

A IMPORTÂNCIA DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NO DIAGNÓSTICO DA HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA

THE IMPORTANCE OF MRI IN THE DIAGNOSIS OF HEREDITARY HEMOCHROMATOSIS

Ilana Félix Pinho

Faculdade de Ciências Médicas da
Santa Casa de São Paulo

Leandro Nobeschi

Faculdades Metropolitanas Unidas e Faculdade de
Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo

E-mail: ln.nobeschi@gmail.com

Rafael Eidi Goto

Faculdade de Ciências Médicas da
Santa Casa de São Paulo

Bergman Nelson Sanchez Munhoz

Faculdades de Ciências Médicas da Santa Casa de
São Paulo e Universidade Nove de Julho

Homero José de Farias e Melo

Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de
São Paulo e São Camilo

RESUMO

A hemocromatose hereditária é uma doença genética relacionada ao acúmulo de ferro no organismo, principalmente no fígado. A biópsia é o "padrão ouro" para o diagnóstico da concentração de ferro no fígado (LIC), porém é um método invasivo. Por outro lado, os exames sorológicos são sensíveis, mas não específicos. Estudos relacionados à ressonância magnética (RM) tem sido desenvolvidos pois ela é altamente sensível a presença de ferro, destacando-se as técnicas de relação-sinal- ruído (RSR) e relaxometria. Os métodos de RSR já são aplicáveis atualmente na prática clínica, principalmente o protocolo de Rennes. Já a relaxometria ($R2/R2^*$) gera valores mais precisos do LIC, entretanto exige um investimento de alto custo e não possui protocolos padronizados. A RM é um método não invasivo e com técnicas que possuem potencial para auxiliar e aperfeiçoar o diagnóstico e monitoramento de pacientes com HH.

Palavras-chave: Hemocromatose hereditária; LIC; ressonância magnética; RSR; relaxometria.

ABSTRACT

Hereditary hemochromatosis (HH) is a genetic disease related to iron accumulation in the body, especially in the liver. Liver biopsy is the "gold standard" protocol to diagnose the liver iron concentration (LIC), but it consists in a highly invasive technique. Other techniques, such as serum marks, are sensitive but nonspecific to LIC. Magnetic resonance imaging (MRI) is very sensitive to the presence of iron in liver. Thus, studies have sought techniques to describe LIC, highlighting the relationship signal-noise-techniques (RSR) and relaxometry. The RSR methods are currently applied in clinical practice, like Rennes' protocol. On the other hand, relaxometry ($R2 / R2^*$) generates more accurate values of LIC, however it requires a costly investment and does not have standardized protocols. MRI is widely available as a noninvasive method, moreover, it has the potential to optimize the diagnosis and monitoring of HH patients.

Key-words: Hereditary hemochromatosis; LIC; MRI; relaxometry.

INTRODUÇÃO

A hemocromatose hereditária (HH) é a causa mais comum relacionada ao aumento da sobrecarga de ferro¹. É uma doença genética, geralmente recessiva e ocasionada, na maioria das vezes, por uma mutação do gene HFE no braço curto do cromossomo 6. Duas mutações descritas são responsáveis por grande parte dos casos de HH: A C282Y e a H63D. Sua prevalência é comum na raça caucasiana e afeta mais homens do que mulheres².

O ferro é importante para diversos processos fisiológicos humanos. Entretanto, quando em excesso, é tóxico para os tecidos do hospedeiro pois o organismo não é capaz de eliminar sua sobrecarga, ocasionando uma condição patológica com prejuízo de diversos órgãos, especialmente o fígado, pâncreas e coração. Para evitar danos a esses órgãos, tratamentos como a flebotomia e uso de agentes quelantes são indicados^{1,2}.

