocárdico experimental foi induzido em 13 animais pelo método descrito por Pfeffer e cols.¹², com ligeiras modificações. Dois animais foram mantidos como controles não infartados. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia ketamina (50 mg/kg, i.m., União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP, Brasil) e xilazina (10 mg/kg, i.m., HertapeCalier Saúde Animal S/A, Juatuba, MG, Brasil) e intubação orotraqueal para ventilação mecânica (Advanced Safety Ventilator, Harvard Apparatus, MA1 55-7059, Holliston, MA, USA). Assim, o coração foi exposto por uma incisão no terceiro espaço intercostal esquerdo, e o ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda foi identificado e ligado com um fio de poliéster (4-0, Ethicon, São José dos Campos, SP, Brasil). Em seguida, o tórax foi fechado e os animais levados para recuperação no Biotério do Departamento de Fisiologia de nossa instituição.

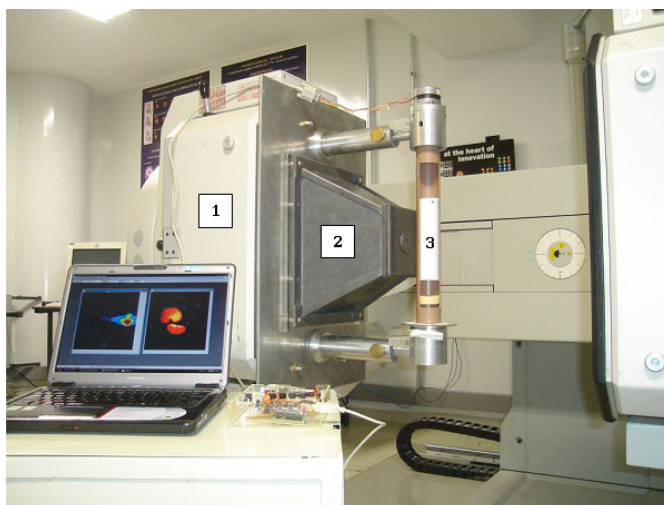


Figura 1 – Sistema posicionado em uma das duas cabeças da gama-câmara clínica Sophra/DST. Acoplado por mecanismo eletromecânico, o sistema pode ser fixado em diferentes equipamentos. Além disso, ele permite a realização de imagens de camundongos e ratos maiores, por simples alterações do sistema. (1) Detector da gama-câmara, (2) Suporte do colimador pinhole em formato de tronco de pirâmide, (3) Suporte rotacional para conter o pequeno animal durante a aquisição acoplado a motor de passo.

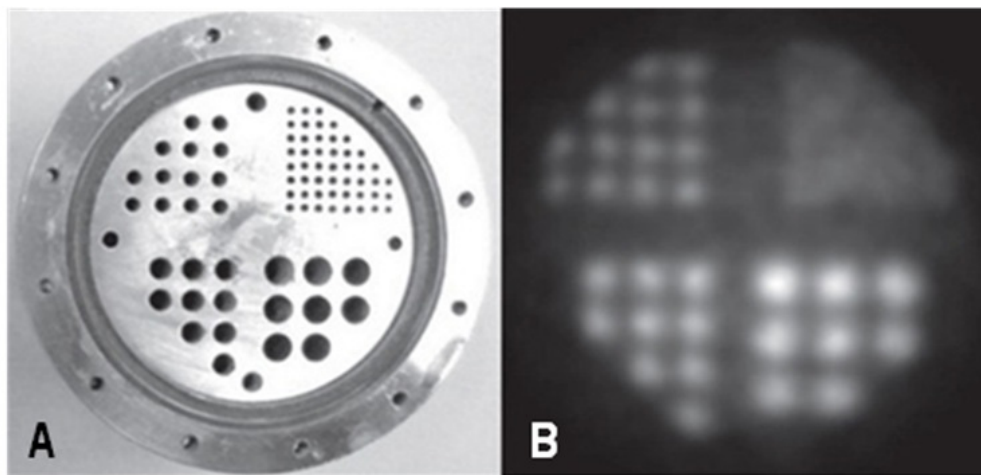


Figura 2 – (A) O fantoma micro-Jaszczak especialmente construído e utilizado no estudo. Observam-se grupos de poços cilíndricos, com diâmetro interno de 4 a 1 mm. (B) Corte tomográfico reconstruído e perpendicular ao longo eixo do fantoma. O limite da resolução espacial visual das "barras quentes" situa-se entre 2 e 1 mm.

Aquisição de imagens de perfusão miocárdica

Os animais foram submetidos aos exames de imagem 4 semanas após a indução do infarto miocárdico experimental. Para o protocolo de imagens, os animais foram anestesiados com uma combinação de ketamina e xilazina (50 e 5 mg/kg, respectivamente). Uma atividade de 555 MBq de ^{99m}Tc -Sestamibi foi injetada na veia da cauda. Uma hora e meia após a injeção, os animais foram novamente anestesiados com ketamina e xilazina (75 e 7,5 mg/kg, respectivamente) e posicionados no sistema para a aquisição de imagens.

Trinta e seis projeções, igualmente espaçadas em 360° , foram adquiridas em todos os protocolos de imagens. As projeções foram registradas em uma matriz de 128×128

elementos, cada elemento com uma área de $3,4 \text{ mm} \times 3,4 \text{ mm}$. Um fator de magnificação de 6,3X foi adotado para todos os experimentos, o que corresponde a uma dimensão lateral de elemento do volume do objeto (ou voxel) de 0,54 mm. O tempo de aquisição por projeção foi de 30 segundos, totalizando aproximadamente 21 minutos por animal.

