

LUCIANA LILIAN LOUZADA MARTINI

**MEDIÇÃO MANUAL DA VOLUMETRIA DO HIPOCAMPO UTILIZANDO O
VISUALIZADOR OSIRIX®**

Brasília, 2013

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LUCIANA LILIAN LOUZADA MARTINI

**MEDIÇÃO MANUAL DA VOLUMETRIA DO HIPOCAMPO UTILIZANDO O
VISUALIZADOR OSIRIX®**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Farage

Co-orientador: Dr. Einstein Francisco Camargos

Brasília

2013

LUCIANA LILIAN LOUZADA MARTINI

**MEDIÇÃO MANUAL DA VOLUMETRIA DO HIPOCAMPO UTILIZANDO O
VISUALIZADOR OSIRIX®**

Aprovada em 13 de dezembro de 2013

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do Título de Mestre em Ciências
da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luciano Farage (presidente)

Universidade de Brasília - UnB

Dr. Marco Polo Dias Freitas

Hospital Universitário de Brasília - HUB

Prof. Dr. Alexandre Sérgio de Araújo Bezerra

Universidade de Brasília – UnB

*Dedico este trabalho aos meus pais que conseguiram passar aos seus filhos
princípios, valores e a importância da educação.*

Aos meus irmãos, que são professores, pelo apoio e carinho.

Ao meu marido pelo incentivo, auxílio, compreensão, paciência, tolerância e amor.

AGRADECIMENTOS

Inicio os meus agradecimentos a Deus que tem guiado os meus passos nessa longa jornada que é a vida.

Agradeço ao Professor Luciano pela paciência, ensinamentos e a oportunidade concedida de me aventurar no mundo da neurorradiologia. Pelo exemplo de dedicação a vida acadêmica e profissional. Acima de tudo, por ter aceito o desafio de orientar alunos de outras especialidades.

Aos residentes de radiologia Tiago e Rosi pela paciência, ajuda, perseverança e treinamento imprescindíveis neste estudo.

Ao amigo Einstein Camargos pelo apoio, aprendizado e experiência concedida diariamente em medicina, geriatria e ciência.

Ao professor Otávio Nóbrega por recentemente ter dividido comigo tarefas grandiosas e pela oportunidade que tem dado aos gerontólogos e geriatras e em pesquisas científicas.

Aos professores Alexandre e Marco Polo, membros da banca examinadora, pelas valiosas críticas construtivas e sugestões.

A todos os colegas do CMI pela amizade e incentivo e aos demais residentes e funcionários da radiologia por terem me acolhido com tanto carinho e atenção no Centro de Imaginologia do HUB.

"Há verdadeiramente duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe.

A ciência consiste em saber; em crer que se sabe reside a ignorância."

(Hipócrates)

RESUMO

Introdução: As técnicas usadas para medição volumétrica em uso com execução mais simples ou complexa incluem métodos manuais, semiautomáticos e automáticos com diferentes programas e protocolos. Apesar do avanço tecnológico nesta área, o traçado manual continua sendo o método mais eficaz e de menor custo, entretanto, é o que mais consome tempo, limitando sua aplicação clínica. O programa Osirix® é um visualizador DICOM® (Comunicação de Imagens Digitais em Medicina), baseado em plataforma Apple®, distribuído em várias versões, incluindo uma de 32bits que é gratuita. É uma aplicação com bom desempenho e amplamente difundida entre os radiologistas e demais especialistas que utilizam imagens na sua prática diária. **Objetivo:** Desenvolver uma técnica de medição volumétrica manual do hipocampo utilizando o visualizador Osirix®, versão 5,6 e realizar a comparação interobservador da medição do hipocampo com a mesma técnica. **Materiais e Métodos:** Foi utilizado o visualizador Osirix® gratuito, com imagens de sequência volumétrica SPGR ponderadas em T1, com cortes de 1mm de espessura; intervalo de 0,1mm, obtidas em aparelho de ressonância magnética (RM) GE de 1,5T, com bobina de 8 canais. Foi usada uma delimitação visual específica do hipocampo. No mínimo dez cortes foram escolhidos para o traçado manual das regiões de interesse (ROI), preferencialmente quando houvesse uma mudança na sua conformação visual. Em seguida, selecionou-se na barra de ferramentas o comando *ROI*, opção *ROI volume* (volume da área de interesse) e *generate missing ROI* (gerar áreas de interesse), para gerar as áreas subsequentes automaticamente podendo ser corrigidas manualmente em caso de erros do programa. Finalmente, repetiu-se a sequência *ROI* e *ROI volume*, mas dessa vez com o comando *compute volume*

(computar volume) para calcular o volume total de todas as áreas de interesse e gerar uma imagem correspondente em três dimensões (3D). Os coeficientes de correlação intraclass foram calculados, com um intervalo de 95% de confiança, como uma medida de confiabilidade relativa entre as volumetrias dos leitores. Estes coeficientes foram calculados para uma análise de variância (ANOVA) a dois fatores baseado em concordância absoluta. A técnica foi aplicada em 12 pacientes com idade média de 75 anos, sexo feminino, cognitivamente normal e que realizaram RM devido a outras queixas, como cefaleia, e não apresentavam anormalidades estruturais. As medidas foram realizadas por dois médicos residentes do terceiro ano (R3) de radiologia e uma geriatra, esta sem experiência prévia em manipular imagens de RM. **Resultados:** Após a análise estatística, verificou-se que todos os coeficientes de correlação intraclass apresentaram valores abaixo de 0,40 que indica uma baixa concordância entre os avaliadores. **Conclusão:** A medição volumétrica do hipocampo utilizando o visualizador Osirix® tem a vantagem de ser acessível e ter um custo baixo comparado com as técnicas automáticas. Contudo, o procedimento é trabalhoso, demanda tempo e não houve uma correção para a atrofia relacionada ao envelhecimento e a variabilidade individual. A análise estatística evidenciou uma baixa concordância entre os avaliadores o que reforça a necessidade de maior treinamento na delimitação do hipocampo relatado na literatura.

Palavras-chave: hipocampo; volumetria por ressonância magnética; Osirix.

ABSTRACT

Introduction: The techniques used for volume measurement from simple to more complex methods include manual, semiautomatic and automatic measurements with a variety of programs and protocols. Despite technological advances, manual tracing remains the most effective and least costly, however it's more time-consuming and this limits its clinical use. Osirix™ is a DICOM™ (Digital Imaging and Communications in Medicine), viewer, based on an Apple™ platform, available in several versions, including a 32 bits that is free of charge. It performs well and is widespread among radiologists and other specialists who use images in their daily practice. **Objective:** To develop a technique for hippocampal manual volumetric measurement using the DICOM viewer Osirix™ version 5.6 and compare the interater measurement of the hippocampus with the same technique. **Materials and Methods:** We used the free viewer Osirix™, with images obtained by T1-weighted gradient echo SPGR volumetric sequence, 1mm thick slices with 0.1mm interval on a 1.5 T MRI (magnetic resonance imaging) GE with an 8 channel head coil. A specific delineation of the hippocampus was used. At least ten slices were chosen to manually trace the region of interest (ROI), preferably where there were changes in its visual conformation. Next, in the toolbar, we selected the following sequence of commands: "ROI", "ROI volume" and "generate missing ROI" and the software generated automatically the missing ROI that was corrected manually in case of errors. Finally, the sequence was repeated, "ROI", "ROI volume", but this time with the final command being "compute volume" to calculate the total volume of all the areas of interest and generate a corresponding three dimensional (3D) image. The Intraclass Correlation Coefficient (ICC) was calculated with 95% confidence interval,

as a measure of the reliability between volumetric ratings. These coefficients were calculated on a two-way ANOVA model based on absolute agreement. This technique was applied in 12 patients with mean age of 75, female, cognitively normal and who had MRI performed due to other complaints, such as headache, that showed no structural abnormalities. Two third year radiology residents and 1 geriatrician with limited MRI experience performed the measurements. **Results:** The statistical analysis found that all ICC had values below 0.40, indicating a weak correlation among raters. **Conclusion:** The manual volumetric hippocampus measurement with Osirix™ has the advantage of being accessible and of low cost compared to automatic techniques. This technique is time consuming and there was no correction for aging atrophy or individual variability. Statistical analysis demonstrated a weak correlation among raters which confirms the importance of training the researchers on the delineation of the hippocampus.

Keywords: hippocampus; volumetry; Osirix.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Peça anatômica mostrando porção ínfero-medial do hemisfério direito...18	18
Figura 2 – Desenvolvimento do giro denteado e do corno de Amon até a sua posição definitiva.....19	19
Figura 3 – Diagrama e corte coronal de RM de 9,4T do hipocampo.....20	20
Figura 4 – Parte ventricular do hipocampo.....21	21
Figura 5 – Peça anatômica mostrando um corte sagital do hemisfério direito.....23	23
Figura 6 – Corte coronal do cérebro em RM de 3T, imagem ponderada em T1.....24	24
Figura 7 – Borda anterior do hipocampo.....33	33
Figura 8- Borda superior do hipocampo.....34	34
Figura 9- Borda inferior do hipocampo.....34	34
Figura 10- Borda lateral do hipocampo.....35	35
Figura 11 – Borda medial do hipocampo.....36	36
Figura 12- Borda posterior do hipocampo.....36	36
Figura 13- Imagens subsequentes do hipocampo geradas38	38
Figura 14 – Imagens em 3D do hipocampo.....38	38
Figura 15- Gráfico de Bland-Altman dos valores de volume do hipocampo direito entre o Leitor 3 e o Leitor 1.....42	42
Figura 16- Gráfico de Bland-Altman dos valores de volume do hipocampo esquerdo entre o Leitor 3 e o Leitor 1.....43	43
Figura 17- Gráfico de Bland-Altman dos valores de volume do hipocampo direito entre o Leitor 3 e o Leitor 2.....44	44

Figura 18- Gráfico de Bland-Altman dos valores de volume do hipocampo esquerdo entre o Leitor 3 e o Leitor 2.....	45
Figura 19- Gráfico de Bland-Altman dos valores de volume do hipocampo direito entre o Leitor 1 e o Leitor 2.....	46
Figura 20- Gráfico de Bland-Altman dos valores de volume do hipocampo esquerdo entre o Leitor 1 e o Leitor 2.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos Participantes.....	40
Tabela 2 - Volumetrias dos Hipocampos em cm ³	41
Tabela 3 - Coeficiente de Correlação Intraclasse calculados (ICC) para uma ANOVA a dois fatores baseado em concordância absoluta.....	41

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ADRDA - Associação da Doença de Alzheimer e Desordens Relacionadas

ADNI - Iniciativa da Neuroimagem na Doença de Alzheimer

ANOVA – Análise de Variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CA - Corno de Amon

DA - Doença de Alzheimer

DCL - Declínio cognitivo leve

DDR3 – Taxa de transferência dobrada 3

DICOM - Comunicação de Imagens Digitais em Medicina

DSM IV - IV Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais

EADC-ADNI - Centros Europeus de Doença de Alzheimer, Iniciativa de Neuroimagem na Doença de Alzheimer

FDA - *Food and Drug Administration* - órgão governamental dos Estados Unidos responsável pelo controle dos alimentos, medicamentos, cosméticos, equipamentos médicos, materiais biológicos e produtos derivados do sangue humano

FLAIR – Recuperação de Inversão Atenuada de Fluidos

GB - *Gigabyte*

GE – Companhia *General Electric*

GHz - *Gigahertz*

HD – Alta definição

ICC - Coeficientes de correlação intraclasse

LCR - Líquido cefalorraquidiano

LTM - Lobo temporal medial

MB - *Megabyte*

NIA - Instituto Nacional do Envelhecimento

NIBIB - Instituto Nacional de Imagem Biomédica e Bioengenharia

NIH - Institutos Nacionais da Saúde

NINCDS - Instituto Nacional de Desordens Neurológicas, Comunicativas e Acidente Vascular Cerebral

OSX – Sistema Operacional X

PET – Tomografia por emissão de pósitrons

RAM - Memória de acesso aleatório

RM - Ressonância magnética

ROI - Região de interesse

R3- Médico residente do terceiro ano

SPGR - *Spoiled Gradient Recalled Echo*

T - Tesla

TC – Tomografia computadorizada

TCLE - Termo de Consentimento Livre Esclarecido

TE – Tempo de eco

TR – Tempo de repetição

3D - Três dimensões

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 ANATOMIA DO HIPOCAMPO.....	18
1.2 A FUNÇÃO DO HIPOCAMPO NA MEMÓRIA.....	24
1.3 O HIPOCAMPO NO ENVELHECIMENTO E NAS DOENÇAS.....	25
1.4 OS BIOMARCADORES NA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	25
1.5 A VOLUMETRIA DO HIPOCAMPO COMO BIOMARCADOR NA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	27
1.6 TÉCNICAS DE VOLUMETRIA.....	28
2 OBJETIVOS.....	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1 AMOSTRA.....	31
3.1.1 Critérios de inclusão.....	31
3.1.2 Critérios de exclusão.....	31
3.1.3 Avaliação médica.....	32
3.2 TÉCNICA.....	32
3.3 DELIMITAÇÃO DO HIPOCAMPO.....	33
3.4 MEDIÇÃO MANUAL DA VOLUMETRIA DO HIPOCAMPO.....	37
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
4 RESULTADOS.....	40
4.1 CARACTERÍSTICAS DOS PARTICIPANTES E VOLUMETRIAS.....	40
4.2 COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO INTRACLASSE.....	41

4.2.1 Volumetria do leitor 3 e leitor 1.....	41
4.2.2 Volumetrias do leitor 3 e leitor 2.....	43
4.2.3 Volumetrias do leitor 1 e leitor 2.....	45
5 DISCUSSÃO.....	48
5.1 TÉCNICAS DE VOLUMETRIA.....	48
5.2 ÁREAS DE INTERESSE.....	48
5.3 HIPOCAMPO COMO BIOMARCADOR.....	49
5.4 COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO INTRACLASSE.....	51
5.5 VANTAGENS.....	52
5.6 LIMITAÇÕES.....	52
6 CONCLUSÃO.....	53
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 ANATOMIA DO HIPOCAMPO

Em 1877 Paul Broca definiu o grande lobo límbico como sendo formado pelos giros parahipocampal e do cíngulo. Décadas depois (1973), James Papez descreveu o circuito das emoções sendo constituído pelo giro do cíngulo, giro parahipocampal, hipocampo, fórnix, corpo mamilar, núcleos anteriores do tálamo e giro do cíngulo [1]. O hipocampo faz parte do sistema límbico cuja função esta relacionada à emoção e memória. Ele se localiza na região medial do lobo temporal e é formado pelo arquicórtex, um tipo de córtex antigo e menos complexo do que o neocórtex [2]. (Figura 1)

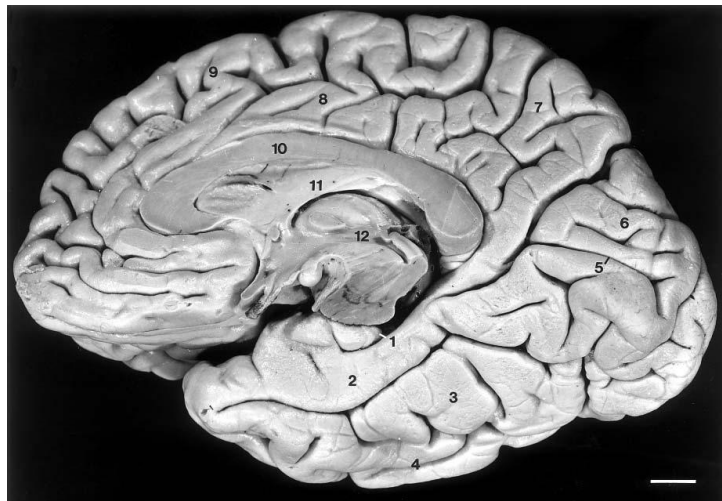


Figura 1- (Figura adaptada de Durvenoy, 2005) [3] Peça anatômica mostrando a porção ínfero-medial do hemisfério direito. 1- hipocampo, 2- giro parahipocampal, 3- giro fusiforme, 4- giro temporal inferior, 5- sulco calcarino, 6- lobo occipital, 7- lobo parietal, 8- giro do cíngulo, 9- lobo frontal, 10- corpo caloso, 11- fórnix, 12- terceiro ventrículo.

