

Análisis de Imágenes PET utilizando SPM: Aplicación en Estudios sobre Drogas

V. García-Vázquez¹, G.L. Montoya³, M.L. Soto-Montenegro^{1,2}, J. Pascau^{1,2}, A. Higuera-Matas³,
M. Benito^{1,2}, E. Ambrosio³, M. Desco^{1,4,2}

¹ CIBER en Salud Mental (CIBERSAM), Madrid, desco@hggm.es

² Unidad de Medicina y Cirugía Experimental, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid

³ Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, UNED, Madrid

⁴ Departamento de Bioingeniería e Ingeniería Aeroespacial, Universidad Carlos III de Madrid

Resumen

El empleo de la técnica PET ofrece enormes posibilidades para la investigación no-invasiva del metabolismo cerebral en estudios sobre drogas en modelos animales. La técnica más empleada para analizar estas imágenes se basa en medir la actividad metabólica en determinadas regiones de interés, sin embargo presenta la desventaja de tener que definir a priori las estructuras relevantes del estudio. Una estrategia alternativa es el análisis paramétrico basado en vóxel, que emplea el programa de libre distribución SPM. En este trabajo se describe un protocolo diseñado para el análisis de imágenes PET de pequeños animales utilizando SPM, aplicado a un caso práctico en el que se investigan las diferencias a nivel del metabolismo cerebral de la glucosa entre dos cepas de ratas (Lewis y Fischer 344) que se han autoadministrado morfina. El protocolo incorpora un método de validación intrínseca para evitar la comprobación visual de las imágenes registradas y las estrategias para comprobar la estabilidad de los resultados de SPM.

1. Introducción

La administración del radiotrazador ¹⁸FDG (fluoro-2-deoxi-D-glucosa) en un modelo animal como la rata de laboratorio, a la que previamente se ha administrado una droga, permite analizar mediante la tomografía de emisión de positrones (PET) el metabolismo cerebral de la glucosa (medida de la actividad cerebral) y así identificar las regiones cerebrales que se ven alteradas por el consumo de drogas de abuso.

Para analizar las imágenes PET se suele emplear la estrategia *basada en ROIs* ("Region Of Interest"), que consiste en segmentar aquellas estructuras o ROIs de las que se tenga conocimiento o sospecha de ser relevantes para el experimento. La hipótesis se contrasta con los estadísticos (por ejemplo, la media muestral) obtenidos en estas ROIs, corrigiéndose si es necesario por comparaciones múltiples (tantas como ROIs) para reducir la probabilidad de falsos positivos. Las desventajas de este tipo de análisis se centran en la necesidad de elección a priori de las estructuras relevantes del estudio y su segmentación (seleccionar las mismas ROIs en imágenes PET que presentan baja resolución espacial, cansancio del operador, tiempo empleado, etc.) [1]. Una estrategia

alternativa que resuelve estos inconvenientes es el análisis paramétrico *basado en vóxel*, que consiste en registrar todas las imágenes PET para ponerlas en concordancia espacial y, para cada vóxel, realizar un contraste de hipótesis utilizando todas las imágenes PET. Sin embargo, su principal inconveniente es la necesidad de un registro espacial (el mismo vóxel debe corresponder con la misma región en todas las imágenes) y además, la corrección por comparaciones múltiples es más difícil. A su vez, la principal ventaja del análisis paramétrico basado en vóxel es un posible inconveniente ya que, al no fijar a priori las regiones a estudiar, se podría llegar al extremo de aceptar todos los vóxeles estadísticamente significativos cuando algunos podrían ser falsos positivos. Por lo tanto, es necesario ser bastante crítico con los resultados obtenidos. Repetir el registro, eliminar algún sujeto aleatoriamente ("jackknifing") para comprobar que las diferencias estadísticamente significativas se mantienen y así asegurarse de que el número de sujetos es suficiente, sospechar de aquellos vóxeles significativos cercanos a los bordes del cerebro que podrían ser errores de registro y variar el nivel de significación en el análisis estadístico para eliminar aquellas regiones que presentan menores diferencias son estrategias a tener en cuenta para asegurar la robustez de este tipo de análisis.

El programa de libre distribución SPM ("Statistical Parametric Mapping", <http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/>), utilizado ampliamente por la comunidad de investigadores de neuroimagen funcional, está orientado al análisis paramétrico *basado en vóxel* de imágenes funcionales cerebrales en humano [2]. Los diferentes métodos de registro implementados en SPM están optimizados para cerebro humano. Recientemente, se ha añadido la extensión SPMouse [3] que permite ampliar la funcionalidad de SPM a cerebros animales (modificando ciertos parámetros para que la visualización y procesamiento de imágenes funcione correctamente en imágenes preclínicas). Sin embargo, con más motivo aún que en el caso de aplicación en humanos, el registro debe comprobarse visualmente imagen por imagen.