Não se registrou mortalidade associada à realização dessas imagens na janela temporal de 4 semanas após infarto.

Processamento e análise das imagens de perfusão miocárdica

Após a reconstrução das imagens de SPECT utilizando-se algoritmo de reconstrução iterativa, a imagem foi apropriadamente

rotacionada e foram selecionados cortes tomográficos dos eixos curto, longo vertical e longo horizontal. As imagens foram normalizadas para o *pixel* miocárdico de máximo valor de captação dentro do volume e submetidas à análise visual.

Para quantificação do defeito perfusional nas imagens de SPECT, foram utilizados quatro cortes tomográficos do eixo curto em diferentes níveis da cavidade ventricular esquerda: um corte apical, dois cortes médio-ventriculares e um corte basal. Utilizando o *freeware* de processamento de imagens ImageJ, foi determinado perfil de intensidade ao longo da circunferência do miocárdio do ventrículo esquerdo (VE). As áreas de defeito perfusional foram identificadas pela presença de *pixels* com valores de captação abaixo de 50% em relação ao *pixel* de máximo acúmulo de captação no miocárdio. A extensão total do defeito perfusional miocárdico foi expresso como percentual de área do VE, sendo calculada pela razão do número total dos *pixels* com captação menor que 50% (obtidos nos quatro cortes) pelo número total de *pixels* compondo o perfil circunferencial do VE nos quatro cortes tomográficos analisados, sendo esse resultado multiplicado por cem.

Um único investigador, velado quanto aos resultados da análise histológica, foi responsável pelo processamento quantitativo das imagens.

Histologia

Para análise histopatológica após a eutanásia, o coração foi rapidamente excisado e fixado em formaldeído a 10%, por 24 horas, e, depois, transferido para álcool 70%. As amostras foram progressivamente desidratadas e embebidas em parafina. Cortes histológicos foram produzidos seguindo-se plano de corte perpendicular ao longo eixo do coração, de forma a reproduzir os cortes em eixo curto obtidos nos estudos de perfusão miocárdica *in vivo*. Esses cortes foram corados com tricrômico de Masson para perfeita identificação das áreas de fibrose, que ficam coradas em azul.

Para quantificação da área de fibrose nos estudos histológicos, procedeu-se de forma semelhante ao descrito para os cortes tomográficos dos estudos de perfusão *in vivo*. Resumidamente, as imagens correspondentes aos quatro níveis de corte da cavidade ventricular esquerda foram digitalizadas mediante emprego de um escâner. Um perfil circunferencial acompanhando a conformação das paredes do VE foi delineado utilizando-se o programa ImageJ, sendo computada a extensão linear da circunferência do VE em cada corte. Também foi identificada e quantificada, em cada corte, a extensão linear do tecido miocárdico corado como fibrose. A extensão da fibrose miocárdica, expressa em percentual da área da superfície do VE foi calculada pela divisão da extensão total do tecido fibrótico nos quatro cortes, dividida pela extensão total das circunferências do VE em todos os quatro cortes, sendo o valor final multiplicado por cem.

Um único investigador realizou a quantificação das áreas de fibrose nos estudos histológicos, estando velado quanto aos resultados obtidos nas imagens *in vivo*.

Análise estatística

Os resultados foram expressos na forma de média e desvio padrão da média. A distribuição Gaussiana das variáveis foi verificada mediante emprego do teste de Kolmogorov-Smirnov.

Para comparação entre os valores médios da extensão da fibrose miocárdica entre o método *in vivo* e a histologia, foi utilizado o teste *t* de Student pareado. Para análise de correlação entre os resultados individuais obtidos em cada um dos métodos, foi utilizado o teste de regressão linear e correlação pelo método dos mínimos quadrados. O método gráfico de Bland-Altman foi utilizado para análise adicional da concordância entre as medidas da área de fibrose obtidas pelos dois métodos empregados.

Resultados

Resolução espacial das imagens tomográficas

A Figura 2B mostra imagens tomográficas reconstruídas dos cortes transversais, em secção perpendicular ao longo eixo, das barras preenchidas com radioatividade do fantoma micro-Jaszczak. Numa análise visual semiquantitativa, é possível identificar-se, com nitidez, o contorno das barras do grupo com diâmetro internos de 2 mm, perdendo-se a resolução das imagens no grupo de barras com diâmetro interno de 1 mm, sugerindo que o limite da resolução espacial se encontra entre os valores de 1 e 2 mm. Uma determinação mais precisa da resolução espacial foi obtida pela análise de um perfil de contagens de uma fonte linear (PSF), que resultou em uma resolução espacial de 1,5 mm (largura à meia altura). O tamanho do *pixel* no objeto imageado foi de 0,6 mm.

Análise visual das imagens de perfusão miocárdica

A Figura 3 apresenta imagens do SPECT de perfusão miocárdica de um dos animais controles, utilizados para padronização inicial da visualização das imagens. Observou-se elevada relação de contagens órgão-alvo/fundo com nitidez os limites das paredes e o delineamento da cavidade do VE, além da visualização das paredes do ventrículo direito em alguns cortes médio-cavitários. As imagens do animal controle apresentam distribuição uniforme do radiotraçador entre os diferentes seguimentos miocárdicos, com exceção do ápice que apresentou uma menor intensidade de captação, que foi atribuída ao afilamento parietal da região apical. Entretanto, esses valores não estiveram abaixo de 50% em relação ao *pixel* de máximo acúmulo de captação no miocárdio.

A qualidade das imagens dos animais infartados (Figura 4) é comparável com a dos animais controles; além disso, evidenciou-se claramente o defeito de captação em territórios compatíveis com áreas de irrigação da artéria coronária esquerda do rato (parede anterior, anterolateral e região apical) em todos os animais, com áreas significativas de infarto confirmadas na histologia.