O hipocampo é bilaminar e composto por duas regiões (corno de Amon e giro denteado) com uma lâmina enrolada sobre a outra formando os sulcos vestigial e

superficial do hipocampo [4]. (Figura 2)

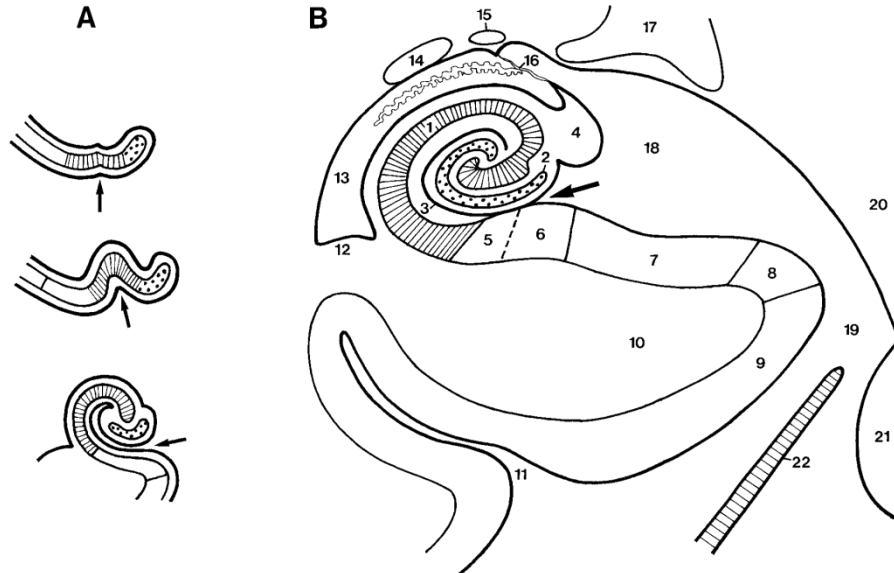
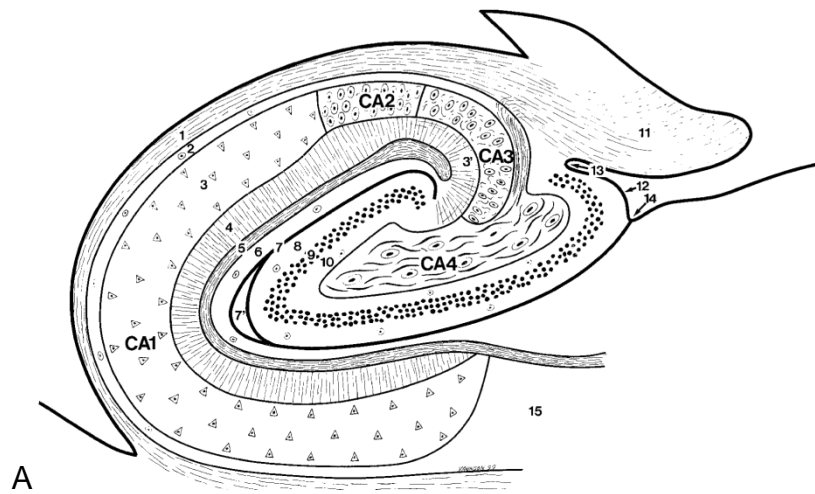


Figura 2 – (Figura adaptada de Durvenoy, 2005) [3] **A** Desenvolvimento do giro denteado (área pontilhada) e do corno de Amon (área listrada) até **B** a sua posição definitiva. A seta indica o sulco do hipocampo (parte superficial). 1, Corno Amon; 2, giro denteado; 3, sulco do hipocampo (parte vestigial); 4, fímbria; 5, pró-subículo; 6, subículo; 7, pré-subículo; 8, parassubículo; 9, área entorrinal; 10, giro parahipocampal; 11, sulco colateral; 12, eminência colateral; 13, corno temporal (inferior) do ventrículo lateral; 14, núcleo caudado; 15, estria terminal; 16, plexo coróide; 17, corpo geniculado lateral; 18, asa lateral da cisterna ambiens; 19, cisterna ambiens; 20, mesencéfalo; 21, ponte; 22, tentório do cerebelo.

Ambas as regiões possuem três camadas, formadas por dois tipos de células principais: as células granulares do giro denteado e as células piramidais do Corno de Amon (CA). O CA se subdivide nos setores CA1, CA2, CA3 e CA4 e suas três camadas são molecular, piramidal e polimórfica. Estas, devido à diferença na organização dos axônios e dendritos, são subdivididas em seis lâminas: o álveo do hipocampo, *stratum oriens*, estrato piramidal, estrato radiado, estrato lacunoso e estrato molecular. As três camadas do giro denteado são camada molecular, camada granular, e neurônios da região polimórfica do giro denteado que, entre outros tipos neuronais, contêm as células musgosas [4]. (Figura 3)



B

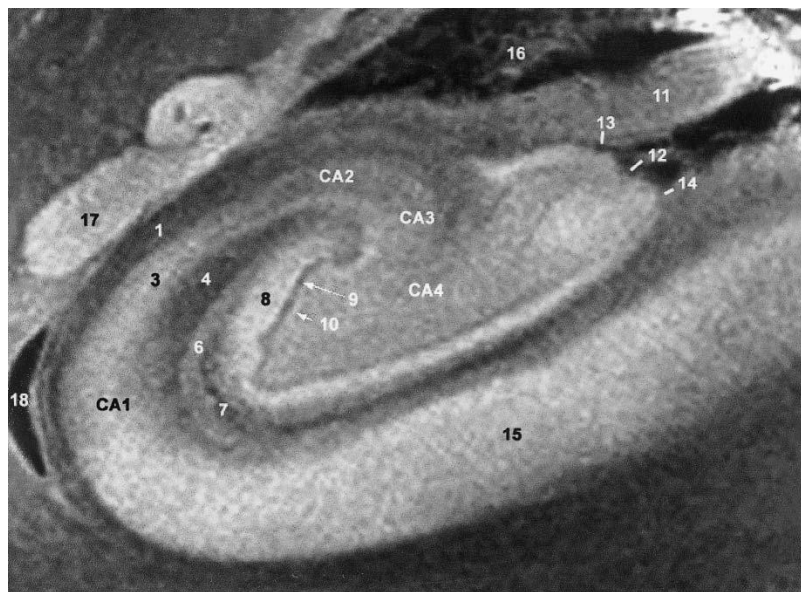


Figura 3 - (Figura adaptada de Durvenoy, 2005) [3] A, Diagrama; B corte coronal de RM de 9.4T do hipocampo. Corno Amon CA1 – CA4: 1, álveos; 2, *stratum oriens*; 3, estrato piramidal; 3', *stratum lucidum*; 4, estrato radiado; 5, estrato lacunoso; 6, estrato molecular; 7, sulco vestigial do hipocampo. Giro denteado: 8, estrato molecular; 9, estrato granular 10, camada polimórfica; 11, fímbria; 12, *margo denticulatus*; 13, sulco fimbrio-denteado; 14, sulco superficial do hipocampo; 15, subículo; 16, plexo coróide; 17, núcleo denteado; 18, corno temporal (inferior) do ventrículo lateral.

O hipocampo tem 4 a 4,5 cm de comprimento e se divide em três partes: (Figura 4)

- A cabeça, segmento anterior com 1,5 a 2 cm de largura.
- O corpo, segmento mediano com 1 cm de largura.
- A cauda, segmento posterior com 0,5 cm de largura.

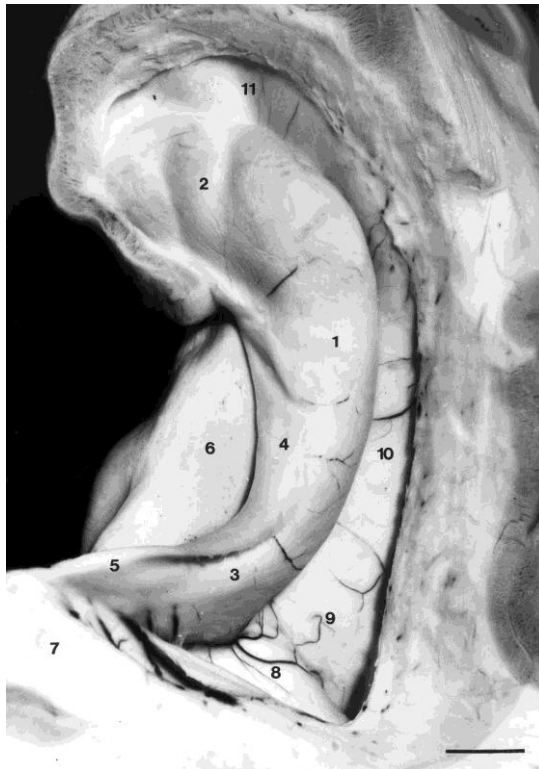


Figura 4– (Figura adaptada de Durvenoy, 2005) [3] Parte intraventricular do hipocampo. O corno temporal foi aberto e retirado o plexo coróide. 1- corpo do hipocampo, 2- cabeça e digitações internas do hipocampo, 3- cauda do hipocampo, 4 – fímbria, 5- crus do fórnix, 6- subículo, 7- esplênio do corpo caloso, 8- calcar avis, 9- trígono colateral, 10- eminência colateral, 11- recesso uncal do corno temporal.

A Cabeça do Hipocampo

A cabeça do hipocampo é dividida em parte intraventricular, digitações e uncal. A parte intraventricular contém 3 a 4 digitações formadas por um obstáculo levando a dobradura durante o seu desenvolvimento.

A parte uncal (extraventricular) ou segmento anterior do giro parahipocampal se curva sobre si mesmo e é separado pelo sulco uncal. O uncus é dividido, sendo que o segmento anterior faz parte do lobo piriforme e o segmento posterior faz parte do hipocampo.

As digitações externas formam dois ou três lóbulos pequenos, convexos e separados pelo sulco sagital. Essas digitações são imagens inversas das digitações internas do hipocampo, visíveis no aspecto intraventricular da cabeça do hipocampo. As digitações externas e internas são formadas principalmente pelo segmento CA1 do corno Amon devido à dobradura do mesmo e variam em espessura. O córtex do corno Amon é espesso no exterior e fino nas digitações internas.

O Corpo do Hipocampo

O corpo do hipocampo é limitado medialmente pela fímbria e lateralmente pela eminência colateral, que marca a protrusão intraventricular do córtex que cobre o sulco colateral. A parte superior do corno temporal cobre a porção intraventricular do corpo do hipocampo, formado pela haste temporal, a cauda do núcleo caudado e a estria terminal. O uncus aparece na junção do corpo e da cabeça do hipocampo, e a ténia da fímbria e estria terminal se unem. Esta união é o véu terminal de Aeby ou ponto inferior do coróide, uma lâmina triangular ligado à superfície superior do uncus de desenvolvimento variável.

A parte superficial do giro denteado é o *margo denticulatus*, composto por protrusões arredondadas que formam os dentes do giro. Normalmente existem cerca de 15 dentes e os maiores são os do meio. Estes são manifestações superficiais da dobradura do giro denteado. A fímbria é uma faixa branca estreita, que esconde o *margo denticulatus* tendo variações individuais.

A Cauda do Hipocampo

A cauda é a parte posterior do hipocampo e é composta por uma camada de corno Amon centrada por extensões digitais do giro denteado. A superfície intraventricular da cauda é densamente coberta pelos álveos e veias subependimais. A parte intraventricular é limitada medialmente pela fímbria e lateralmente pelo

trígono colateral. A superfície plana do trígono colateral e a parte intraventricular da cauda juntos formam o assoalho do átrio [3]. (Figuras 5 e 6)

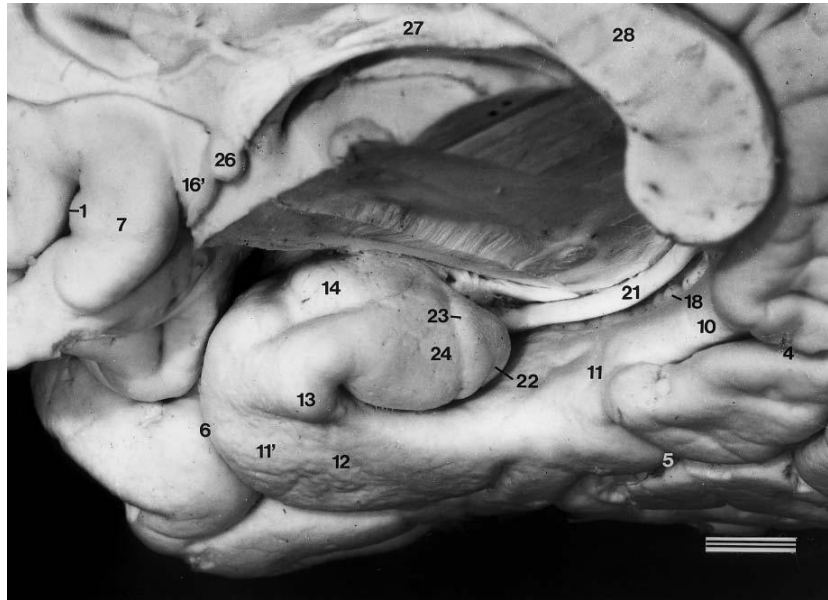


Figura 5 – (Figura adaptada de Durvenoy, 2005) [3] Peça anatômica mostrando um corte sagital do hemisfério direito. O lobo límbico está separado do isocórtex pela fissura límbica. Fissura límbica: 1- sulco paraolfatório anterior, 2- sulco do cíngulo, 3- sulco subparietal, 4- sulco calcário anterior, 5- sulco colateral, 6- sulco rinal. Giro límbico: 7- giro subcaloso, 8- sulco paraolfatório posterior, 9- giro do cíngulo, 10- istmo, 11- giro parahipocampal. Lobo piriforme: 12- área entorrinal, 13- giro ambiens, 14- giro semilunar, 15- córtex pré-piriforme. Giro intralímbico: 16- rudimento pré-hipocampal, 17- *indusium griseum*. Hipocampo: 18- giro denteado, 19- corno Amon, 20- giro Andreas Retzius, 21- fímbria, 22- ápex do uncus, 23- banda de Giacomini, 24- giro uncinado, 25- substância perfurante anterior, 26- comissura anterior, 27- fórnix, 28- corpo caloso [3].