La plataforma MMWKS ("Multimodality Workstation") desarrollada por el Laboratorio de Imagen Médica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón [4]

permite, entre otras funcionalidades, visualizar, segmentar, cuantificar, registrar y fusionar imágenes de distinta modalidad. Entre los diferentes tipos de registro implementados se incluye un método que registra varias imágenes aplicando transformaciones rígidas y aporta para cada imagen registrada el índice de consistencia para evaluar la bondad del ajuste (validación intrínseca) [5]. Con este método la comprobación del registro se facilita enormemente al valorar sólo los índices indicados.

El objetivo de este trabajo consiste en presentar el protocolo para realizar el análisis de imágenes PET con SPM aplicado a un caso práctico en el que se investigan las diferencias a nivel del metabolismo cerebral de la glucosa entre dos cepas de ratas (Lewis y Fischer 344) que se han autoadministrado morfina. Además, incorpora el método de la plataforma MMWKS que evita la comprobación visual de las imágenes registradas y las estrategias para comprobar la estabilidad de los resultados de SPM. La hipótesis en este estudio es que habrá diferencias de metabolismo cerebral ya que las dos cepas presentan diferencias tanto conductuales (aprendizaje, autoadministración de drogas, retirada de opiáceos...) como neuroquímicas (sistema opioide, dopaminérgico, glutamatérgico, serotoninérgico) [6,7].

2. Material y métodos

2.1. Sujetos

Se utilizaron once ratas macho adultas de la misma edad de la cepa Lewis y trece de la cepa Fischer 344. Los animales fueron entrenados, mediante cajas de Skinner, en una tarea de refuerzo para la comida, donde las ratas tienen que presionar una palanca (con un ratio fijo 1) para conseguir un “pellet” de comida. Una vez entrenados, se les realiza la implantación del catéter en la vena yugular para la autoadministración. Se dividió cada cepa en dos subgrupos (Salino, Morfina), las cuales se autoadministraron durante 15 días (12 horas/día) suero salino o morfina (1 mg/kg), respectivamente, y durante otros 15 días (12 horas/día) suero salino [8]. Toda la manipulación de los animales se realizó según las normas sobre protección de los animales utilizados para experimentación aplicada en la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Directiva 86/609/CEE y RD 1201/2005).

2.2. Adquisición de imágenes PET

Se adquirieron dos imágenes PET por cada animal (*Día 0* y *Día 15*, al finalizar la autoadministración de los primeros 15 días y de los últimos 15 días, respectivamente) en un escáner PET de pequeño animal (rPET, SUINSA Medical Systems, Madrid), que presenta resolución transaxial 1.65 mm (FWHM, “Full Width at Half-Maximum”) y resolución axial 1.9 mm (FWHM). El radiotrazador empleado fue ^{18}F FDG (2.2 ± 0.06 mCi, periodo de captación 35 minutos), la anestesia empleada fue isofluorano (4% durante la inducción y 1-1.5% durante el mantenimiento en 100% de O_2) y el tiempo de adquisición 60 minutos.

2.3. Reconstrucción de imágenes PET

Las imágenes se reconstruyeron empleando el algoritmo 3D-FBP (“3D Filtered Back Projection”) [9] con los siguientes parámetros: filtro de Butterworth de orden 12 con frecuencia de corte al 35% de Nyquist, con correcciones de alineamiento, decaimiento, normalización y tiempo muerto. El tamaño de vóxel de las imágenes reconstruidas es isométrico 0.81 mm.

2.4. Registro de las imágenes PET

Se partió de la suposición de que las transformaciones necesarias para registrar las imágenes del estudio fueran rígidas (6 parámetros), al presentar los sujetos bajo estudio la misma edad, sexo y pertenecer los individuos de cada cepa a la misma camada.