Exames sanguíneos simples podem ajudar a sugerir o diagnóstico, como a saturação de ferritina (ST) e a ferritina sérica (FS). São parâmetros sensíveis, porém não específicos. A confirmação deve ser através de exames genéticos, principalmente para indivíduos homozigotos para o gene C282Y ou heterozigotos C282Y/H63D. Contudo, não são raras as vezes que há má interpretação desses resultados ou de pacientes sem mutação no gene HFE, logo é importante mensurar a concentração de ferro no fígado (*level iron concentration* - LIC)^{1,3}.

A biópsia hepática é o “padrão ouro” para medir o LIC, porém por ser um procedimento invasivo e com risco de complicações, os pacientes possuem resistência à técnica⁴. Além do mais, pode apresentar resultados imprecisos dependendo da heterogeneidade da amostra⁵. Sendo assim, a ressonância magnética (RM) entra como alternativa não invasiva e sensível à presença de ferro que pode auxiliar na indicação de tratamento e monitoramento da doença⁶.

Desde 1990 técnicas por RM vem sendo propostas para avaliar o LIC^{7,8}, sendo baseadas principalmente na relação-sinal-ruído (RSR) e em métodos de relaxometria. No caso da RSR, o fígado é comparado com outro tecido sem sobrecarga férrica. Já na relaxometria, poderá ser medido o T2 (R2) e o T2* (R2*) através do cálculo da velocidade do relaxamento transversal dos prótons no fígado^{9,10}.

Alguns estudos já mostram a eficácia da RM no diagnóstico de sobrecarga de ferro hepática, entretanto a maioria não chegou a um protocolo padronizado e reprodutível^{6,11}.

Sendo assim, esta revisão objetiva verificar as principais literaturas a fim de avaliar se RM pode ser capaz de se tornar um método preciso e de fácil acesso para portadores de hemocromatose hereditária.

Métodos por relação-sinal-ruído

Nesse método, o LIC é medido através da relação intensidade de sinal do fígado durante sequência spin-eco (SE) ou gradiente-eco (GRE) dividido pela intensidade de sinal de um tecido onde não há acúmulo de ferro, geralmente o músculo esquelético. Uma das vantagens do músculo esquelético é que o fígado geralmente possui maior intensidade de sinal do que o músculo. Para evitar as sensibilidades e variações da bobina de superfície, é recomendada a aquisição das imagens com bobinas de corpo. As medições são feitas em um mesmo corte, usando grandes regiões de interesse (ROIs). Para identificar todos os níveis de sobrecarga, mais de uma sequência é necessária^{12,13}.

Gandon *et al.*⁸, desenvolveram o método de RSR mais utilizado, pela Universidade de Rennes, na França. Nesse método, cinco sequências GRE em apnéia são obtidas com TR fixos, porém com ângulos de inclinação diferentes (20° ou 90°), para alterar a ponderação T1 e com tempo de eco (TE) variáveis

(entre 4-21 ms) para alterar a ponderação T2* (figura 01). Em cada sequência, a intensidade de sinal do fígado é medida com três ROIs no lobo direito, enquanto o músculo é medido com dois ROIs do lado esquerdo e direito dos músculos paravertebrais. Protocolos específicos vem sido implementados em diferentes campos magnéticos (0,5; 1,0 e 1,5 T) e são mais simples de implementar do que os métodos de relaxometria.