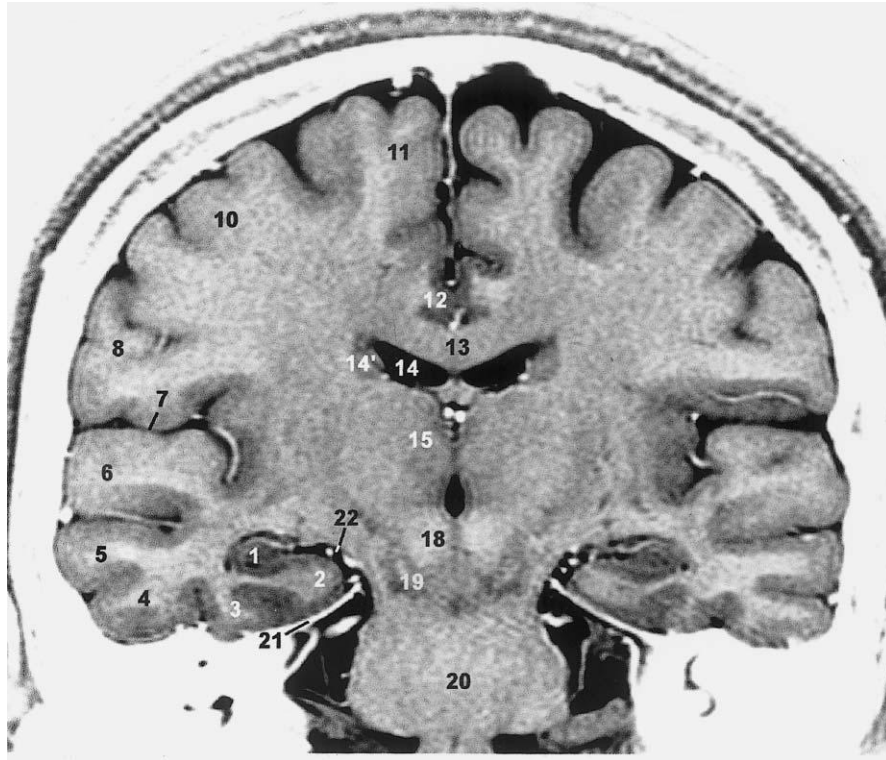


Figura 6 – (Figura adaptada de Durvenoy, 2005) [3] Corte coronal do encéfalo em RM de 3T, imagem em T1. 1- hipocampo, 2- giro parahipocampal, 3- giro fusiforme, 4- giro temporal inferior, 5- giro temporal medial, 6- giro temporal superior, 7- fissura lateral, 8- giro pós-central, 9- sulco central, 10- giro pré-central, 11- giro frontal superior, 12- giro cingulado, 13- corpo caloso, 14- ventrículo lateral, 14'- núcleo caudado, 15- tálamo, 16- putâmen, 17- corno temporal inferior do ventrículo lateral, 18- núcleo rubro, 19- substância negra, 20- ponte, 21- tentório do cerebelo, 22- cisterna ambiens [3]

1.2 A FUNÇÃO DO HIPOCAMPO NA MEMÓRIA

O hipocampo é uma das regiões responsáveis pela memória declarativa, isto é, a capacidade de armazenar e evocar fatos do dia a dia como nomes e acontecimentos [5-6]. Estudos com animais e humanos demonstram a participação do hipocampo em alguns tipos de memória declarativa como a memória episódica, que é a capacidade de evocar experiências pessoais; a memória semântica, que envolve o armazenamento de conceitos; bem como a memória espacial, envolvida no reconhecimento espacial [7-11].

1.3 O HIPOCAMPO NO ENVELHECIMENTO E NAS DOENÇAS

O processo de envelhecimento leva a uma atrofia de todo córtex cerebral assim como o hipocampo [12-13]. Estudos, de fato, têm demonstrado que o hipocampo é vulnerável aos efeitos neurotóxicos de alguns fatores de risco modificáveis como obesidade, diabetes mellitus e hipertensão arterial [14-19]. Além do envelhecimento e fatores de risco, uma redução volumétrica tem sido atribuída a doenças neurológicas como a doença de Alzheimer (DA), demência frontotemporal, doença cerebrovascular, esclerose múltipla, esclerose hipocampal e epilepsia do lobo temporal [20-24].

1.4 OS BIOMARCADORES NA DOENÇA DE ALZHEIMER

Em 1984, não havia menção dos biomarcadores como um dos critérios diagnósticos da DA, que foram estabelecidos pelo grupo de trabalho do Instituto Nacional de Desordens Neurológicas, Comunicativas e Acidente Vascular Cerebral (NINCDS) e Associação da Doença de Alzheimer e Desordens Relacionadas (ADRDA). Na ocasião, o diagnóstico de doença de Alzheimer foi dividido em provável, possível e definitivo [25]:

- Provável: Diagnóstico clínico de demência que é comprovado por uma avaliação objetiva como o Mini-Exame do Estado Mental (MEEM) ou avaliação neuropsicológica evidenciando comprometimento de duas ou mais funções cognitivas como linguagem (afasia), função executiva (apraxia) e percepção (agnosia). O início dos sintomas é insidioso, a evolução progressiva e ocorre comprometimento da funcionalidade e alteração do comportamento. A doença surge entre 40 a 90 anos (mais comum depois dos 65) e pode haver outros casos na família. Para definir o diagnóstico, é necessário excluir outras doenças sistêmicas, neurológicas, transtornos psiquiátricos e distúrbio de consciência que podem afetar a cognição. Em relação aos exames, espera-se um exame do líquido cefalorraquidiano (LCR)

normal, eletroencefalograma normal ou com achados inespecíficos (ondas lentas) e atrofia cerebral na tomografia computadorizada (TC) de crânio seriada.

- Possível: Demência que se caracteriza por uma variação no início, forma de apresentação ou progressão. É necessário que exista uma segunda doença sistêmica ou neurológica suficiente para causar demência, porém que não seja a causa principal.

- Definitivo: Critério clínico de provável doença de Alzheimer com exame histopatológico compatível (emaranhados neurofibrilares e proteína beta amilóide).

Nestes critérios, a TC de crânio servia apenas para excluir outras doenças neurológicas como hematoma subdural, tumores, hidrocefalia e doença vascular. O grupo de trabalho pondera que a atrofia não pode ser usada como critério diagnóstico em casos individuais. No que se refere à ressonância magnética (RM) do encéfalo, não havia estudos em demência, porém esperava-se um potencial em diferenciar a DA de demência multi-infarto e hidrocefalia de pressão normal [25].

Ao longo dos anos, a comunidade científica tem tido interesse nesta área e pesquisas foram surgindo sobre os biomarcadores com o objetivo de tentar estabelecer um diagnóstico preciso e precoce na fase pré-clínica e declínio cognitivo leve (DCL) da DA para ensaios clínicos e como instrumento diagnóstico [26].

Em virtude das evidências encontradas, vinte e sete anos depois, o grupo de trabalho do NINCDS e ADRDA se reuniu novamente para revisar os critérios. Entre outras modificações, foram incluídos os biomarcadores como evidência do processo fisiopatológico da DA. Contudo, foi feita uma ressalva para não usá-los na definição diagnóstica, mas em estudos, ensaios clínicos e como uma ferramenta diagnóstica adicional quando for disponível e considerado conveniente pelo médico assistente. Incluem-se entre os biomarcadores; a atrofia desproporcional do lobo temporal medial (LTM), basal, lateral e córtex medial parietal pela RM; a captação de 18-fluorodeoxyglicose e beta-amilóide na tomografia por emissão de pósitrons (PET) e beta-amilóide, proteína tau fosforilada e total no LCR [27-28].

Com a intenção de estudar os biomarcadores, em 2003 foi criada a Iniciativa de Neuroimagem na Doença de Alzheimer (ADNI) em parceria com o Instituto Nacional do Envelhecimento (NIA), Instituto Nacional de Imagem Biomédica e Bioengenharia (NIBIB), *Food and Drug Administration* (FDA), empresas farmacêuticas e organizações sem fins lucrativos. O objetivo era avaliar se a RM, PET, biomarcadores plasmáticos, do LCR e a avaliação neuropsicológica poderiam detectar a progressão do declínio cognitivo leve em doença de Alzheimer. O ADNI possui um banco de dados disponível ao público com esses biomarcadores para pesquisas nesta área que resultou em outros estudos [29-34].

1.5 A VOLUMETRIA DO HIPOCAMPO COMO BIOMARCADOR NA DOENÇA DE ALZHEIMER

Alguns estudos demonstraram que a volumetria do hipocampo possa ser uma ferramenta útil na detecção e acompanhamento de pacientes com DA [35]. Inclusive, há evidências de que a atrofia de alguns segmentos do hipocampo seja mais acentuada (córtex entorrinal, subículo, CA1, zona de transição entre o CA1-CA2 e CA3 com giro denteado) no envelhecimento, DCL e DA [36-38].

Uma metanálise mostrou que os biomarcadores do LCR e RM não foram sensíveis na fase pré-clínica da DA. Foram avaliados estudos longitudinais de 2003 a 2008 sobre biomarcadores (nível de tau e beta-amilóide no LCR e a atrofia das estruturas do LTM pela RM) na detecção de DA pré-clínica em indivíduos submetidos aos testes cognitivos. O resultado foi que os testes de memória com evocação tardia foram melhores em detectar DA em indivíduos normais e com DCL do que a atrofia do hipocampo ou outras estruturas do LTM. A acurácia prognóstica dos parâmetros do LCR é semelhante aos testes de memória, mas melhor do que a atrofia pela RM. Na fase pré-clínica da doença, a acurácia dos biomarcadores do LCR aumenta; enquanto próximo ao momento do diagnóstico, os testes de memória e a atrofia do LTM aumentam [39].

Schott e colaboradores demonstraram que a amostra necessária em ensaios clínicos controlados com placebo pode ser reduzida se houver o ajuste da volumetria

dos biomarcadores pelas características basais dos indivíduos. Isto ocorre porque leva em consideração o envelhecimento e a variabilidade individual. Os biomarcadores estudados foram o volume cerebral total, hipocampal e o alargamento ventricular de pacientes com DCL e DA [40].

No estudo de Tiepel e colaboradores, em 12 centros de estudo na Alemanha, a volumetria do hipocampo e amígdala em pacientes com DA e DCL comprovou ser um parâmetro confiável mesmo em estudos multicêntricos. O tamanho da amostra necessária para o estudo, inclusive, não foi afetada comparada aos estudos monocêntricos [41].

1.6 TÉCNICAS DE VOLUMETRIA

A ressonância magnética é o método de escolha para medir o volume cerebral total *in vivo* [42-44], ventrículos [45-47] e estruturas do lobo temporal medial como hipocampo, córtex entorrinal e córtex posterior do cíngulo, que estão alterados na DA [48-51]. As técnicas em uso com execução mais simples ou complexa incluem métodos manuais, semiautomáticos e automáticos com diferentes programas e protocolos [52-54]. Apesar do avanço tecnológico nesta área, o traçado manual continua sendo o método mais eficaz e de menor custo, entretanto, é o que mais consome tempo, limitando sua aplicação clínica [55].

A medição manual da volumetria do hipocampo é considerada eficaz e é o padrão ouro para validar algoritmos de medição automatizada [55]. No entanto, os protocolos encontrados na literatura para delinear manualmente o hipocampo são heterogêneos levando a resultados variados entre os estudos [56]. Neste sentido, um grupo internacional EADC-ADNI (Centros Europeus de Doença de Alzheimer, Iniciativa de Neuroimagem na Doença de Alzheimer) tem trabalhado para desenvolver um protocolo consensual (*Hippocampal Harmonization Effort*) [57-59].

O programa Osirix®, Pixmeo, Genebra, Suíça (<http://www.osirix-viewer.com/>) é um visualizador DICOM® (Comunicação de Imagens Digitais em Medicina), baseado em plataforma Apple®, distribuído em várias versões, incluindo uma de 32

bits, que é gratuita. É uma aplicação com bom desempenho e amplamente difundida entre os radiologistas e demais especialistas que utilizam imagens médicas na sua prática diária. A versão gratuita não é aprovada para uso clínico pelo FDA (*Food and Drug Administration*) americano ou pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) brasileira.

Alguns dos programas utilizados na medição da volumetria são igualmente gratuitos como o *Statistical Parametric Mapping, Wellcome Trust Centre for Neuroimaging*, UK (<http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/>), que, entretanto, precisa do Matlab® Mathworks® (<http://www.mathworks.com/products/matlab/>) para funcionar e este é pago e complexo. O MIPAV®, Institutos Nacionais da Saúde (NIH), EUA (<http://mipav.cit.nih.gov/>) é gratuito, entretanto, não é fácil de usar, nem intuitivo e é pouco difundido no meio radiológico.

2 OBJETIVOS

- Desenvolver uma técnica de medição volumétrica manual do hipocampo utilizando o visualizador Osirix®, versão 5,6.
- Realizar a comparação interobservador da medição do hipocampo com a mesma técnica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo de confiabilidade interobservador das medidas volumétricas manuais do hipocampo no intuito de avaliar a validade interna da técnica apresentada.

3.1 AMOSTRA

Dispusemos de uma amostra de conveniência constituída por 12 indivíduos com os critérios de inclusão e exclusão detalhados abaixo.

3.1.1 Critérios de Inclusão

Foram incluídos pacientes do Centro Multidisciplinar do Idoso sem queixa de esquecimento, com 60 anos ou mais de idade, hábeis a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e que realizaram a RM por uma indicação clínica outra qualquer como cefaleia. Eles não tinham critérios clínicos de declínio cognitivo leve nem demência pelos critérios do DSMIV (Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais IV) [60].

3.1.2 Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram indivíduos com contraindicação a realização de ressonância magnética, como clipe metálico cerebral, prótese coclear, marca-passo cardíaco ou cerebral e fragmentos metálicos nas partes moles e história ou achados de imagem de doenças cerebrais como isquemia, hematoma subdural,

hemorragia, hidrocefalia, tumor ou cirurgia cerebral. O achado de focos de hipersinal não foi considerado um critério de exclusão.

3.1.3 Avaliação médica

Os pacientes foram submetidos à avaliação médica que incluiu uma seleção baseada nos critérios de inclusão e exclusão, assinatura do TCLE, história clínica e exame físico.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FM/UnB (CEP-FM 080/2011).