Se seleccionaron manualmente en la plataforma MMWKS dos imágenes PET (imágenes de referencia), evitando aquellas con poco contraste, movimiento del animal durante la adquisición o baja calidad en general. Utilizando un método de segmentación automático basado en crecimiento de semilla, se obtuvieron sus correspondientes máscaras del cerebro. Se registraron ambas imágenes de referencia por medio de 7 parejas de marcadores anatómicos mediante el método implementado en la plataforma, inicialmente propuesto en [10]. Para registrar las imágenes del estudio se utilizó el algoritmo descrito en [5] cuyas entradas son las imágenes a registrar, las dos imágenes de referencia con sus correspondientes máscaras, y la transformación rígida obtenida en el registro de las dos referencias. Como resultado se obtienen las imágenes registradas en formato Analyze 7.5 (uno de los formatos de imagen que soporta SPM). Para evaluar la calidad del registro, se utiliza como umbral la resolución del dispositivo PET (1.65 mm). Si el índice de consistencia es menor que este umbral, el registro es correcto y en caso contrario, erróneo, realizándose en ese caso el registro manualmente con marcadores anatómicos [10].

2.5. Suavizado de las imágenes PET

Las imágenes se suavizaron con SPM (SPM5, versión 1782) utilizando un filtro gaussiano de FWHM isométrico 2 mm. Mediante este suavizado se aumenta la relación señal a ruido de las imágenes, se garantiza que los cambios entre sujetos se presenten en escalas suficientemente grandes como para ser anatómicamente significativas y que las imágenes se ajusten mejor a un modelo de campos gaussianos (suposición empleada en el análisis estadístico) [2]. El valor de FWHM se eligió en relación con el tamaño mínimo esperado de las áreas de activación.

2.6. Enmascaramiento de las imágenes PET

Para analizar sólo el cerebro se enmascararon las imágenes PET suavizadas con una máscara de cerebro segmentado sobre un patrón realizado a partir de la media de las imágenes registradas (Apartado 2.4) en la plataforma MMWKS. Respecto a la segmentación, se siguió el procedimiento explicado en ese mismo apartado.

2.7. Normalización en intensidad de las imágenes PET

Es necesario ajustar la intensidad de las imágenes PET debido a la variación del nivel medio global de metabolismo cerebral entre distintos sujetos y, en menor medida, en un mismo sujeto con el tiempo (diferente tasa de llegada, lavado biológico y físico, reacciones bioquímicas locales). El método empleado consistió en multiplicar la intensidad de cada vóxel del cerebro por un factor de tal forma que en todas las imágenes el valor medio cerebral fuese idéntico (100%).

2.8. Análisis estadístico

El análisis estadístico empleado consistió en un análisis de varianza (ANOVA) de tres factores fijos con medidas repetidas en uno de ellos: cepa (factor inter-sujeto; niveles: Lewis, Fischer 344), condición (factor inter-sujeto; niveles: Salino, Morfina) y día (factor intra-sujeto, niveles: Día 0, Día 15). La matriz de diseño (especificación del modelo general lineal al cual se ajustan los valores de cada vóxel e implementada en SPM5 mediante la opción "Flexible Factorial") incluía también el factor sujeto y las interacciones dos a dos de los tres factores fijos mencionados anteriormente. Se corrigió por comparaciones múltiples (opción FWE, "Family-Wise Error") con nivel de significación 0.001.

2.9. Imagen de resonancia magnética

Como la resolución anatómica de las imágenes PET es reducida y para localizar anatómicamente las diferencias estadísticamente significativas, los resultados de SPM se fusionaron con una imagen de resonancia magnética de una rata Wistar adulta macho de la misma edad que los sujetos utilizados en este estudio.

El sujeto fue anestesiado con sevoflurano (inducción al 5% y mantenimiento al 3%), e introducido en un escáner Bruker Biospec 70/20 (Ultra Shielded, campo magnético principal de 7 T). Durante toda la adquisición, el animal fue monitorizado por su respiración y temperatura. Para la adquisición de las imágenes se empleó la combinación de una antena de volumen más una *phase array* de cerebro de rata. Después de ajustar la uniformidad del campo magnético, se adquirió la imagen de resonancia magnética utilizando una secuencia RARE (tiempo de repetición 4062 ms, tiempo de eco 33 ms, ángulo de *flip* 90°, factor RARE 8, campo de visión 3.7 x 3.7 cm, matriz 256 x 256, grosor de rodaja 0.8 mm, número de rodajas 37, número de acumulaciones 5, tiempo de adquisición 11 minutos). La no-uniformidad de intensidad se corrigió con el algoritmo automático *n3* [11] (distancia 8 mm, 250 iteraciones, FWHM 0.15 mm, criterio de parada 0.0001) y, a continuación, se registró (transformación rígida) con el patrón PET obtenido en el Apartado 2.6.