Análise quantitativa das áreas de infarto miocárdico

Na Figura 5, podemos comparar as imagens tomográficas do SPECT de perfusão miocárdica dos cortes com as imagens correspondentes do estudo histológico, usadas para quantificação do defeito perfusional e área de fibrose, respectivamente. Nota-se grande semelhança da morfologia das paredes assim como a topografia e a extensão do defeito perfusional miocárdico mostrado nas imagens de SPECT e nos cortes histológicos.

A área de infarto miocárdico quantificada pela histologia foi de $21,7 \pm 22,0\%$ da superfície do VE. O tamanho da área

Artigo Original

de infarto miocárdico apresentou grande variação individual entre os animais, com extremos de 26,5 a 55,0%, sendo que seis animais não apresentaram área significativa de fibrose no estudo histopatológico.

Todos os animais exibindo áreas significativas de fibrose miocárdica no estudo histológico foram corretamente identificados pela presença de defeitos de captação no SPECT de perfusão miocárdica. A área da superfície do VE exibindo defeito de captação detectado no SPECT de perfusão miocárdica (área de infarto) foi $21,1 \pm 21,2\%$ (extremos de 30,0 a 50,0%), resultados estes semelhantes ao obtido no estudo histológico ($p=0,45$).

Mediante análise de regressão linear, obteve-se excelente correlação entre os valores individuais da extensão do defeito de captação miocárdica pelo SPECT e a extensão da fibrose miocárdica pela histologia ($n = 13$, $r = 0,99$; $p < 0,0001$). Observa-se, no gráfico de dispersão, que a linha de regressão exibe um $\text{slope} = 1,03$, mostrando-se quase superponível à reta de identidade entre os resultados (Figura 6).

A plotagem dos dados seguindo-se o método gráfico de análise de concordância entre medidas de Bland-Altman (Figura 7) mostrou elevada concordância entre os resultados obtidos pelos dois métodos. Como se observa no gráfico,

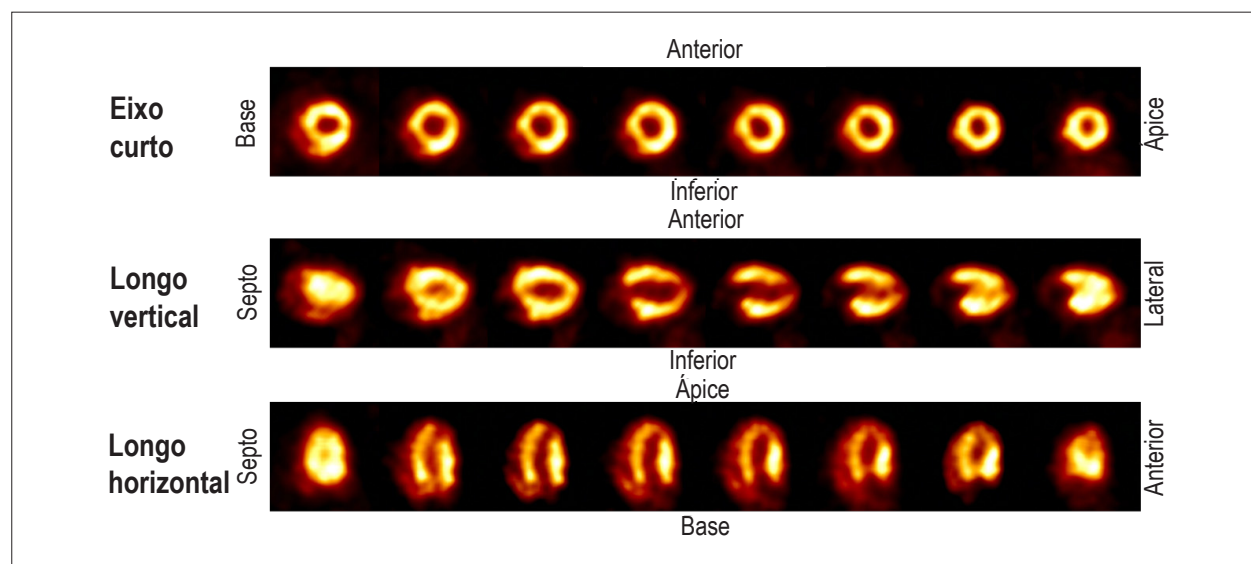


Figura 3 – Cortes do eixo curto (linha superior), eixo longo horizontal (linha média) e eixo longo vertical de imagens de um estudo cintilográfico de perfusão miocárdica de um rato controle. Imagem de qualidade comparável às imagens clínicas com boa relação órgão-alvo/fundo, perfeita visualização da cavidade e paredes ventriculares esquerda, além da visualização da parede ventricular direita em alguns cortes.