3.2 TÉCNICA

Osirix® 5,6, versão de 32bits, baixado diretamente do sítio da Pixmeo (<http://www.osirix-viewer.com/Downloads.html>) em Macbook Air, processador 1,8GHz Intel Core i5, HD graphics 4000 512 MB, memória RAM 4GB 1600MHz DDR3, utilizando a versão do sistema operacional (OSX) versão 10,8,5. As imagens de ressonância magnética do encéfalo foram obtidas em aparelho de RM de 1,5T GE (Milwaukee, WI, EUA), com bobina de 8 canais.

O protocolo de exame incluiu as sequências sagitais T1; axiais FLAIR, gradiente, T1, T2, difusão e coronal T2. A este protocolo foram adicionadas sequências de estudo do hipocampo (protocolo de demência – coronais FLAIR e T2) e sequência volumétrica gradiente eco ponderada em T1 (*Spoiled Gradient Recalled Echo* - SPGR - TR: 12ms e TE: 5ms), corte de 1mm e intervalo de 0,1mm. Os exames foram avaliados por radiologista experiente (>10 anos) quanto a sua qualidade e eventuais achados e excluídos aqueles que apresentaram alguma lesão estrutural.

3.3 DELIMITAÇÃO DO HIPOCAMPO

Os dados foram transferidos para uma estação de trabalho onde foram realizadas as medidas da volumetria dos hipocampos por três leitores; dois médicos residentes de radiologia do terceiro ano (R3- leitor 1 e leitor 2) e uma médica geriatra sem experiência prévia de processamento de imagens (leitor 3). Foi usada uma delimitação visual específica do hipocampo com algumas variações descritas abaixo [29][57-59]. (*Harmonized protocol for Hippocampal Segmentation*, <http://www.hippocampal-protocol.net>).

- Borda anterior - Nesta borda é difícil a diferenciação do hipocampo que se encontra abaixo da amígdala, por isso, optou-se por esperar o aparecimento do álveo superiormente ou do líquido cefalorraquidiano do ventrículo traçar um limite látero-inferior do hipocampo para iniciar a medição. (Figura 7)

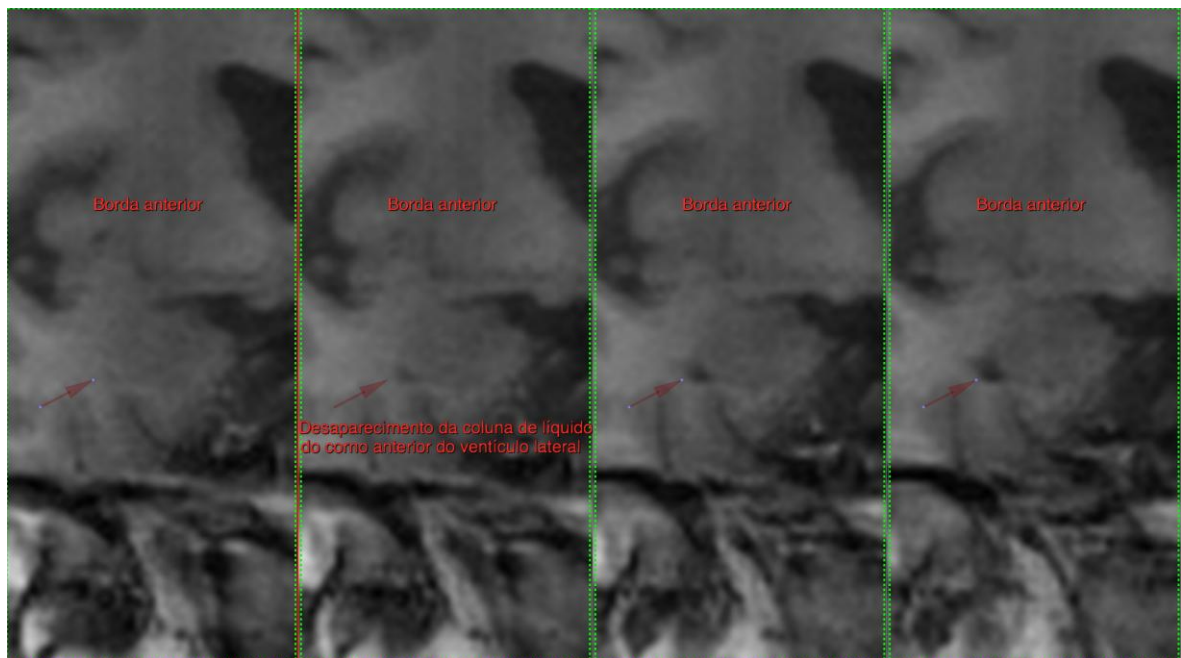


Figura 7- Borda anterior do hipocampo.

- Borda superior - O hipocampo esta abaixo do limite da substância branca do álveo, fímbria e líquido cefalorraquidiano do ventrículo lateral. (Figura 8)

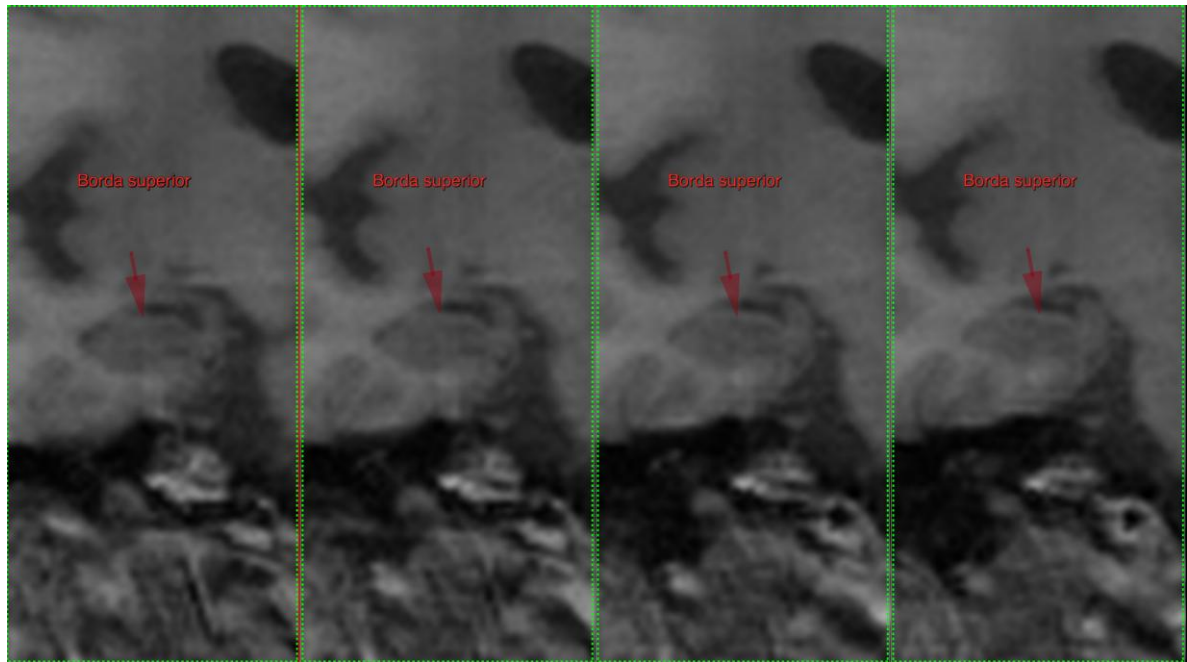


Figura 8- Borda superior do hipocampo.

- Borda inferior - o hipocampo é a substância cinzenta que esta acima da substância branca do giro parahipocampal. (Figura 9)

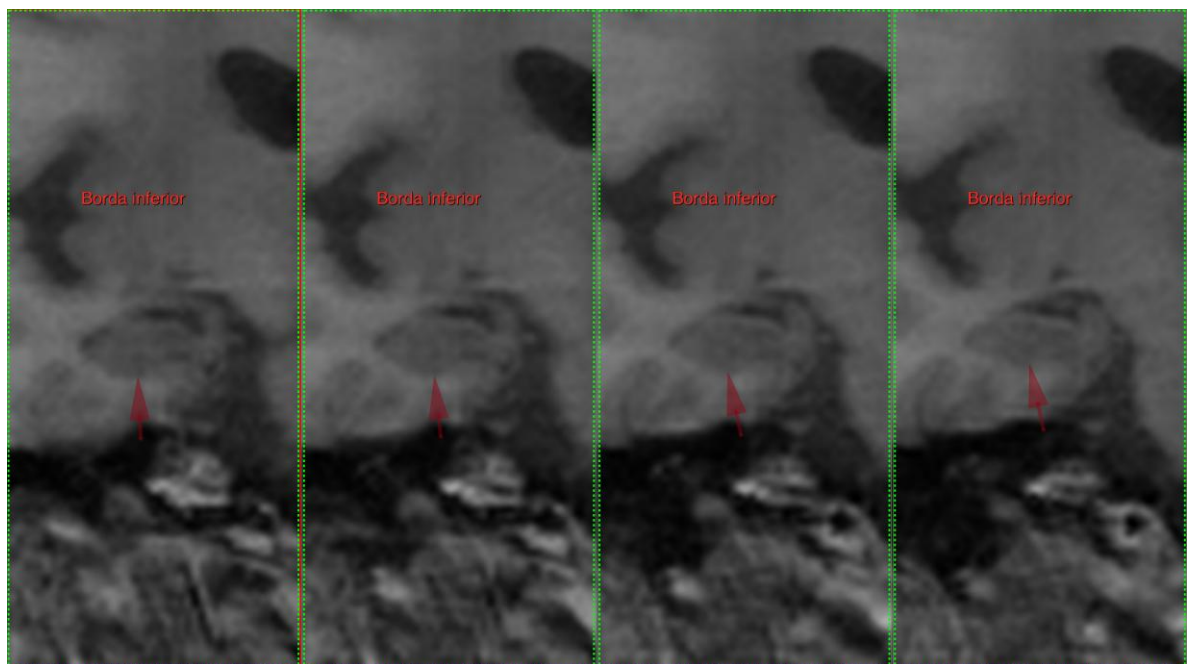


Figura 9- Borda inferior do hipocampo.

- Borda lateral - o líquido cefalorraquidiano do ventrículo lateral traça o limite lateral do hipocampo. (Figura 10)

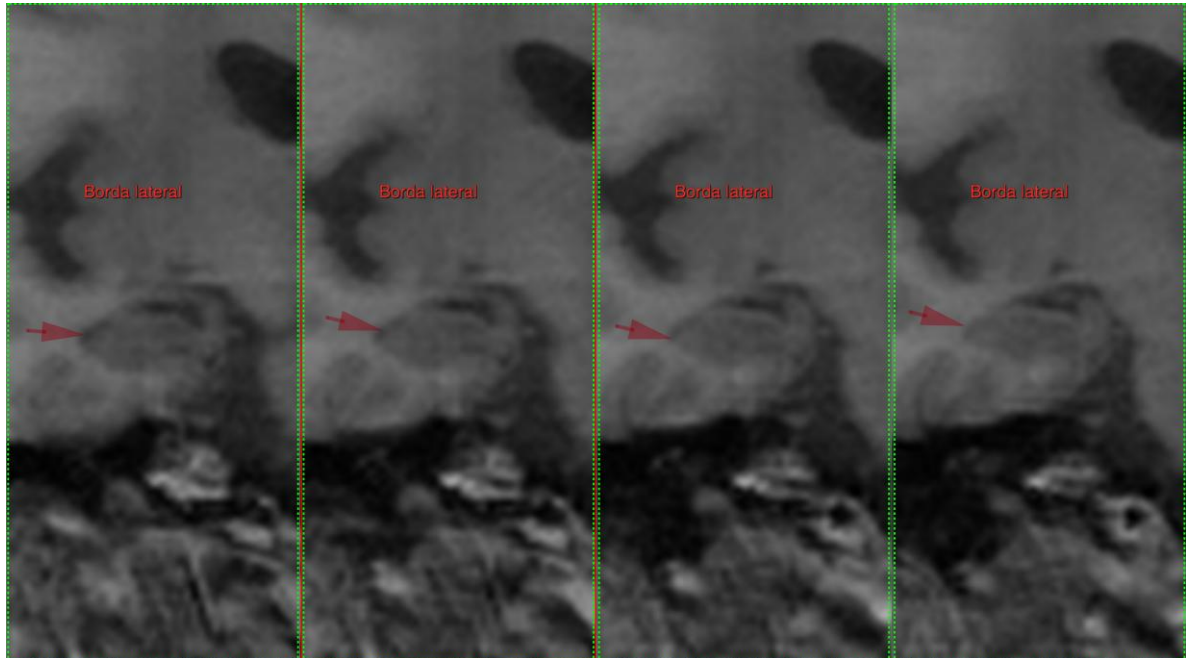


Figura 10- Borda lateral do hipocampo.

- Borda medial superior (demarcação medial do giro denteado) – o líquido cefalorraquidiano da cisterna ambiens traça o limite medial superior. (Figura 11)

- Borda medial inferior (delimita a borda inferior do corno Amon) – uma linha irregular limita a substância branca do giro parahipocampal da substância cinzenta do hipocampo sendo que acima é o hipocampo e abaixo é o giro parahipocampal. (Figura 11)

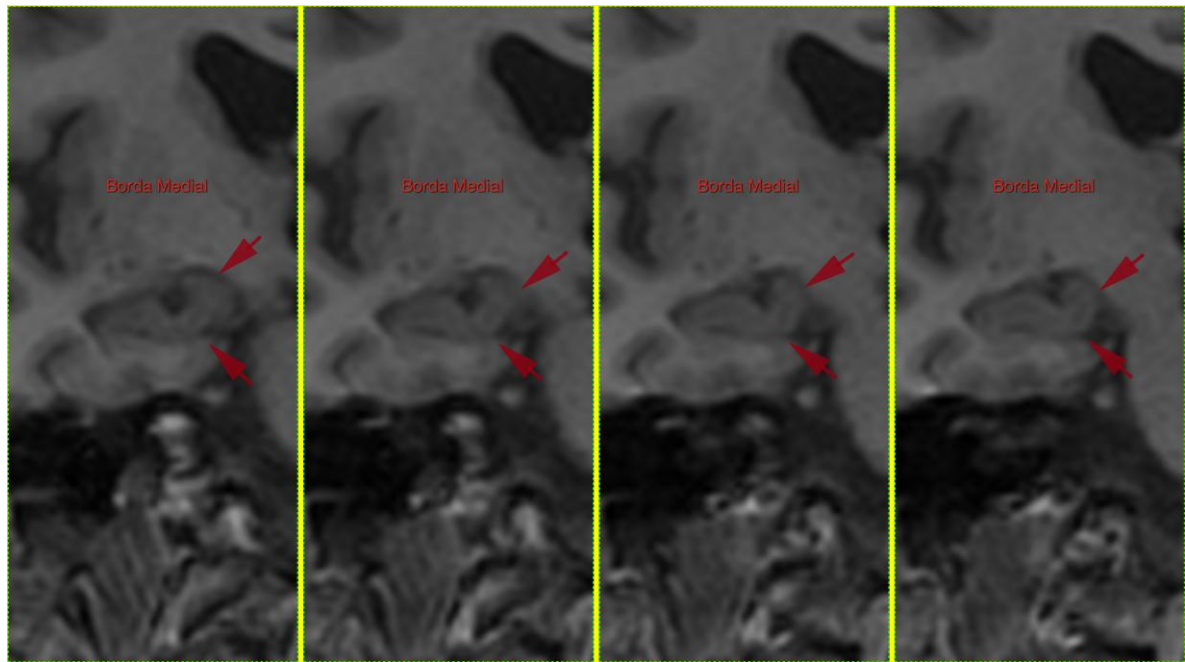


Figura 11 – Borda medial do hipocampo.