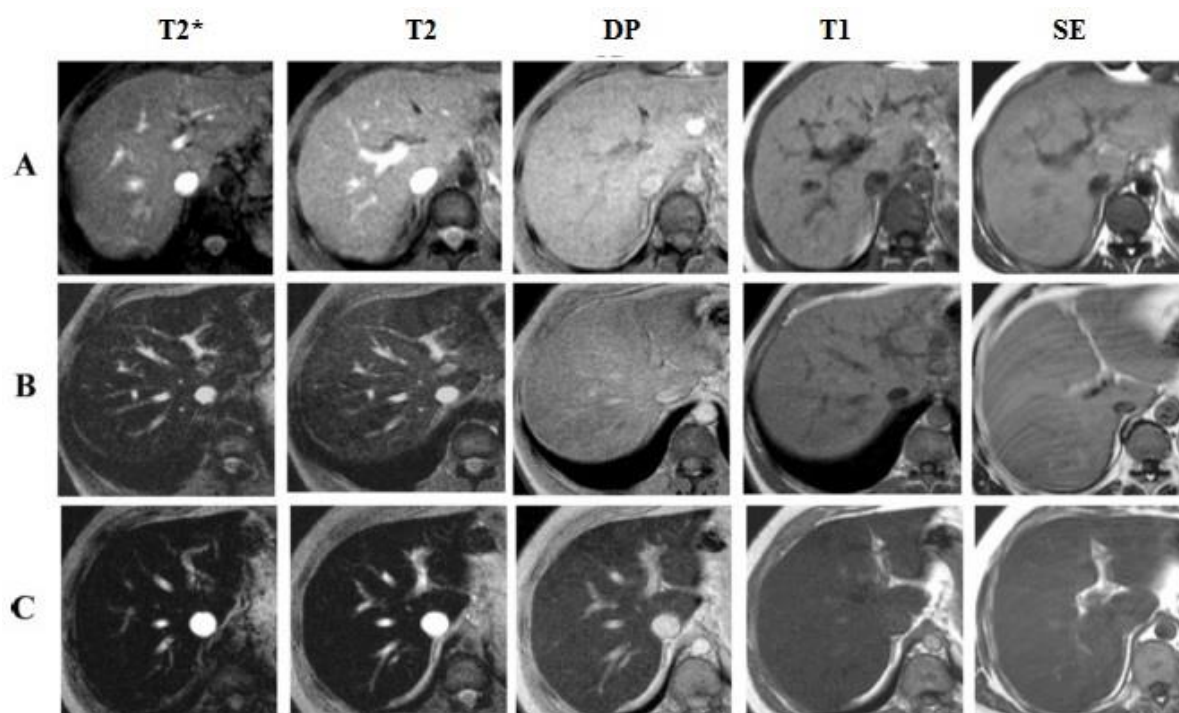


Figura 01: Sequências de RM (T2*, T2, densidade de prótons, T1 e spin eco) pelo método de Gandon et al. em três pacientes com diferentes níveis de LIC. A- Paciente sem sobrecarga de ferro. B- Paciente com sobrecarga moderada de ferro. C- Paciente com sobrecarga elevada de ferro.⁶

Esta técnica foi publicada em 2004 e avaliou 149 pacientes, resultando numa alta precisão na estimativa do LIC (diferença média de 0,8 $\mu\text{mol/g}$, 95% de intervalo de confiança (6.3,7.9) variando de 3 a 375 $\mu\text{mol Fe/g}$.

Embora o método estabelecido por Gandon e seus colaboradores⁸ seja amplamente usado na clínica, ele possui importantes limitações. A relação entre o fígado e o músculo pode ser afetada por vários fatores (incluindo tipo de sequência, parâmetros do equipamento e bobina)¹⁴. Fatores biológicos como esteatose hepática e gordura muscular podem confundir a interpretação, uma vez que são conhecidos por afetarem a intensidade de sinal no fígado e no músculo, respectivamente¹⁵. Por fim, ele satura com sobrecarga de ferro muito elevada, não fornecendo um valor de LIC maior do que 350 $\mu\text{mol Fe/g}$. Ele aponta esses casos como "Sobrecarga de ferro muito elevada" (LIC > 350

$\mu\text{mol Fe/g}$). Pacientes com essa sobrecarga necessitam saber o valor exato do LIC para conduzir seu tratamento, por exemplo, os casos de hemocromatose secundária, que possuem valores de LIC nesse intervalo¹⁶.

Para minimizar essa questão, Rose e colaboradores desenvolveram um algoritmo com duas sequências T1 para os casos $>350 \mu\text{mol Fe/g}$, melhorando significativamente a correlação com o verdadeiro LIC¹⁷.