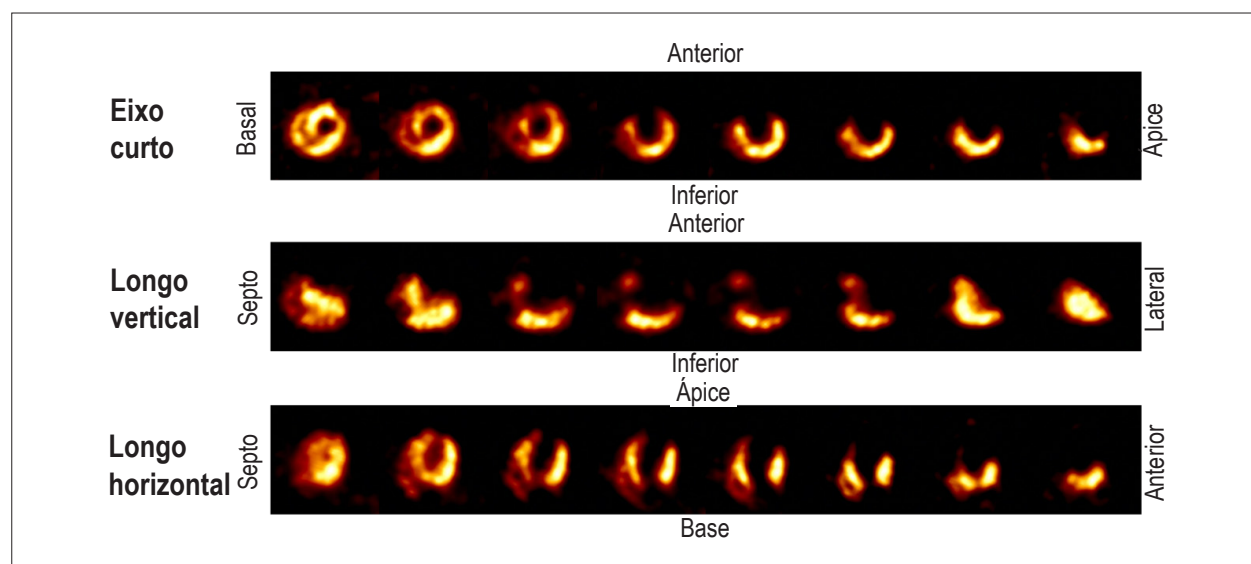


Figura 4 – Cortes tomográficos do eixo curto (linha superior), eixo longo horizontal (linha média) e eixo longo vertical de imagens de um estudo cintilográfico de perfusão miocárdica de um rato com infarto experimental. Observa-se dilatação da cavidade do ventrículo esquerdo e presença de extenso defeito grave de captação, envolvendo as paredes anterior, anterolateral e região apical.

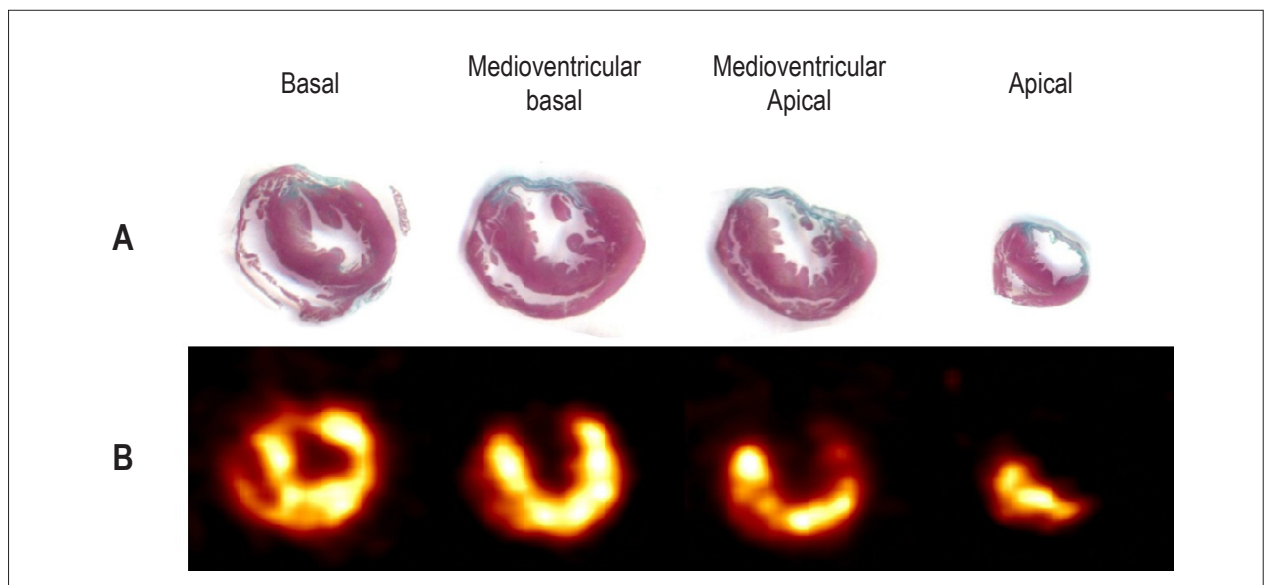


Figura 5 – Exemplo da correlação topográfica e quantitativa da área de infarto. Cortes histopatológicos corados com tricromo de masson (A) e os cortes tomográficos do SPECT de perfusão miocárdica (B) são apresentados. Observa-se grave e extenso defeito perfusional envolvendo paredes anterior, anterolateral e ápice do ventrículo esquerdo, com perfeita correlação topográfica com a histologia. A extensão do defeito de captação das imagens de SPECT(%) é muito semelhante à extensão de fibrose na histopatologia(%).

a média das diferenças entre as medidas foi de -0,6, valor muito próximo ao zero (valor ideal). Os valores individuais das diferenças entre as medidas distribuem-se em estreita faixa em torno da média, situando-se entre as barras representativas de 2 desvios padrão, demonstrando que o limite de variação para a diferença entre as medidas foi bastante aceitável ($\pm 5,4$ pontos percentuais).

Discussão

Neste estudo, descrevemos um sistema para obtenção de imagens cintilográficas em SPECT de alta resolução para pequenos animais, baseado num colimador pinhole acoplado a um suporte rotacional, adaptados a uma gama-câmara clínica. No melhor do nosso conhecimento, este é o primeiro dispositivo dessa natureza desenvolvido na América Latina. O desempenho desse sistema permitiu identificar estruturas entre 1 e 2 mm, atingindo uma resolução espacial de 1,5 mm (FWHM) com um tamanho de *pixel* de 0,6 mm. Esses valores são semelhantes aos reportados em outros estudos, descrevendo sistemas adaptados em gama-câmara clínica¹³⁻¹⁵ e sistemas especialmente construídos para pequenos animais¹⁶⁻¹⁸.