- Borda posterior- na extremidade posterior do hipocampo a substância cinzenta da sua cauda apresenta uma formação ovoide e depois desaparece. Foi escolhido um limite diferente do protocolo consensual que é a visualização da cruz do fórnix em sua extensão máxima bilateralmente para a última medição pela maior facilidade em visualizar esta estrutura [61-64]. (Figura 12)

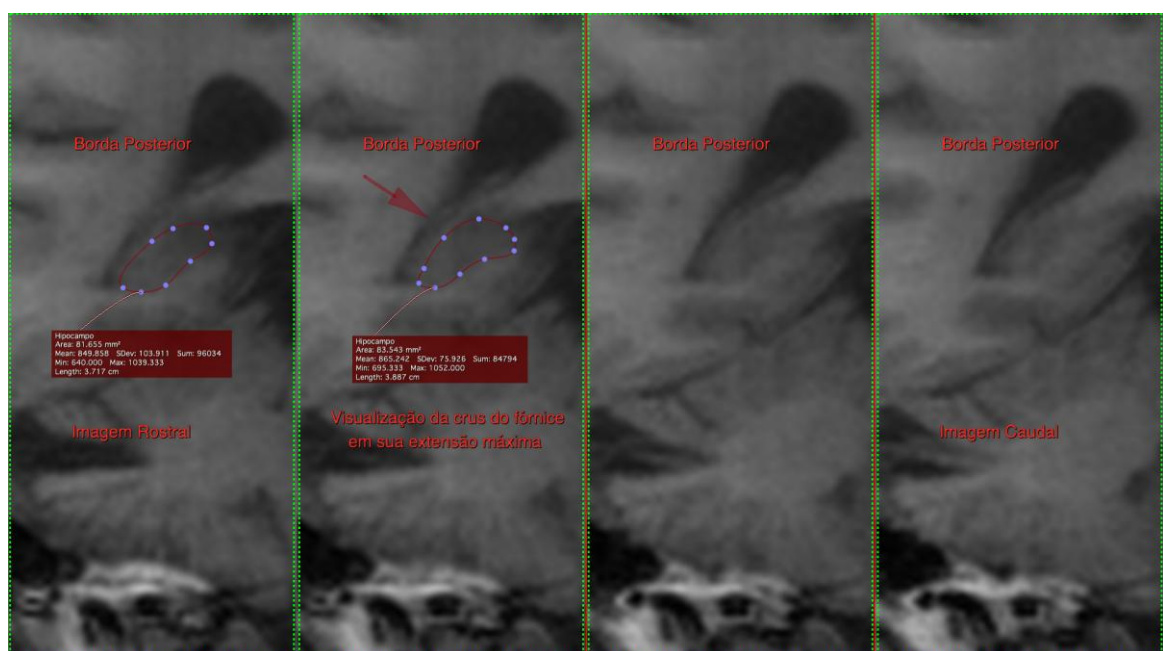


Figura 12- Borda posterior do hipocampo.

3.4 MEDIÇÃO MANUAL DA VOLUMETRIA DO HIPOCAMPO

Foi analisado um hipocampo por vez; direito ou esquerdo sem ordem específica. Primeiramente, no mínimo dez cortes foram escolhidos da borda anterior até a extremidade posterior do hipocampo preferencialmente quando houvesse uma mudança na sua conformação visual. Em cada corte, foi realizado um traçado manual da área de interesse (*ROI*- região de interesse), neste caso, o hipocampo, com o cursor de ferramenta pincel (*brush tool*) no modo desenhar (*draw*) de espessura 1 guiado pelo *mouse* do computador. A ferramenta pincel aparece ao teclar a letra “B” do teclado e depois deve-se escolher entre a opção “desenhar” ou “apagar” e a espessura do pincel varia de 1 a 20. Em seguida, foi preenchida toda esta área com o pincel de espessura 2. Neste momento, era possível corrigir o traçado com o pincel no modo apagar (*erase*), caso fosse necessário. Depois do traçado manual, selecionou-se na barra de ferramentas o comando *ROI* e ao aparecer algumas opções escolheu-se *ROI volume* (volume da área de interesse) e *generate missing ROI* (gerar áreas de interesse), para gerar as áreas subsequentes automaticamente. (Figura 13) Posteriormente, cada imagem nova foi avaliada para correção manual dos possíveis erros do programa. Finalmente, repetiu-se a sequência *ROI* e *ROI volume* novamente, mas desta vez com o comando *compute volume* (computar volume) para calcular o volume total de todas as áreas de interesse e gerar uma imagem correspondente em três dimensões (3D). (Figura 14) Todo o procedimento durou em média 20 minutos para cada hipocampo.

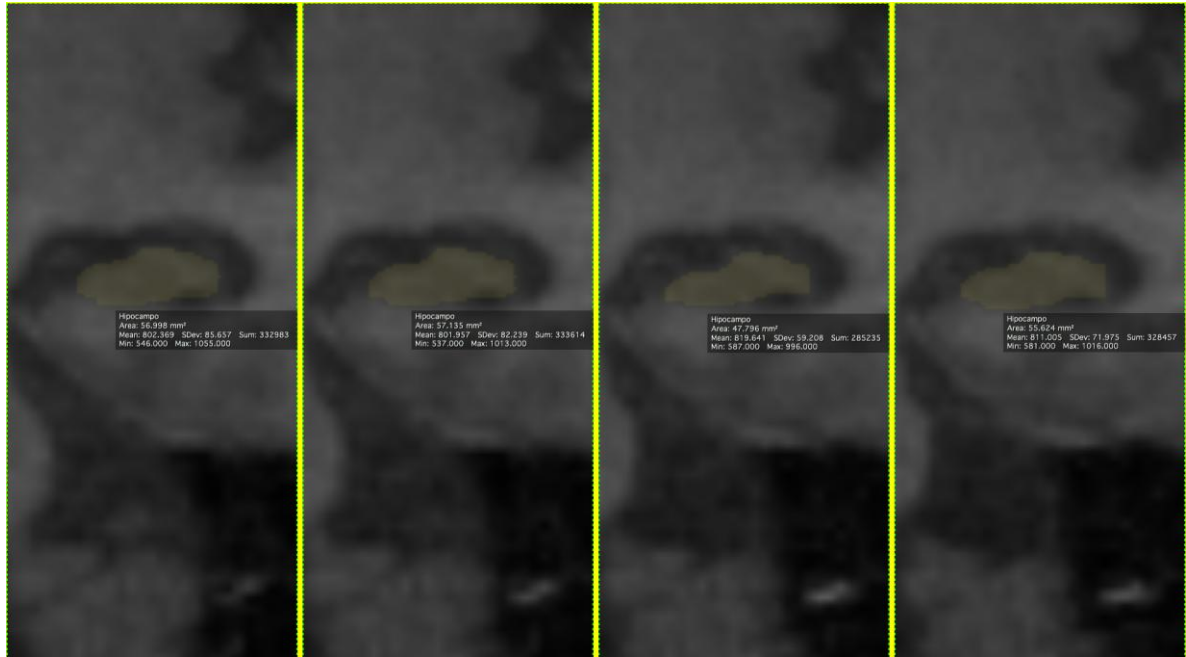


Figura 13- Imagens subsequentes do hipocampo geradas.

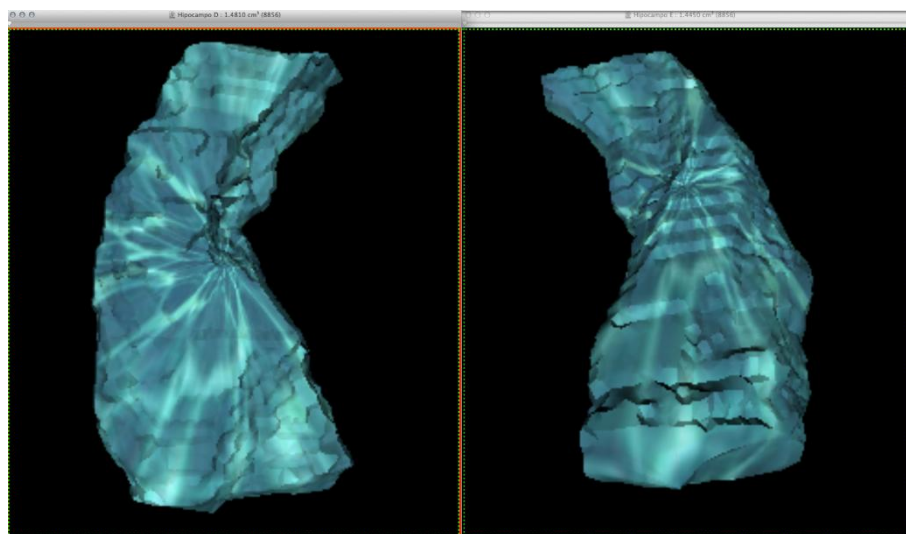


Figura 14 – Imagens em 3D do hipocampo.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os coeficientes de correlação intraclasse (ICC) foram calculados, com um intervalo de 95% de confiança, para determinação de uma medida de confiabilidade relativa entre as volumetrias dos três leitores. Estes coeficientes foram calculados para uma Análise de Variância (ANOVA) a dois fatores baseado em concordância absoluta. Valores de ICC superiores a 0,75 representam uma concordância excelente, valores entre 0,40 a 0,75 uma concordância moderada e valores inferiores a 0,40 uma baixa concordância [65]. Para examinar a relação entre os avaliadores, o gráfico Bland-Altman foi construído [66]. Ele permite uma inspeção visual da relação entre os avaliadores produzindo um gráfico da diferença entre os testes contra a sua média com um intervalo de 95% de confiança (níveis de concordância). Viés sistemático pode ser estimado desses gráficos, como também a heterocedasticidade pode ser determinada.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DOS PARTICIPANTES E VOLUMETRIAS

Treze indivíduos foram submetidos à avaliação médica e RM encefálica e um foi excluído por apresentar uma isquemia em região de artéria cerebral média direita com acometimento do hipocampo. Doze indivíduos foram selecionados para participar do estudo. Todos são do sexo feminino, com média de idade de 75 anos (Tabela 1). As volumetrias dos hipocampos, medidas pelos três leitores, são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 1- Características dos Participantes

Pacientes	Gênero	Idade
AOC	Fem	76
CSS	Fem	66
DCC	Fem	83
EM S	Fem	84
HAO	Fem	68
IPSS	Fem	69
JRB	Fem	71
LBS	Fem	74
MPV	Fem	80
MPB	Fem	85
MCGC	Fem	71
YCM	Fem	76

Tabela 2 - Volumetrias dos Hipocampos em cm³

	Leitor 1		Leitor 2		Leitor 3	
	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo
AOC	1,49	1,33	1,71	1,39	1,36	1,7
CSS	1,69	1,51	1,61	1,6	1,27	1,5
DCC	1,53	1,03	1,82	1,55	1,4	1,51
EM S	0,88	0,77	1,29	1,23	1,38	1,2
HAO	0,95	0,94	1,4	1,19	0,97	1,06
IPSS	1,42	1,11	1,44	1,38	1,55	1,97
JRB	1,5	1,34	1,38	1,33	1,25	1,42
LBS	1,39	1,19	1,64	1,55	1,46	1,63
MPV	0,8	0,8	1,41	1,11	1,25	1,29
MPB	1,48	1,45	1,85	1,53	1,56	1,41
MCGC	1,35	1,13	1,69	1,73	1,36	1,09
YCM	0,99	1,08	1,46	1,06	1,39	0,89

4.2 COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO INTRACLASSE

Após a análise estatística, verificou-se que todos os coeficientes de correlação intraclassa apresentaram valores abaixo de 0,40, indicando uma baixa concordância entre os avaliadores (Tabela 3).

Tabela 3 - Coeficiente de Correlação Intraclassa (ICC) calculados para uma ANOVA a dois fatores baseado em concordância absoluta

Avaliadores	Lado	ICC (IC 95 %)
Leitor 3 e Leitor 1	Direito	0,315 (-0,301; 0,741)
Leitor 3 e Leitor 2	Direito	0,254 (-0,135; 0,662)
Leitor 1 e Leitor 2	Direito	0,378 (-0,122; 0,763)
Leitor 3 e Leitor 1	Esquerdo	0,266 (-0,159; 0,677)
Leitor 3 e Leitor 2	Esquerdo	0,371 (-0,280; 0,773)
Leitor 1 e Leitor 2	Esquerdo	0,357 (-0,124; 0,748)

4.2.1 Volumetrias do leitor 3 e leitor 1

Com relação às medições dos hipocampos direitos, o Leitor 3 tende a atribuir valores maiores de volume do que o Leitor 1, no entanto, esse viés não foi

estatisticamente significativo ($p = 0,4693$). Desse modo, a distribuição espacial dos pontos se apresenta de forma dispersa ao longo dos valores de volume do hipocampo, caracterizando uma baixa concordância entre os avaliadores (Figura 15).

Ao avaliar os hipocampus esquerdos, o Leitor 3 também tende a atribuir valores maiores de volume do que o Leitor 1, apresentando um viés estatisticamente significativo ($p=0,0171$). Assim, os pontos também se apresentam de forma dispersa, caracterizando uma baixa concordância entre os avaliadores e há presença de um ponto discrepante além do limite de concordância (Figura 16).