Apesar de ser amplamente usado na prática clínica, há poucos estudos que comparam o protocolo de Rennes com a biópsia hepática. Em 2011, Castiella *et al.*¹⁸ analisaram os resultados do LIC obtido pelo método de Gandon e o obtido via "padrão-ouro". A pesquisa demonstrou que o método por RM classificava corretamente 105 de 170 pacientes (61%) de acordo com vários níveis de sobrecarga férrica (Normal $< 36 \mu\text{mol de Fe/g}$, moderada $37-79 \mu\text{mol de Fe/g}$ e alta $> 79 \mu\text{mol de Fe / g}$). Observou-se também uma tendência a superestimar o valor do LIC, 43% de pacientes normais foram diagnosticados com sobrecarga de ferro e 45% de pacientes com sobrecarga moderada foram classificados como sobrecarga alta.

Um estudo recente realizado por Alústiza *et al.*¹⁹, visou construir um simulador com diferentes concentrações de ferro para reproduzir o comportamento de uma sobrecarga moderada e alta no fígado e avaliar os já existentes métodos validados para medição de LIC por RM usando simuladores e pacientes em diferentes escâneres. Os resultados demonstraram que o simulador construído reproduz os pacientes com níveis elevados de ferro. Também se concluiu que o modelo de RSR produzido pelo grupo para a medição do LIC é reproduzível em aparelhos de 1,5T de marcas diferentes. Nenhum dos pacientes sem sobrecarga foi diagnosticado erroneamente. Além disso, pacientes com sobrecarga férrica foram classificados corretamente. Nenhum outro estudo, até o momento, havia analisado tantos pacientes e máquinas como esse. Entretanto, vale ressaltar que os resultados de medição do LIC não foram comparados com os de biópsia hepática.

Métodos por relaxometria

As propriedades paramagnéticas do ferro no fígado diminuem o tempo de relaxação T2. Essa aceleração do relaxamento T2 é proporcional à sobrecarga férrica, sendo assim ocasiona diminuição da intensidade de sinal do fígado⁶.

Neste tipo de técnica (figura 02), uma série de imagens é adquirida ajustando o decaimento da intensidade média de sinal do tecido em interesse (no caso, o fígado) em vários TE's. Esses valores podem ser expressos como taxa de relaxamento R2 ($1/T2$) ou relaxamento R2* ($1/T2^*$). Enquanto na RSR a intensidade de sinal entre dois tecidos é comparado a um TE, na relaxometria se avalia a intensidade de sinal de um único tecido em múltiplos TEs e com ângulo de inclinação fixo. A intensidade de sinal é representada graficamente como uma função do TE e um mapa paramétrico de T2 é fornecido automaticamente^{20,21}.