Além de elevada resolução espacial, as imagens de SPECT de perfusão miocárdica obtidas dos animais, tanto controles quanto infartados, apresentaram qualidade comparáveis às das imagens obtidas em humanos, com visualização apropriada das paredes e da cavidade ventricular esquerda, além da visualização da parede do ventrículo direito em alguns cortes, com elevada relação de contagens órgão-alvo/fundo.

Quando comparadas ao histopatológico, as imagens de SPECT de perfusão miocárdica dos animais submetidos ao infarto experimental apresentaram grande semelhança na morfologia das paredes, assim como na topografia da área de infarto. Adicionalmente, a extensão do defeito perfusional

miocárdico apresentou uma forte correlação com a área de infarto medido pela histologia. Nossos resultados, em relação à acurácia na quantificação da extensão da área de infarto, são comparáveis àqueles relatados por outros estudos utilizando ratos e camundongos em outros sistemas de imagens cintilográficas de alta resolução^{13,14,18-20}. Esses aspectos sugerem, no conjunto, que o sistema desenvolvido tem desempenho e acurácia comparáveis aos de sistemas dedicados comercialmente disponíveis.

Um sistema de aquisição de arquitetura aberta, como o descrito aqui, mostra-se bastante versátil, pois, além de ser facilmente acoplado a outras gama-câmaras, pequenas mudanças em sua configuração permitem a realização de imagens de animais de diferentes tamanhos, variando de 30 a 800 g. Essas mudanças consistem na substituição do suporte rotacional por outros de diferentes calibres e no ajuste da distância entre o animal a ser estudado e o orifício do pinhole, promovendo diferentes magnificações do objeto imageado. Essa versatilidade permite ainda ajustes para otimização dos parâmetros de aquisição de diferentes modalidades de estudos cintilográficos cardíacos no mesmo animal (por exemplo: ventriculografia nuclear planar e tomográfica e gated-SPECT de perfusão) e possibilidade de imagens funcionais de diferentes órgãos (por exemplo: cérebro, rim, tireoide e pulmão). Além disso, quando comparado a sistemas dedicados a pequenos animais comercialmente disponíveis para obtenção de imagens de SPECT, o sistema descrito aqui exibe custos de construção incomparavelmente menores. O investimento em material e mão de obra especializada empregados para a montagem física do sistema descrito aqui foi de aproximadamente R\$10.000,00. O desenvolvimento do *software* de reconstrução empregou plataformas de acesso livre e os algoritmos e fórmulas matemáticas que fundamentam o programa foram publicados anteriormente⁷.

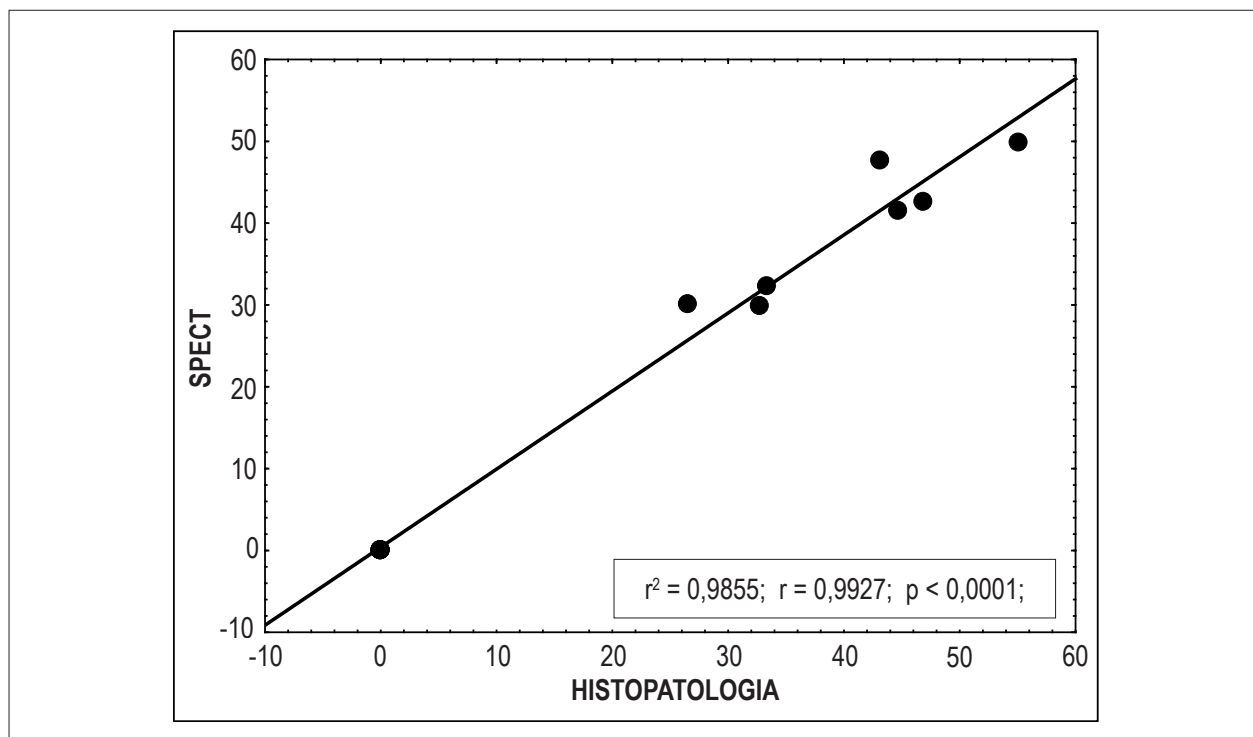


Figura 6 – Gráfico de dispersão ilustrando a correlação entre as quantificações da área de infarto miocárdico estimadas pela extensão dos defeitos de perfusão (eixo Y) e área de fibrose miocárdica pela histopatologia (eixo X). Observa-se elevado nível de correlação $r^2 = 0,98$; $r = 0,99$; $p < 0,0001$.