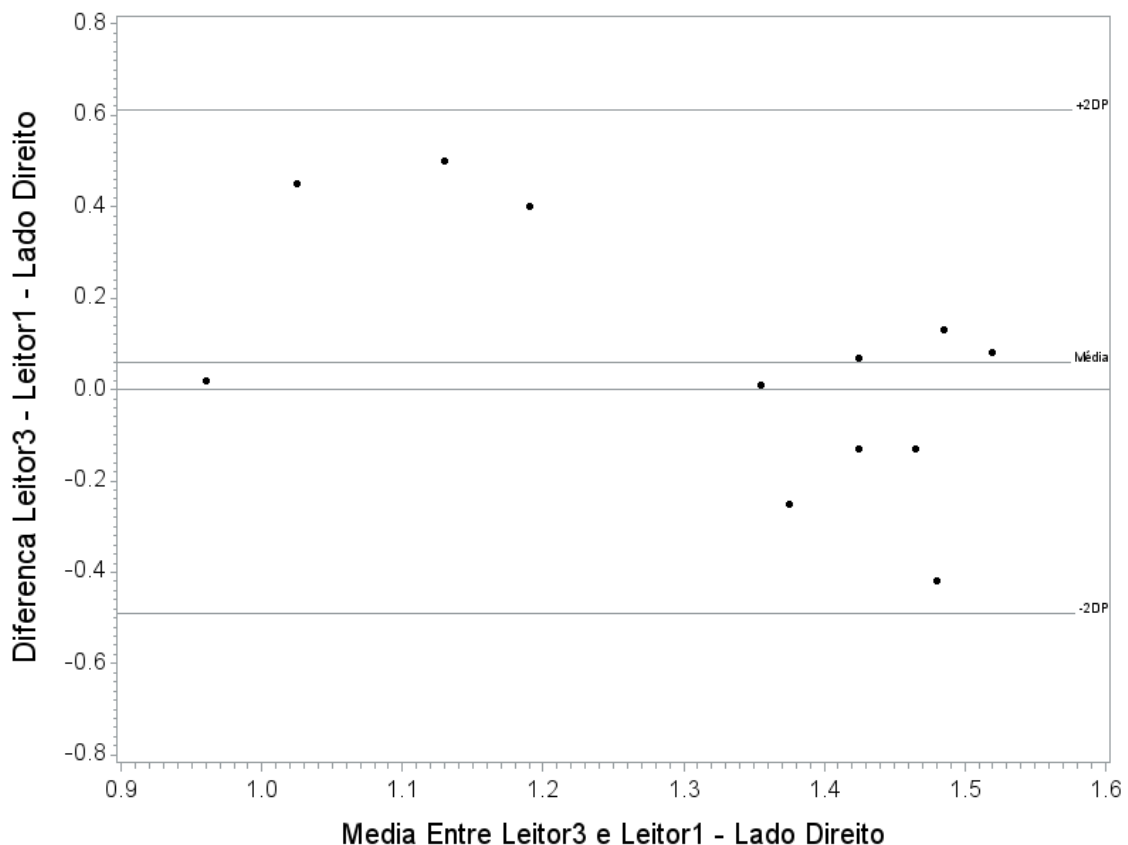


Figura 15- Gráfico de Bland-Altman com a distribuição espacial dispersa dos pontos ao longo dos valores de volume do hipocampo direito entre o Leitor 3 e o Leitor 1.

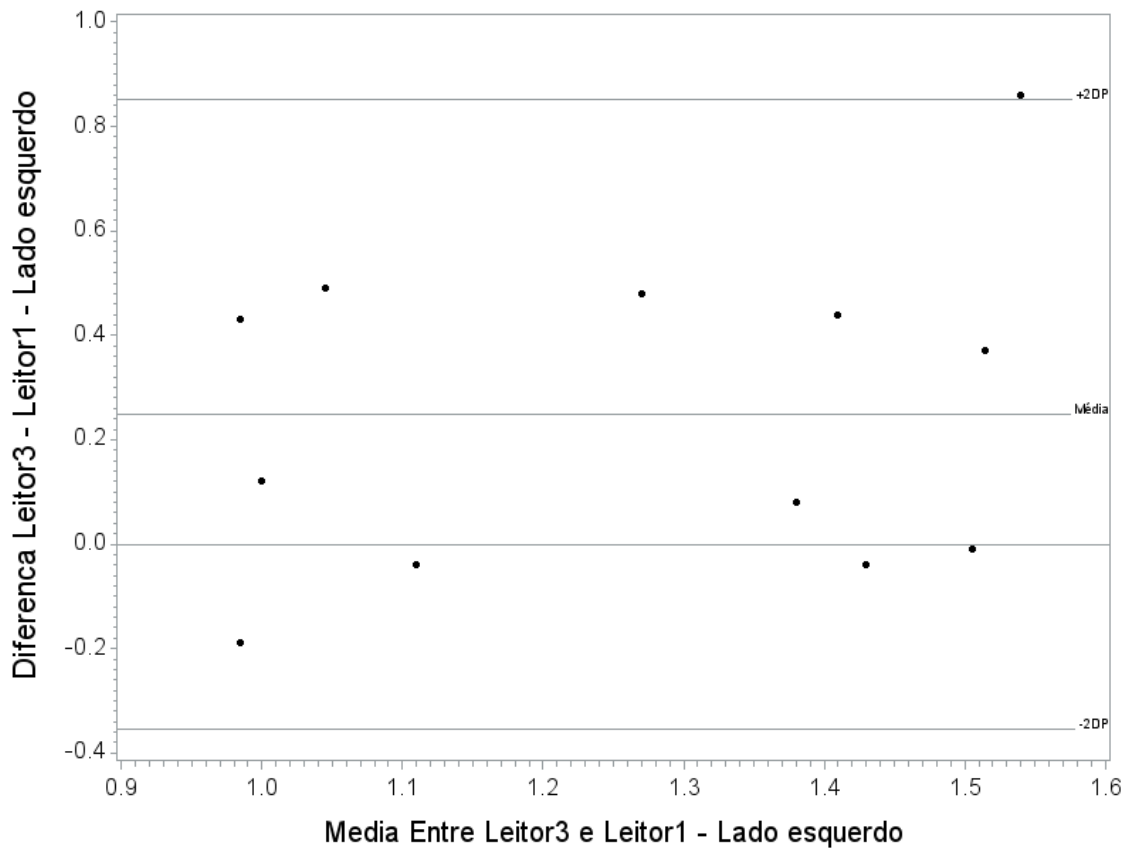


Figura 16 - Gráfico de Bland-Altman com a distribuição espacial dispersa dos pontos ao longo dos valores de volume do hipocampo esquerdo entre o Leitor 3 e o Leitor 1 com um ponto discrepante além do limite de concordância.

4.2.2 Volumetrias do leitor 3 e leitor 2

Ao comparar as medidas do hipocampo direito, o Leitor 3 tende a atribuir valores menores de volume do que o Leitor 2, apresentando um viés estatisticamente significativo ($p = 0,0024$). De fato, a distribuição espacial dos pontos se apresenta de forma dispersa ao longo dos valores de volume do hipocampo, caracterizando uma baixa concordância entre os avaliadores (Figura 17).

Na análise do lado esquerdo, em média, o Leitor 3 tende a atribuir valores praticamente iguais de volume de hipocampo que o Leitor 2 ($p = 0,9849$). Contudo, a distribuição dos pontos se apresenta de forma relativamente dispersa e há presença

de dois pontos fora do limite de concordância, caracterizando uma baixa concordância entre os avaliadores (Figura 18).

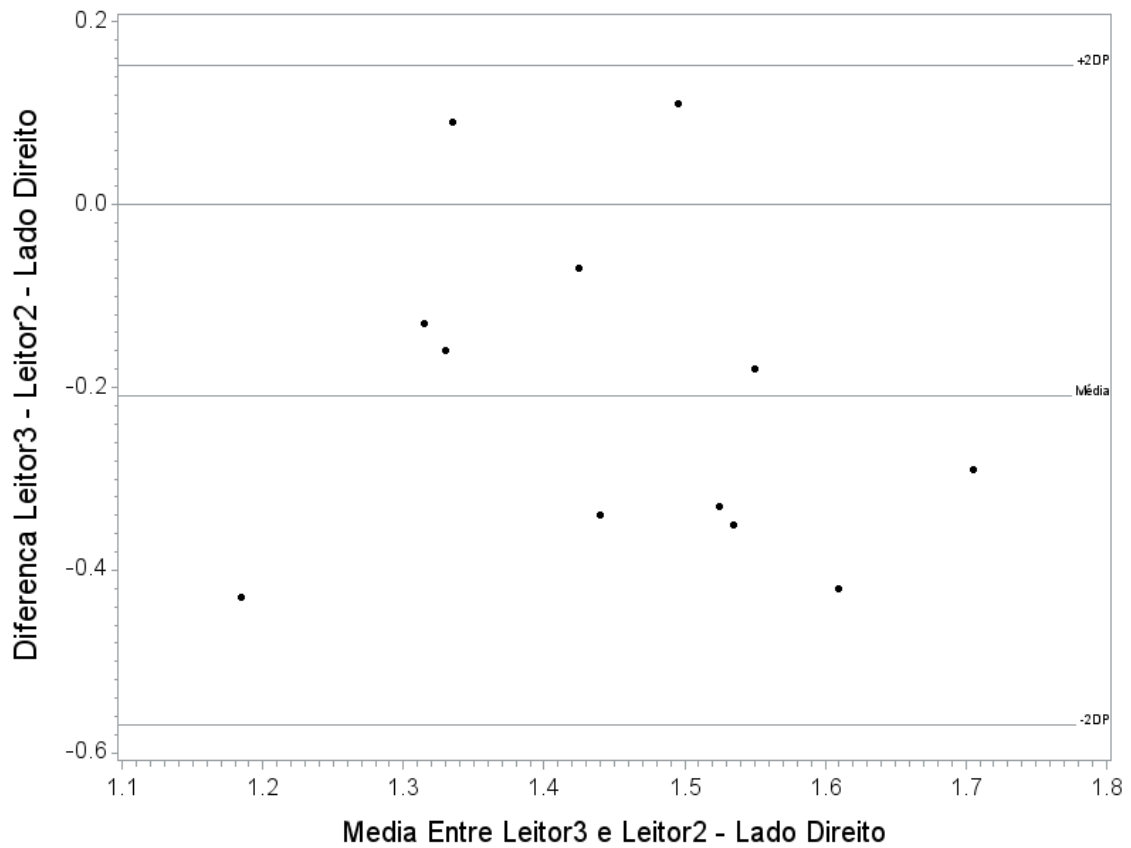


Figura 17- Gráfico de Bland-Altman com a distribuição espacial dispersa dos pontos ao longo dos valores de volume do hipocampo direito entre o Leitor 3 e o Leitor 2.

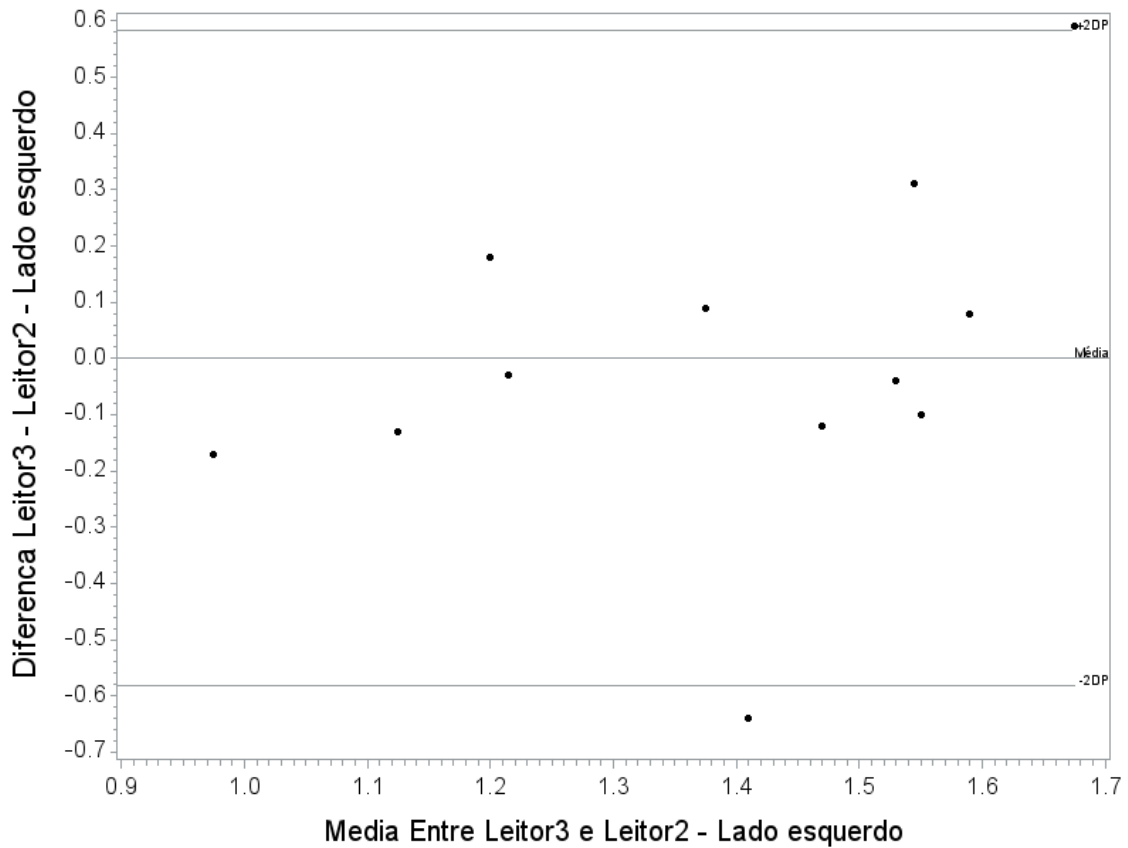


Figura 18 - Gráfico de Bland-Altman com a distribuição espacial relativamente dispersa dos pontos ao longo dos valores de volume do hipocampo esquerdo entre o Leitor 3 e o Leitor 2 e com dois pontos discrepantes além do limite de concordância.

4.2.3 Volumetrias do leitor 1 e leitor 2

Na análise comparativa entre os volumes do hipocampo direito e esquerdo, em média, o Leitor 1 tende a atribuir valores menores de volume de hipocampo que o Leitor 2, apresentando um viés estatisticamente significativo; $p = 0,0017$ e $p = 0,0018$, respectivamente. Dessa forma, a distribuição espacial dos pontos se apresenta de forma dispersa ao longo dos valores de volume dos hipocampos, caracterizando uma baixa concordância entre os avaliadores (Figura 19 e 20).