2.10. Validación

Se aplicaron las estrategias comentadas en el Apartado 1 para comprobar que las diferencias estadísticamente significativas se mantenían en SPM: repetición del registro, variación del parámetro FWHM del suavizado

(3 mm), "jackknifing" y modificación del nivel de significación.

Para validar las regiones estadísticamente significativas obtenidas con SPM, se aplicó la estrategia basada en ROIs en esas regiones segmentando manualmente cada imagen con la plataforma MMWKS y analizando los resultados normalizados (ver Apartado 2.7) con el programa estadístico SPSS.

3. Resultados

Respecto a la validación intrínseca, sólo fue necesario realizar un registro manual con marcadores anatómicos ya que el índice de consistencia del resto de imágenes (95) era inferior a 1.65mm.

Las ratas Lewis mostraron mayor metabolismo cerebral de glucosa que las ratas Fischer 344 en las cortezas entorrinal y perirrinal así como en una amplia zona que comprende el hipotálamo, los cuerpos mamilares, la sustancia negra, el área tegmental ventral y el haz prosencefálico medial, influyendo en menor medida los factores condición y día (ver Figura 1). Estas estructuras se mantenían en mayor o menor extensión dependiendo del registro aplicado, del parámetro FWHM del suavizado, del "jackknifing" y del nivel de significación. Además, estas regiones también resultaron significativas en el análisis por ROIs ($p < 10^{-7}$). La magnitud de estas diferencias entre razas depende del contraste que se realice. Por ejemplo, la corteza lateral aumenta de 107 vóxeles significativos (contraste Lewis Salino Día 0 > Fischer 344 Salino Día 0) a 125 vóxeles (contraste Lewis Salino Día 15 > Fischer 344 Salino Día 15).

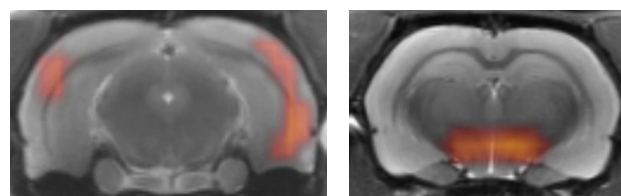


Figura 1. Regiones estadísticamente significativas (PET, naranja, FWE $p < 0.001$) en dos cortes coronales de la imagen de resonancia magnética: corteza (izquierda, 107 vóxeles) y región que comprende el hipotálamo (derecha, 73 vóxeles). Estas imágenes son resultado del contraste Lewis Salino Día 0 > Fischer 344 Salino Día 0.

4. Discusión

Se presenta en esta comunicación un protocolo para el análisis de imágenes PET utilizando SPM aplicado a un caso práctico en el que se investigan las diferencias a nivel del metabolismo cerebral de la glucosa entre dos cepas de ratas (Lewis y Fischer 344) que se han autoadministrado morfina. Se describe un procesamiento específico previo al análisis estadístico con SPM que evita comprobar visualmente el registro imagen por imagen y además se presentan las estrategias para comprobar la estabilidad de los resultados.

La validación de las regiones significativas obtenidas con SPM fue positiva al coincidir con los del análisis basado en ROIs: la cepa es la causa del efecto principal en este estudio. Además, los resultados se mantenían incluso variando ciertos parámetros del protocolo.

Respecto a las regiones estadísticamente significativas:

- Tanto las cortezas entorrinal y perirrinal como los cuerpos mamilares están íntimamente relacionados con el hipocampo, con la memoria y con el aprendizaje [12].
- El área tegmental ventral y el haz prosencefálico medial forman parte del sistema de recompensa [13].
- El hipotálamo es uno de los pilares del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal que está estrechamente relacionado con el estrés y éste a su vez con el consumo de drogas de abuso [14].

Estos resultados concuerdan con los descritos en el Apartado 1, siendo las ratas Lewis aquellas que presentan mayor metabolismo cerebral de glucosa (mayor actividad cerebral) y las que mejor y más rápido aprenden a autoadministrarse morfina. Sin embargo, el número de sujetos de este estudio es relativamente bajo, posible explicación de no obtener exactamente las mismas regiones en los contrastes Lewis Salino Día 0 > Fischer 344 Salino Día 0 y contraste Lewis Salino Día 15 > Fischer 344 Salino Día 15 cuando la única diferencia entre estos grupos es el número de días que se han autoadministrado suero salino.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (TEC2008-06715-C02-01, TEC2007-64731/TCM), Ministerio de Sanidad y Consumo (CIBER CB06/01/0079, PNSD 2007-2010, FIS CP08/00017), Ministerio de Industria (CDTEAM, Programa CENIT) y Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña (2007-2010, 2008-2011).