Alguns aspectos técnicos adicionais devem ser apresentados para se explicarem as vantagens da configuração desse tipo de sistema de aquisição de imagens, em que o alvo (pequeno animal) é girado em frente ao detector. Imagens de SPECT são baseadas na aquisição de um conjunto de imagens planares (projeções) em diferentes ângulos ao redor do objeto. No cenário clínico, as projeções geralmente são obtidas por colimadores paralelos, sendo que a cabeça do detector gira em órbita circunferencial em torno do paciente, resultando em imagens com uma resolução espacial de aproximadamente 6 mm (largura à meia altura)²¹. Para imagens de órgãos de pequenos animais, é tecnicamente mais vantajoso girarmos o animal, para obtenção das projeções, e não o detector. Dessa forma, a maioria dos desalinhamentos e oscilações causadas pela movimentação da cabeça do detector da gama-câmara são eliminados, bem como são minimizados o custo de construção e o espaço de operação do sistema.

Diferentemente do que acontece quando se empregam colimadores de orifícios paralelos, há um fator de magnificação implícito no uso do colimador pinhole. Essa magnificação é uma função da relação das distâncias entre o detector e o colimador e entre o objeto-alvo e o colimador. Quanto mais próximo do orifício do pinhole, maior o fator de magnificação do objeto a ser estudado. Também é importante ressaltar que a sensibilidade do sistema (velocidade de acúmulo de contagens) é uma função da área do orifício do colimador. No nosso equipamento, é possível a utilização de diferentes diâmetros de orifício (de 0,5 a 2 mm), feitos de chumbo ou ouro, assim como colimadores com múltiplos orifícios,

o que pode otimizar o processo de aquisição das imagens cintilográficas.

Vários argumentos podem ser elencados para salientar a importância da obtenção de imagens de perfusão miocárdica de alta resolução em modelos experimentais de cardiopatia isquêmica e de isquemia/reperfusão. A indução de infarto miocárdico é o modelo de insuficiência cardíaca/disfunção ventricular esquerda mais frequentemente empregado na pesquisa pré-clínica²². A quantificação precisa da extensão da fibrose por métodos de imagem *in vivo* podem representar auxílio relevante na caracterização desses modelos, permitindo a seleção de animais mais homogêneos em relação ao tamanho do infarto, bem como aquilatar, de forma longitudinal, o efeito de terapias anti-isquêmicas e estratégias de reperfusão miocárdica, assemelhando-se ao que foi descrito nos estudos clínicos empregando o SPECT de perfusão miocárdica²³.

Por outro lado, a avaliação sequencial do tamanho da área de infarto é um aspecto crítico nos estudos, envolvendo terapia celular de regeneração miocárdica com células tronco, da mesma forma como tem sido empregada em estudos clínicos recentes^{24,25}.

É relevante mencionar que a ecocardiografia tem sido amplamente utilizada na pesquisa pré-clínica, não apenas para estimar o tamanho do infarto miocárdico, mas também para fornecer medidas do grau de remodelamento ventricular esquerdo subsequente²⁶.

No entanto, vale ressaltar que o emprego dos métodos de imagem que avaliam a função sistólica ventricular esquerda