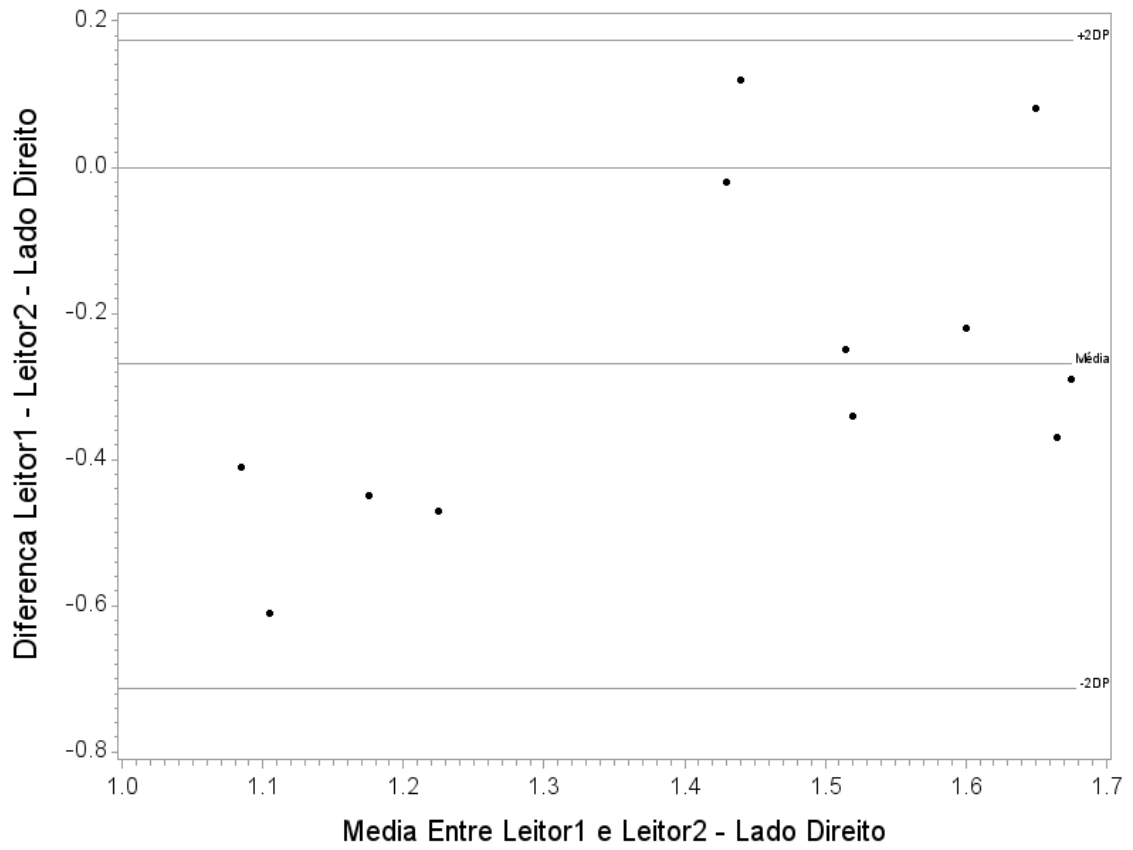


Figura 19- Gráfico de Bland-Altman com a distribuição espacial dispersa dos pontos ao longo dos valores de volume do hipocampo direito entre o Leitor 1 e o Leitor 2.

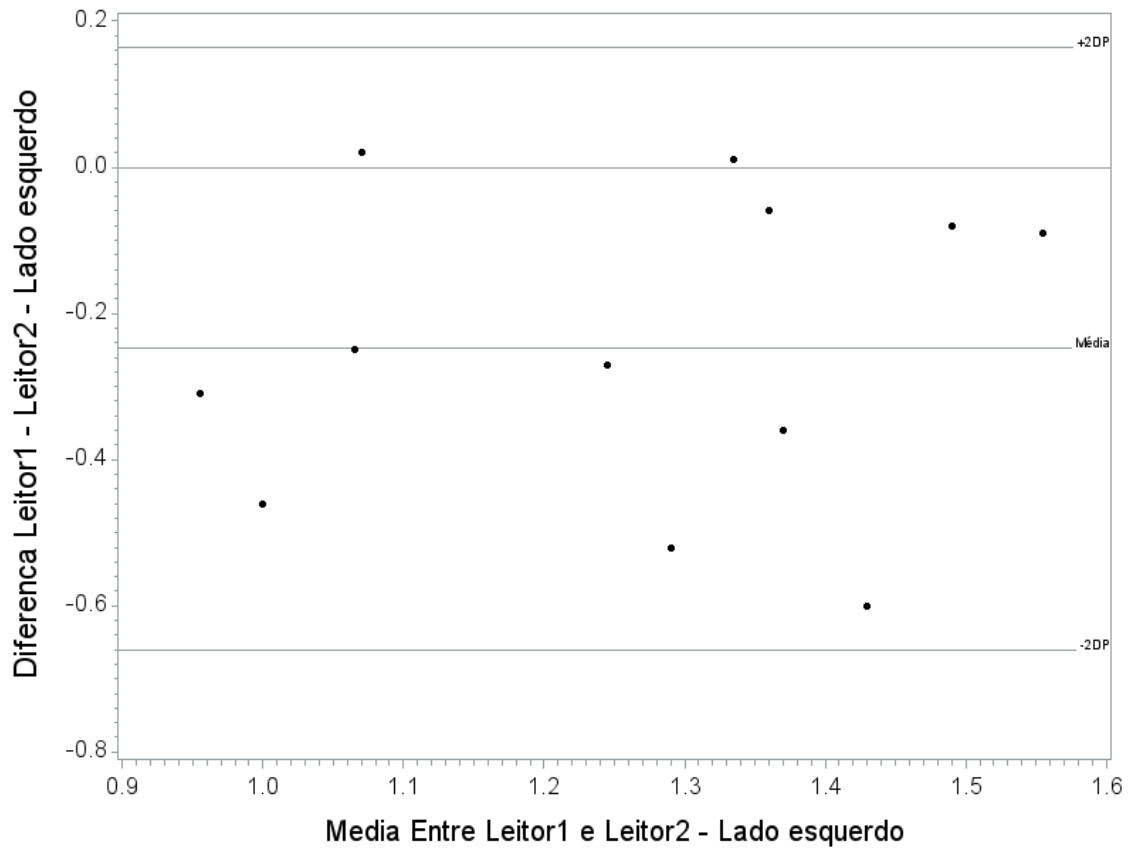


Figura 20- Gráfico de Bland-Altman com a distribuição espacial dispersa dos pontos ao longo dos valores de volume do hipocampo esquerdo entre o Leitor 1 e o Leitor 2.

5 DISCUSSÃO

Este estudo desenvolveu uma técnica de medição manual da volumetria do hipocampo no visualizador Osirix®, versão 5,6. Após a aplicação da mesma em 12 pacientes por três avaliadores, a comparação interobservador evidenciou uma baixa concordância.

5.1 TÉCNICAS DE VOLUMETRIA

As técnicas de medição volumétrica por RM atualmente usadas em pesquisas são manual, semiautomática e automática [67]. As automáticas, que possuem um nível tecnológico avançado, realizam as medições com maior rapidez em grandes bases de dados e sem necessitar de muito recurso humano [68-70]. No entanto, essa tecnologia é pouco acessível, de custo elevado e os algoritmos utilizados são complexos e exigem um treinamento especializado [71-72]. A medição manual, por sua vez, é mais fidedigna quanto aos limites das estruturas em estudo, em especial quando há variação anatômica. Entretanto consome tempo, o que limita sua aplicação na prática diária [73][55]. O método semiautomático, embora tenha um nível intermediário de custo, complexidade e tecnologia, ainda é menos acessível do que o manual [53]. O procedimento apresentado neste estudo foi manual no visualizador Osirix®, versão 5,6 e tomou cerca de 20 minutos para ser realizado, para cada hipocampo.

5.2 ÁREAS DE INTERESSE

Existem diversas opções de áreas de interesse para servir como biomarcador na avaliação cognitiva [48]. Alguns pesquisadores analisam mais de uma área, como

a amígdala e o hipocampo [74-76], podendo ser uma combinação dessas áreas com outros biomarcadores [77] ou a aplicação de escalas [78]. Estes métodos tem o intuito de aumentar a sua acurácia, embora aumente a complexidade dos mesmos [79]. Contudo, existe evidência na literatura que a medição apenas do hipocampo é eficaz, pois a sua atrofia esta associada à fisiopatologia da DA [52]. Optamos, neste estudo, por utilizar o hipocampo como área de interesse.

5.3 HIPOCAMPO COMO BIOMARCADOR

O hipocampo pode ser medido direta ou indiretamente; Giesel e colaboradores, por exemplo, propuseram uma medição automatizada do volume dos cornos temporais dos ventrículos laterais para indiretamente quantificar a atrofia hipocampal [80]. A desvantagem é que uma medição indireta não reflete com precisão o tamanho nem a atrofia exata da área de interesse. O método usado no nosso estudo foi a mensuração manual e direta do hipocampo.

Tendo em vista que o hipocampo, assim como todo o encéfalo, sofre alterações com o envelhecimento e a variabilidade individual [19,81], alguns pesquisadores usam mecanismos para corrigir esse efeito em suas pesquisas como Ridha e colaboradores que corrigiu o volume do hipocampo pelo volume intracraniano total [78]. O estudo apresentado não usou nenhuma técnica de correção, portanto seria recomendado o acompanhamento longitudinal dos indivíduos. Desta forma, a comparação seria entre a taxa de atrofia do hipocampo de cada individuo ao longo do seguimento e não somente o seu volume no momento da medição.

Quatro estudos também mediram o hipocampo manualmente pelo programa Osirix® [82-85]. Um estudo, realizado na Turquia, usou uma RM de resolução maior (3T), ponderada em T1 (SPGR, TR/TE: 2500/4,38) com cortes de 1mm de espessura e intervalo de 0,5mm. O hipocampo foi traçado manualmente pelo Osirix® versão 4,18 com a borda anterior abaixo da amígdala e a posterior onde a cruz do fórnix emerge da parede lateral do ventrículo lateral bilateralmente. O volume hipocampal foi normalizado pelo volume cerebral total e corrigido pelo

tamanho da cabeça. Este estudo demonstrou que existe uma correlação entre a atrofia do hipocampo com o declínio cognitivo leve e a doença de Alzheimer [82].

Um estudo na Malásia evidenciou que o volume do hipocampo de crianças com epilepsia era menor do que crianças sem essa enfermidade. Salmah e colaboradores usaram uma RM de resolução menor (1T) ponderado em T1 (SPGR) com cortes de espessura (4mm) e intervalo (1mm) menores. O hipocampo foi traçado manualmente pelo Osirix® versão 3,5. Diferente do nosso estudo, eles mediram cada corte três vezes e usaram a média destes valores [83]. O nosso estudo mediu o hipocampo somente uma vez e usou a seguinte sequência: SPGR ponderada em T1, TR: 12ms, TE: 5ms, com corte de 1mm de espessura e 0,1mm de intervalo.

O mesmo grupo de pesquisadores realizou outro estudo com crianças e adolescentes com o objetivo de determinar o volume normalizado do hipocampo, porém não encontrou diferença entre o volume original e o normalizado. Foi utilizada uma RM de 1T ponderada em T1 (SPGR, TE: 11ms, TR: 420ms) com cortes de 2mm de espessura e intervalo de 1mm. O hipocampo foi traçado manualmente pelo Osirix® versão 3,2,1 também três vezes em cada corte e usada a média das medidas. O limite anterior foi ao aparecer à cabeça do hipocampo e o posterior quando a cruz do fórnix emergir completamente separado do hipocampo e sua fímbria. A área total foi obtida pela soma de todas as áreas em cm^2 e o volume total ao multiplicar esta área pela espessura do corte (0,5cm) [84]. No nosso estudo, a área total não foi calculada e o volume total foi gerado de forma automática pelo programa.

Um grupo de pesquisadores de São Paulo também utilizou o Osirix® ao comparar a volumetria do hipocampo e a região do cíngulo posterior pela RM com a redução da concentração de N-acetilaspártato e o aumento de mio-inositol por espectroscopia de prótons na doença de Alzheimer. Foi utilizada uma RM de 1,5T ponderado em T1 (SPGR, TE: 5ms, TR: 11ms) com cortes de 1,6mm de espessura. A borda anterior foi o sulco uncal e a posterior quando a cruz do fórnix emerge da cauda do hipocampo. O hipocampo foi traçado manualmente apenas uma vez pelo Osirix® e a área total foi calculada pela somatória de cada corte e o volume total ao multiplicar essa área pela espessura do corte. O volume do hipocampo foi corrigido

pelo tamanho da cabeça ao ser dividido pelo volume intracraniano total. O resultado encontrado foi uma diferença entre o grupo controle e o grupo com DA pela espectroscopia, porém não pela RM [85].

5.4 COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO INTRACLASSE

Na nossa pesquisa, a análise estatística evidenciou que todos os coeficientes de correlação intraclassa apresentaram valores abaixo de 0,40; indicando uma baixa concordância entre os avaliadores. Este resultado já era esperado entre a geriatra e os demais leitores pela falta de experiência prévia de processamento de imagens, porém isso ocorreu também entre os dois residentes de radiologia. A dificuldade em delimitar algumas bordas do hipocampo (anterior, medial e posterior) pode ter prejudicado as medições. Além disso, o fato de nem todos os cortes terem sido traçados manualmente pode ter diminuído a precisão do delineamento do hipocampo. Cada corte subsequente gerado pelo programa era passível de erros que eram corrigidos pelos leitores.

Na revisão de Geuze e colaboradores, 115 estudos usaram diferentes protocolos e programas de medição manual do hipocampo; entre eles, MIDAS, MEASURE, NIH, BRAINS e DISPLAY. Nestes estudos, o ICC intra e interobservador variaram de 0,64 a 0,99; sendo que 60 tiveram ICC maior do que 0,90; 25 entre 0,80 e 0,89 e 6% abaixo de 0,80 [86]. O estudo de confiabilidade de medidas volumétricas de estruturas temporais mesiais de Marchetti e colaboradores também obteve ICC interobservador maior do que o nosso estudo; 0,95 para o hipocampo direito e 0,77 para o esquerdo. Marchetti analisou suas imagens na estação de trabalho de alta resolução Gyroview-HR (Philips Medical Systems 1993 versão 2.1) [87]. No estudo de Pfaendner e colaboradores sobre o efeito do tratamento de fenilcetonúria sobre a volumetria de algumas estruturas cerebrais (cerebelo, hipocampo, ponte, corpo caloso, tálamo, núcleo caudado, núcleo lentiforme, ventrículos laterais e volume intracraniano) foi obtido um ICC intra e interobservador de 0,97 usando o programa BRAINS2 [88]. A maior variabilidade das medidas encontradas no nosso estudo reflete a pouca experiência dos leitores em medir o

hipocampo e reforça a necessidade de uma prática diária dessa técnica para obter uma maior concordância entre eles.

5.5 VANTAGENS

Esta técnica pode ser aplicada em qualquer aparelho de RM de 1,5 tesla encontrado em hospitais privados, públicos e universitários e com o protocolo usado de rotina nestes serviços. As sequências adicionais de estudo do hipocampo não prolongam significativamente o exame. O visualizador DICOM® Osirix® pode ser utilizado pelos pesquisadores de forma gratuita. Portanto, esta proposta tem a vantagem de ser acessível e de baixo custo comparada com as técnicas automáticas.

5.6 LIMITAÇÕES

O nosso estudo apresenta algumas limitações. Inicialmente, esta técnica de medição apresenta alguns obstáculos que podem interferir no cálculo final do volume do hipocampo. Quanto menor a resolução da RM, mais difícil será a visualização das estruturas e a diferenciação entre substância branca e cinzenta e conseqüentemente menos preciso será o traçado da área de interesse. Portanto, recomenda-se usar imagens de alta resolução e excluir exames de baixa qualidade técnica [55]. Outro detalhe que pode prejudicar a medição é o fato de algumas bordas como a anterior, medial e posterior serem difíceis de serem delimitadas [56], logo é necessário o treinamento dos pesquisadores. Além disso, esse procedimento é trabalhoso, demanda tempo e não houve uma correção para a atrofia relacionada ao envelhecimento e a variabilidade individual.