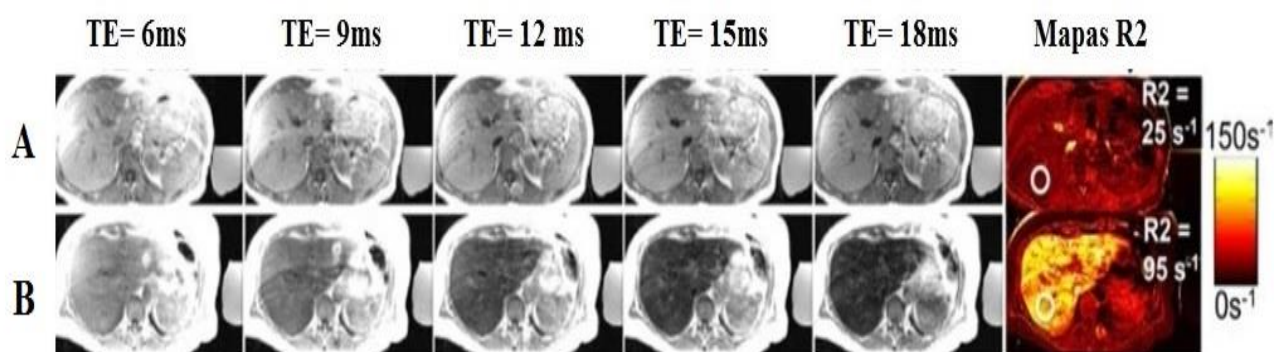


Figura 2: Processo de mapeamento de R2 ($1/T2$). Várias imagens são adquiridas através de seqüências spin eco com crescentes TE's. Ao final um mapa R2 é gerado. A- Paciente sem sobrecarga de ferro. B- Paciente com sobrecarga de ferro.¹¹

O TE é um parâmetro importante para a relaxometria, pois ele pode minimizar as desvantagens de R2. Para isso, o primeiro TE deve ser o mais curto possível (5ms ou menos para T2 e 1ms ou menos para T2*) e o último TE deve ser o mais logo que se possa conseguir (15-30 ms para T2 e 10-15 ms para T2*) para que o cálculo seja confiável (figura 03). Não há uma quantidade determinada para quantos TEs devem ser feitos, mas o ideal é obter a maior quantidade possível (respeitando os limites da aquisição) a fim de amostrar todo decaimento exponencial da magnetização transversa²².

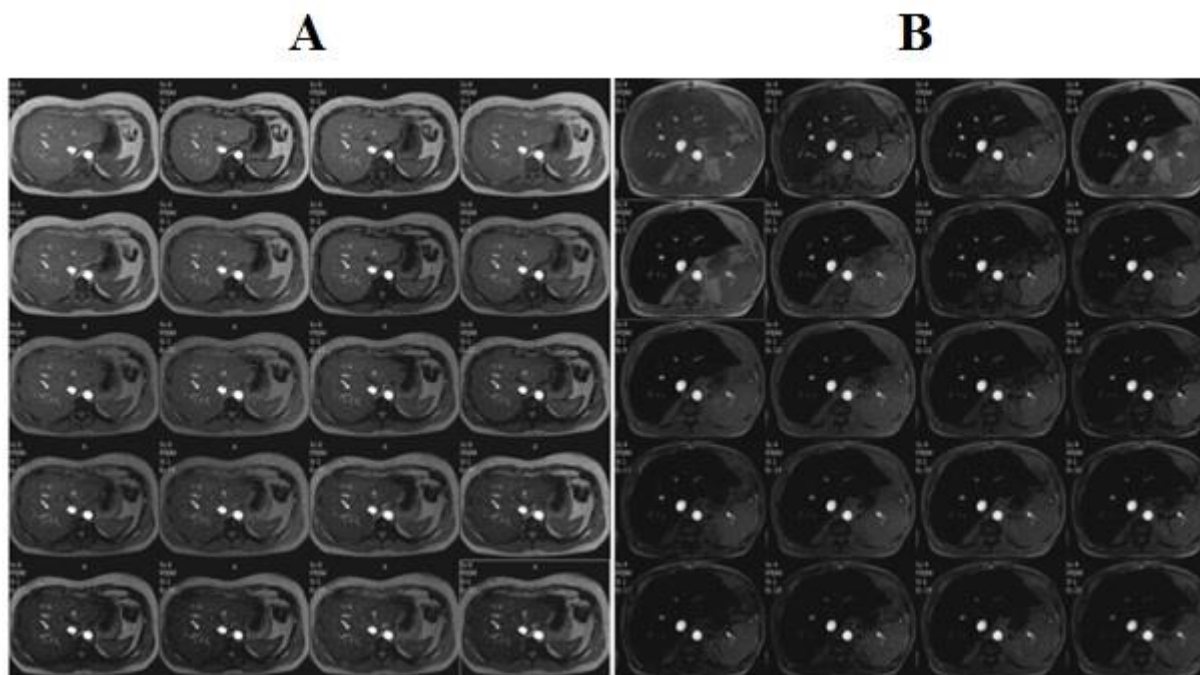


Figura 3: Sequências multi-eco em dois pacientes com diferentes valores de LIC (TR= 21ms, ângulo de inclinação de 35°, TE inicial= 1,22ms; intervalos entre TE's= 1ms e 20 ecos), tempo de aquisição 14,5 s; matriz= 244/145. A- Paciente sem sobrecarga de ferro, isodensidade do fígado em todos os ecos. B- Paciente com sobrecarga de ferro com perda de sinal nos primeiros ecos.⁶