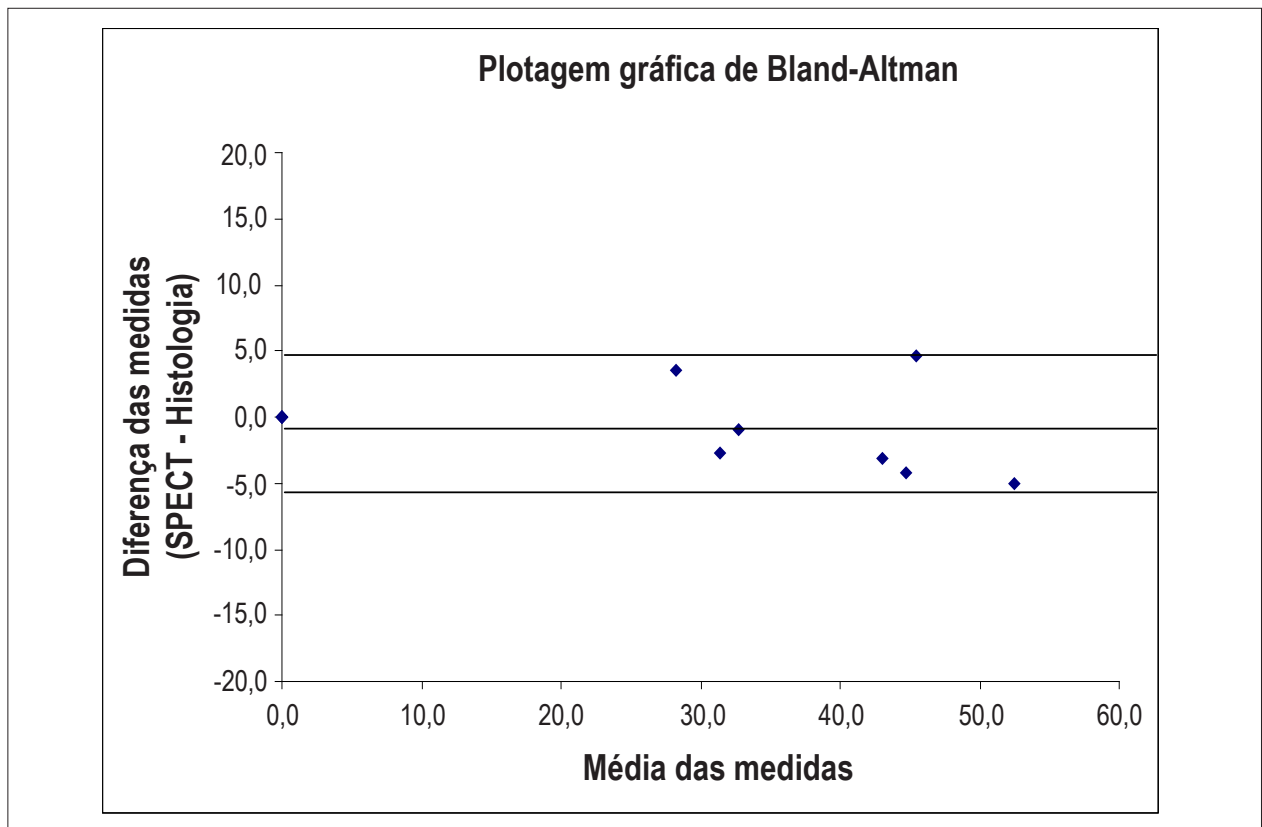


Figura 7 – Ilustração da análise gráfica de Bland-Altman para comparação entre as áreas de infarto miocárdico medidas pelo SPECT e pela histologia. Todos os pares de dados da diferença entre os valores distribuem-se em torno da média (-0,6 pontos percentuais) e dentro do limite de 2 desvios padrão ($\pm 5,4$ pontos percentuais). Não se observa correlação entre os valores da diferença entre as medidas com as respectivas médias.

para mensurar de forma indireta a extensão do infarto miocárdico está sujeito a vários fatores que podem levar à imprecisão. A estimativa do tamanho do infarto miocárdico a partir da extensão da área de dissinergia contrátil pode ser contaminada por fatores confusores, como a presença de miocárdio viável, mas transitoriamente disfuncionante (miocárdio atordoado) e a mudança do grau de atividade contrátil vicariante das paredes distantes à área de infarto. Esses fatores podem mascarar os resultados de terapias voltadas para o salvamento do miocárdio isquêmico ou aquelas agindo sobre o remodelamento cardíaco²⁷.

Portanto, o aspecto central envolvido na comparação entre os diferentes métodos para avaliação do tamanho do infarto é que as imagens de SPECT de perfusão miocárdica podem avaliar funcionalmente a extensão do miocárdio viável e, conseqüentemente, o tamanho do miocárdio necrosado. Essa avaliação direta funcional/metabólica independe do status de mobilidade das paredes, ou seja, mesmo áreas atordoadas seriam julgadas como viáveis e as áreas “encabrestadas” (áreas de fibrose/necrose exibindo mobilidade por estarem ancoradas em segmentos circunvizinhos com contratilidade aumentada) seriam corretamente julgadas como necróticas. Desse modo, reproduzindo o que a literatura internacional já demonstrou em estudos clínicos, julgamos que a avaliação funcional/metabólica cintilográfica acrescenta importantes informações para diagnóstico do miocárdio viável e, por extensão, da necrose miocárdica,

além do que a avaliação da mobilidade segmentar parietal pode fornecer. Acreditamos, assim, que imagens de SPECT de perfusão miocárdica serviriam como uma ferramenta adicional aliada ao ecocardiograma (este sendo o método padrão para medir o grau de remodelamento e da disfunção sistólica) para avaliação mais completa dos modelos de cardiopatia isquêmica, assim como para medir o impacto de terapias celulares de regeneração miocárdica.

Conclusão

O sistema desenvolvido apresentou alta resolução espacial e elevada acurácia para detecção e quantificação das áreas de fibrose miocárdica, sendo uma opção de baixo custo e grande versatilidade para obtenção de imagens em SPECT de alta resolução de órgãos de pequenos animais.

As facilidades tecnológicas descritas e validadas no presente estudo têm o potencial de contribuir para popularizar o emprego da avaliação funcional com imagens cintilográficas na pesquisa pré-clínica cardiológica no cenário científico brasileiro.

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), com processos 07/50339-3 e 2011/03261-4, pela Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA) do Hospital

das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP) da Universidade de São Paulo (USP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). JM recebeu bolsa do Programa de Apoio a Jovem Pesquisador em Centros Emergentes.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Mejia J, Galvis-Alonso OY, Simões MV; Obtenção de dados: Oliveira LFL, Mejia J, Carvalho EEV, Lataro RM, Frassetto SN, Fazan Jr. R, Salgado HC; Análise e interpretação dos dados: Oliveira LFL, Carvalho EEV, Lataro RM, Simões MV; Análise estatística: Oliveira LFL, Carvalho EEV; Obtenção de financiamento: Mejia J; Redação do manuscrito: Oliveira LFL; Revisão crítica do manuscrito quanto ao

conteúdo intelectual: Oliveira LFL, Mejia J, Galvis-Alonso OY, Simões MV.

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo foi parcialmente financiado pela FAPESP, FAEPA-HCFMRP e CNPq.

Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de dissertação de Mestrado de Luciano Fonseca Lemos de Oliveira pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Referências

1. Institute of Laboratory Animal Resources (U.S.). Committee on Rodents. Rodents. Washington, DC: National Academy Press; 1996.
2. Tucci PJ. Pathophysiological characteristics of the post-myocardial infarction heart failure model in rats. *Arq Bras Cardiol.* 2011;96(5):420-4.
3. Zornoff LA, Paiva SA, Minicucci MF, Spadaro J. Experimental myocardium infarction in rats: analysis of the model. *Arq Bras Cardiol.* 2009;93(4):434-40, 426-32.
4. Dornas WC, Oliveira TT, Augusto LE, Nagem TJ. Experimental atherosclerosis in rabbits. *Arq Bras Cardiol.* 2010;95(2):272-8.
5. Klocke R, Tian W, Kuhlmann MT, Nikol S. Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease. *Cardiovasc Res.* 2007;74(1):29-38.
6. Mejia J, Galvis-Alonso OY, Braga J, Correa R, Leite JP, Simões MV. Methodological approaches to planar and volumetric scintigraphic imaging of small volume targets with high spatial resolution and sensitivity. *Braz J Med Biol Res.* 2009;42(8):692-9.
7. Mejia J, Galvis-Alonso OY, Castro AA, Braga J, Leite JP, Simões MV. A clinical gamma camera-based pinhole collimated system for high resolution small animal SPECT imaging. *Braz J Med Biol Res.* 2010;43(12):1160-6.
8. Shepp LA, Vardi Y. Maximum likelihood reconstruction for emission tomography. *IEEE Trans Med Imaging.* 1982;1(2):113-22.
9. Chatziioannou A, Qi J, Moore A, Annala A, Nguyen K, Leahy R, et al. Comparison of 3-D maximum a posteriori and filtered backprojection algorithms for high-resolution animal imaging with microPET. *IEEE Trans Med Imaging.* 2000;19(5):507-12.
10. Frese T, Rouze NC, Bouman CA, Sauer K, Hutchins GD. Quantitative comparison of FBP, EM, and Bayesian reconstruction algorithms for the IndyPET scanner. *IEEE Trans Med Imaging.* 2003;22(2):258-76.
11. Loening AM, Gambhir SS. AMIDE: a free software tool for multimodality medical image analysis. *Mol Imaging.* 2003;2(3):131-7.
12. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res.* 1979;44(4):503-12.
13. Habraken JB, de Bruin K, Shehata M, Booi J, Bennink R, van Eck Smit BL, et al. Evaluation of high-resolution pinhole SPECT using a small rotating animal. *J Nucl Med.* 2001;42(12):1863-9.
14. Wu MC, Gao DW, Sievers RE, Lee RJ, Hasegawa BH, Dae MW. Pinhole single-photon emission computed tomography for myocardial perfusion imaging of mice. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42(3):576-82.
15. Moons CP, Peremans K, Vermeire S, Vandermeulen E, Dobbeleir A, Hermans K, et al. The Use of HiSPECT to Investigate Dopaminergic Involvement in the Development of Stereotypic Behaviour. *Scand J Lab Anim Sci.* 2008;35(4):221-9.
16. Liu ZL, Kastis GA, Stevenson GD, Barrett HH, Furenlid LR, Kupinski MA, et al. Quantitative analysis of acute myocardial infarct in rat hearts with ischemia-reperfusion using a high-resolution stationary SPECT system. *J Nucl Med.* 2002;43(7):933-9.
17. MacDonald LR, Patt BE, Iwanczyk JS, Tsui BM, Wang YC, Frey EC, et al. Pinhole SPECT of mice using the LumaGEM gamma camera. *IEEE Trans Nucl Sci.* 2001;48(3):830-6.
18. Wollenweber T, Zach C, Rischpler C, Fischer R, Nowak S, Nekolla SG, et al. Myocardial perfusion imaging is feasible for infarct size quantification in mice using a clinical single-photon emission computed tomography system equipped with pinhole collimators. *Mol Imaging Biol.* 2010;12(4):427-34.
19. Hirai T, Nohara R, Hosokawa R, Tanaka M, Inada H, Fujibayashi Y, et al. Evaluation of myocardial infarct size in rat heart by pinhole SPECT. *J Nucl Cardiol.* 2000;7(2):107-11.
20. Acton PD, Thomas D, Zhou R. Quantitative imaging of myocardial infarct in rats with high resolution pinhole SPECT. *Int J Cardiovasc Imaging.* 2006;22(3-4):429-34.
21. Cherry SR, Sorenson JA, Phelps ME. Physics in nuclear medicine. 3rd ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2003.
22. Monnet E, Chachques JC. Animal models of heart failure: what is new? *Ann Thorac Surg.* 2005;79(4):1445-53.
23. Gibbons RJ. Tc-99m SPECT sestamibi for the measurement of infarct size. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2011;16(3-4):321-31.
24. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kosterling M, Hernandez A, Sorg RV, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation.* 2002;106(15):1913-8.
25. Perin EC, Willerson JT, Pepine CJ, Henry TD, Ellis SG, Zhao DX, et al. Effect of transendocardial delivery of autologous bone marrow mononuclear cells on functional capacity, left ventricular function, and perfusion in chronic heart failure: the FOCUS-CCTRN trial. *JAMA.* 2012;307(16):1717-26.
26. Minicucci MF, Azevedo PS, Matsubara BB, Matsubara LS, Paiva SA, Zornoff LA. [Association between sphericity, ventricular function and size of the infarction in rats]. *Arq Bras Cardiol.* 2010;94(5):645-50.
27. Botker HE, Kaltoft AK, Pedersen SF, Kim WY. Measuring myocardial salvage. *Cardiovasc Res.* 2012;94(2):266-75.