6 CONCLUSÃO

A medição volumétrica do hipocampo utilizando o visualizador Osirix® tem a vantagem de ser acessível e ter um custo baixo comparado com as técnicas automáticas. Contudo, o procedimento é trabalhoso, demanda tempo e não houve uma correção para a atrofia relacionada ao envelhecimento e a variabilidade individual. A análise estatística evidenciou uma baixa concordância entre os avaliadores o que reforça a necessidade de maior treinamento na delimitação do hipocampo relatado na literatura.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Papez JW. A proposed mechanism of emotion. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.*, 1995;7(1):103-12.
2. Scarabino T, Salvolini U. Atlas of morphology and functional anatomy of the brain. New York: Springer; 2006.p.127.
3. Duvernoy HM, Cattin F. The human hippocampus: functional anatomy, vascularization and serial sections with MRI. 3rd ed. New York: Springer; 2005.p. 232.
4. Gray H, Churchill Livingstone. Gray's anatomy. Harcourt Brace: London;1995.
5. Eichenbaum H. A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nat Rev Neurosci.*, 2000;1(1):41-50.
6. Eichenbaum H. Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron*, 2004;44(1):109-20.
7. Davachi L, Wagner AD. Hippocampal contributions to episodic encoding: insights from relational and item-based learning. *J Neurophysiol.*, 2002;88(2):982-90.
8. Fortin NJ, Wright SP, Eichenbaum H. Recollection-like memory retrieval in rats is dependent on the hippocampus. *Nature*, 2004;431(7005):188-91.
9. Burgess N, Maguire EA, O'Keefe J. The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron*, 2002;35(4):625-41.
10. Manns JR, et al. Recognition memory and the human hippocampus. *Neuron*, 2003;37(1):171-80.
11. Best PJ, White AM, Minai A. Spatial processing in the brain: the activity of hippocampal place cells. *Annu Rev Neurosci.*, 2001;24:459-86.
12. Driscoll I, et al. The aging hippocampus: cognitive, biochemical and structural findings. *Cereb Cortex*, 2003;13(12):1344-51.
13. Bishop NA, Lu T, Yankner BA. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature*, 2010;464(7288):529-35.

14. Hayashi K, et al. Association of cognitive dysfunction with hippocampal atrophy in elderly Japanese people with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.*, 2011;94(2):180-5.
15. Gold SM, et al. Hippocampal damage and memory impairments as possible early brain complications of type 2 diabetes. *Diabetologia*, 2007;50(4):711-9.
16. Raji CA, et al. Brain structure and obesity. *Hum Brain Mapp*, 2010;31(3):353-64.
17. Jagust W, et al. Central obesity and the aging brain. *Arch Neurol.*, 2005;62(10):1545-8.
18. Korf ES, et al. Midlife blood pressure and the risk of hippocampal atrophy: the Honolulu Asia Aging Study. *Hypertension*, 2004;44(1):29-34.
19. Fotuhi M, Do D, Jack C. Modifiable factors that alter the size of the hippocampus with ageing. *Nat Rev Neurol*, 2012;8(4):189-202.
20. Jagust WJ, et al. Neuropathological basis of magnetic resonance images in aging and dementia. *Ann Neurol*, 2008;63(1):72-80.
21. Bonilha L, et al. Asymmetrical extra-hippocampal grey matter loss related to hippocampal atrophy in patients with medial temporal lobe epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2007;78(3):286-94.
22. Du AT, et al. Age effects on atrophy rates of entorhinal cortex and hippocampus. *Neurobiol Aging*, 2006;27(5):733-40.
23. Papadopoulos D, et al. Substantial archaocortical atrophy and neuronal loss in multiple sclerosis. *Brain Pathol*, 2009;19(2):238-53.
24. van de Pol LA, et al. Hippocampal atrophy on MRI in frontotemporal lobar degeneration and Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2006;77(4):439-42.
25. McKhann G, et al. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*, 1984;34(7):939-44.
26. Resnick SM, Scheltens P. MRI-based biomarkers of preclinical AD: an Alzheimer signature. *Neurology*, 2012;78(2):80-1.
27. McKhann GM, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association

- workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.*, 2011;7(3):263-9.
28. Jack CR, et al. Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.*, 2011;7(3):257-62.
 29. Wyman BT, et al. Standardization of analysis sets for reporting results from ADNI MRI data. *Alzheimers Dement.*, 2013;9(3):332-7.
 30. Mueller SG, et al. Ways toward an early diagnosis in Alzheimer's disease: the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI). *Alzheimers Dement.*, 2005;1(1):55-66.
 31. Weiner MW, et al. The Alzheimer's disease neuroimaging initiative: progress report and future plans. *Alzheimers Dement.*, 2010;6(3):202-11.
 32. Jack CR, et al. Update on the magnetic resonance imaging core of the Alzheimer's disease neuroimaging initiative. *Alzheimers Dement.*, 2010;6(3):212-20.
 33. Jack CR, et al. The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI): MRI methods. *J Magn Reson Imaging*, 2008;27(4):685-91.
 34. Weiner MW, et al. The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: a review of papers published since its inception. *Alzheimers Dement.*, 2012;8(1 Suppl):S1-68.
 35. Killiany RJ, et al. Temporal lobe regions on magnetic resonance imaging identify patients with early Alzheimer's disease. *Arch Neurol*, 1993;50(9):949-54.
 36. Mueller SG, et al. Evidence for functional specialization of hippocampal subfields detected by MR subfield volumetry on high resolution images at 4T. *Neuroimage*, 2011;56(3):851-7.
 37. Mueller SG, et al. Hippocampal atrophy patterns in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Hum Brain Mapp*, 2010;31(9):1339-47.
 38. Hanseeuw BJ, et al. Mild cognitive impairment: differential atrophy in the hippocampal subfields. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2011;32(9):1658-61.
 39. Schmand B, Huizenga HM, van Gool WA. Meta-analysis of CSF and MRI biomarkers for detecting preclinical Alzheimer's disease. *Psychol Med*, 2010;40(1):135-45.

40. Schott JM, et al. Reduced sample sizes for atrophy outcomes in Alzheimer's disease trials: baseline adjustment. *Neurobiol Aging*, 2010;31(8):1452-62, 1462 e1-2.
41. Teipel SJ, et al. Multicentre variability of MRI-based medial temporal lobe volumetry in Alzheimer's disease. *Psychiatry Res.*, 2010;182(3):244-50.
42. Leung KK, et al. Robust atrophy rate measurement in Alzheimer's disease using multi-site serial MRI: tissue-specific intensity normalization and parameter selection. *Neuroimage*, 2010;50(2):516-23.
43. Sluimer JD, et al. Whole-brain atrophy rate and cognitive decline: longitudinal MR study of memory clinic patients. *Radiology*, 2008;248(2):590-8.
44. Fox NC, et al. Using serial registered brain magnetic resonance imaging to measure disease progression in Alzheimer disease: power calculations and estimates of sample size to detect treatment effects. *Arch Neurol*, 2000;57(3):339-44.
45. Bradley KM, et al. Serial brain MRI at 3-6 month intervals as a surrogate marker for Alzheimer's disease. *Br J Radiol*, 2002;75(894):506-13.
46. Nestor SM, et al. Ventricular enlargement as a possible measure of Alzheimer's disease progression validated using the Alzheimer's disease neuroimaging initiative database. *Brain*, 2008;131(Pt 9):2443-54.
47. Whitwell JL, et al. Rates of brain atrophy over time in autopsy-proven frontotemporal dementia and Alzheimer disease. *Neuroimage*, 2008;39(3):1034-40.
48. Frisoni GB, et al. The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.*, 2010;6(2):67-77.
49. Ryu SY, et al. Measurement of precuneal and hippocampal volumes using magnetic resonance volumetry in Alzheimer's disease. *J Clin Neurol.*, 2010;6(4):196-203.
50. Mielke MM, et al. Fornix integrity and hippocampal volume predict memory decline and progression to Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.*, 2012;8(2):105-13.
51. Killiany RJ, et al. Use of structural magnetic resonance imaging to predict who will get Alzheimer's disease. *Ann Neurol.*, 2000;47(4):430-9.
52. Hasboun D, et al. MR determination of hippocampal volume: comparison of three methods. *AJNR Am J Neuroradiol.*, 1996;17(6):1091-8.

53. Ezekiel F, et al. Comparisons between global and focal brain atrophy rates in normal aging and Alzheimer disease: Boundary Shift Integral versus tracing of the entorhinal cortex and hippocampus. *Alzheimer Dis Assoc Disord.*, 2004;18(4):196-201.
54. Van Leemput K, et al. Model-based segmentation of hippocampal subfields in ultra-high resolution in vivo MRI. *Med Image Comput Assist Interv.*, 2008;11(Pt 1):235-43.
55. Jack CR, et al. Steps to standardization and validation of hippocampal volumetry as a biomarker in clinical trials and diagnostic criterion for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.*, 2011;7(4):474-485 e4.
56. Konrad C, et al. Defining the human hippocampus in cerebral magnetic resonance images: an overview of current segmentation protocols. *Neuroimage*, 2009;47(4):1185-95.
57. Boccardi M, et al. Survey of protocols for the manual segmentation of the hippocampus: preparatory steps towards a joint EADC-ADNI harmonized protocol. *J Alzheimers Dis.*, 2011;26(Suppl 3):61-75.
58. Frisoni GB, Jack CR. Harmonization of magnetic resonance-based manual hippocampal segmentation: a mandatory step for wide clinical use. *Alzheimers Dement*, 2011;7(2):171-4.
59. Boccardi M, et al. Operationalizing protocol differences for EADC-ADNI manual hippocampal segmentation. *Alzheimers Dement*, 2013.
60. American Psychiatric Association. American Psychiatric Association Task Force on DSM-IV. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV*. 4th ed. Washington, DC: American Psychiatric Association;1994. p.886.
61. Cook MJ, Fish DR, Shorvon SD, Straughan K, Stevens JM. Hippocampal volumetric and morphometric studies in frontal and temporal lobe epilepsy. *Brain*, 1992;115:1001-1015.
62. Jack CR, Twomey CK, Zinsmeister AR, Sharbrough FW, Petersen RC, Cascino GD. Anterior temporal lobes and hippocampal formations: normative volumetric measurements from MR images in young adults. *Radiology* 1989;172:549-554.
63. Jack CR, MRI-based hippocampal volume measurements in epilepsy. *Epilepsia*, 1994;35:S21-S29.

64. Watson C, Andermann F, Gloor P, Jones-Gotman M, Peters T, Evans A et al. Anatomic basis of amygdaloid and hippocampal volume measurement by magnetic resonance imaging. *Neurology*, 1992;42:1743-1750.
65. Fleiss JL, *Statistical methods for rates and proportions*. 2nd ed. New York Chichester: Wiley;1981.
66. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*, 1986;1(8476):307-10.
67. Keller SS, Roberts N. Measurement of brain volume using MRI: software, techniques, choices and prerequisites. *J Anthropol Sci*, 2009;87:127-51.
68. Morey RA, et al. A comparison of automated segmentation and manual tracing for quantifying hippocampal and amygdala volumes. *Neuroimage*, 2009;45(3):855-66.
69. Sanchez-Benavides G, et al. Manual validation of FreeSurfer's automated hippocampal segmentation in normal aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer Disease subjects. *Psychiatry Res*, 2010;181(3):219-25.
70. Kovacevic S, Rafii MS, Brewer JB. High-throughput, fully automated volumetry for prediction of MMSE and CDR decline in mild cognitive impairment. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 2009;23(2):139-45.
71. Heckemann RA, et al. Automatic morphometry in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neuroimage*, 2011;56(4):2024-37.
72. Van de Pol LA, et al. Improved reliability of hippocampal atrophy rate measurement in mild cognitive impairment using fluid registration. *Neuroimage*, 2007;34(3):1036-41.
73. Cherbuin N, et al. In vivo hippocampal measurement and memory: a comparison of manual tracing and automated segmentation in a large community-based sample. *PLoS One*, 2009;4(4):e5265.
74. Desikan RS, et al. Temporoparietal MR imaging measures of atrophy in subjects with mild cognitive impairment that predict subsequent diagnosis of Alzheimer disease. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2009;30(3):532-8.
75. Barnes J, et al. Measurements of the amygdala and hippocampus in pathologically confirmed Alzheimer disease and frontotemporal lobar degeneration. *Arch Neurol*, 2006;63(10):1434-9.

76. Szabo CA, et al. Amygdalar and hippocampal volumetry in control participants: differences regarding handedness. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2001;22(7):1342-5.
77. Dickerson BC, Wolk DA. MRI cortical thickness biomarker predicts AD-like CSF and cognitive decline in normal adults. *Neurology*, 2012;78(2):84-90.
78. Ridha BH, et al. Application of automated medial temporal lobe atrophy scale to Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 2007;64(6):849-54.
79. Hinrichs C, et al. Predictive markers for AD in a multi-modality framework: an analysis of MCI progression in the ADNI population. *Neuroimage*, 2011;55(2):574-89.
80. Giesel FL, et al. Comparison of manual direct and automated indirect measurement of hippocampus using magnetic resonance imaging. *Eur J Radiol*, 2008;66(2):268-73.
81. Van Petten C. Relationship between hippocampal volume and memory ability in healthy individuals across the lifespan: review and meta-analysis. *Neuropsychologia*, 2004;42(10):1394-413.
82. Yavuz BB, et al. Hippocampal atrophy correlates with the severity of cognitive decline. *Int Psychogeriatr*, 2007;19(4):767-77.
83. Win Mar Salmah J, et al. Hippocampal MR Volumetric Studies in Paediatric Patients with Epilepsy and Normal Controls. *Neuroradiol J.*, 2011;24(4):503-10.
84. Jalaluddin WM, et al. Normalised MRI Volumetry of the Hippocampus among Normal Malay Children and Adolescents. *Malays J Med Sci.*, 2013;20(1):31-8.
85. Park EJ, et al. Correlation between hippocampal volumes and proton magnetic resonance spectroscopy of the posterior cingulate gyrus and hippocampi in Alzheimer's disease. *Dement Neuropsychol*, 2010;4(2):109-113.
86. Geuze E, Vermetten E, Bremner JD. MR-based in vivo hippocampal volumetrics: 1. Review of methodologies currently employed. *Molecular Psychiatry*, 2005;10:147-159.
87. Marchetti RL, Bottini CMC, Azevedo D, Marie SKN, Castro CC. Confiabilidade de medidas volumetricas de estruturas temporais mesiais. *Arq Neuropsiquiatr*, 2002;60(2-B):420-428.

88. Pfaendner NH, Reuner G, Pietz J, Jost G, Rating D, Magnotta VA et al. MR Imaging-Based volumetry in patients with early-treated phenylketonuria. *AJNR*, 2005;26:1681-1685.