Por último agradecer a Alexandra de Francisco López su dedicación tanto en el manejo y cuidado de los sujetos como en la adquisición de las imágenes PET empleadas en este trabajo.

Referencias

- [1] Soto-Montenegro ML, Vaquero JJ, Pascau J, Gisbert JD, García-Barreno P, Desco M. Detection of visual activation in the rat brain using 2-deoxy-2-[18F]fluoro-D-glucose and Statistical Parametric Mapping (SPM). *Molecular Imaging and Biology*, vol 11, 2009, pp 94-9 (ISSN: 1536-1632).
- [2] Gisbert JD, Pascau J, Reig S, García-Barreno P, Desco M. Mapas de estadísticos paramétricos (SPM) en medicina nuclear. *Revista Española de Medicina Nuclear*, vol 22, sup 1, 2003, pp 43-53 (ISSN: 0212-6982).
- [3] Sawiak SJ, Wood NI, Williams GB, Morton AJ, Carpenter TA. SPMMouse: A new toolbox for SPM in the animal brain. *Proceedings 17th Scientific Meeting, International Society for Magnetic Resonance in Medicine*, Hawai, 2009, p 1086. <http://www.wbic.cam.ac.uk/~sjs80/spmmouse.html> (Consultada: Agosto 2010).
- [4] Pascau J, Vaquero J, Soto M, Cacho R, Sánchez J, Santos A, Desco M. Multimodality workstation for small animal image visualization and analysis. *Molecular Imaging and Biology*, vol 8, sup 2, 2006, pp 97-8 (ISSN: 1536-1632).
- [5] Pascau J, Gisbert JD, Michaelides M, Thanos PK, Volkow ND, Vaquero JJ, Soto-Montenegro M, Desco M. Automated method for small-animal PET image registration with intrinsic validation. *Molecular Imaging and Biology*, vol 11, sup 2, 2009, pp 107-113 (ISSN: 1536-1632).
- [6] Sánchez-Cardoso P, Higuera-Matas A, Martín S, del Olmo N, Miguéns M, García-Lecumberri C, Ambrosio E. Modulation of the endogenous opioid system after morphine self-administration and during its extinction: a study in Lewis and Fischer 344 rats. *Neuropharmacology*, vol 52, sup 3, 2007, pp 931-48 (ISSN: 0028-3908).
- [7] Sánchez-Cardoso P, Higuera-Matas A, Martín S, Miguéns M, Del Olmo N, García-Lecumberri C, Ambrosio E. Strain differences between Lewis and Fischer 344 rats in the modulation of dopaminergic receptors after morphine self-administration and during extinction. *Neuropharmacology*, vol 57, 2009, pp 8-17 (ISSN: 0028-3908).
- [8] Martín S, Manzanares J, Corchero J, García-Lecumberri C, Crespo JA, Fuentes JA, Ambrosio E. Differential basal proenkephalin gene expression in dorsal striatum and nucleus accumbens, and vulnerability to morphine self-administration in Fischer 344 and Lewis rats. *Brain Research*, vol 821, sup 2, 1999, pp 350-5 (ISSN: 1872-6240).
- [9] Abella M, Vaquero JJ, Soto-Montenegro ML, Lage, E, Desco M. Sinogram bow-tie filtering in FBP PET reconstruction. *Medical Physics*, vol 36, sup 5, 2009, pp 1663-71 (ISSN: 0094-2405).
- [10] Arun KS, Huang TS, Blostein SD. Least-squares fitting of two 3-D point sets. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, vol 9, sup 5, 1987, pp 698-700 (ISSN: 0162-8828).
- [11] Sled JG, Zijdenbos AP, Evans AC. A nonparametric method for automatic correction of intensity nonuniformity in MRI data. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, vol 17, sup 1, 1998, pp 87-97 (ISSN: 0278-0062).
- [12] Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. Principles of Neural Science. McGraw-Hill Medical, 2000 (ISBN: 0838577016).
- [13] Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*, vol 35, sup 1, 2010, pp 217-38. Errata en *Neuropsychopharmacology*, vol 35, sup 4, 2010, p 1051 (ISSN: 0028-3908).
- [14] Kosten TA, Ambrosio E. HPA axis function and drug addictive behaviors: insights from studies with Lewis and Fischer 344 inbred rats. *Psychoneuroendocrinology*, vol 27, sup 1-2, 2002, pp 35-69 (ISSN: 0306-4530).