Várias pesquisas já demonstram que a alta correlação entre os valores do LIC obtidos em R2 e R2* com os obtidos via biópsia hepática^{23,24}. Algoritmos matemáticos estão sendo desenvolvidos para transformar esses valores do LIC pela taxa de relaxamento em mg Fe/g.^{9,10} Além disso, a técnica permite a medição de ferro no miocárdio, parâmetro importante para pacientes com hemocromatose secundária⁶.

Apesar dos estudos avançados, esse método ainda possui algumas limitações importantes. Em relação aos índices R2 e R2*, por exemplo, ainda não há um consenso sobre qual deles é melhor para mensurar o LIC^{9,25}. Medições R2 são menos sensíveis do que R2* se parâmetros técnicos (tipo de scanner, tamanho do voxel e largura da banda), artefatos metálicos e influência do campo magnético externo forem levados em consideração^{9,26}. Além do mais, R2* é menos sensível do que R2 às variações de distribuição das partículas de Fe, portanto pode ser menos suscetível a erros de resultados por fatores como cirrose. Por outro lado, para R2* utiliza-se sequências GRE, as quais sofrem imprecisões às altas taxas de Fe²⁷.

Uma das técnicas mais conhecidas em relaxometria foi a desenvolvida por St. Pierre *et al*^{9,20}. Em 2004, esse grupo de pesquisadores realizou um estudo não

linear de calibração de R2 em mais de 100 pacientes que foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos. Esse método usa cinco sequências single spin-eco (SSE) ponderadas em T2, sem apnéia, com TR constante (2500 ms) e TE crescentes, espaçados em 3 ms (6,9,12,15,18 ms). As imagens são adquiridas num modo semi-Fourier para diminuir o tempo de aquisição. Um simulador externo para calibração com T2 longo é necessário dentro do campo de visão para corrigir o desvio instrumental através das sequências. O pós-processamento requer várias etapas incluindo correção do movimento respiratório, subtração do ruído de fundo, estimativa da intensidade de sinal em TE= 0 e um modelo biexponencial de modelagem pixel a pixel para gerar mapas paramétricos de R2.

Para validar esse estudo, mais de 100 pacientes com LIC entre 0,3 a 42,7 mg/Fe de peso seco foram avaliados. A R2 do fígado demonstrou uma relação curvilínea com o LIC e o coeficiente de correlação foi de 0,98 com limites de concordância entre -56% e 50%. A concentração de ferro hepática pôde ser calculada a partir de R2 como $[Fe] = (29.75 - \sqrt{900.7 - 2.283R2})^{1.424}$. Essa equação foi obtida a partir do estudo feito em um campo de 1,5T e com os parâmetros estabelecidos por St. Pierre. Uma desvantagem é a elevada taxa cobrada pela Ressonance Health® para a distribuição da técnica além do alto tempo de aquisição da imagem (10 a 20 minutos)²⁷. E por fim, como a relação com o LIC é curvilínea, o método é relativamente insensível a variações longitudinais do LIC em pacientes com sobrecarga muito elevada, o que pode dificultar a monitorização da doença.

Todavia, recentemente o mesmo autor provou a reprodutibilidade do experimento através de um estudo com pacientes com sobrecarga férrica causada por talassemia²⁸. Os resultados mostraram que a curva de calibração não depende do tipo de escâner, idade do paciente, fase de fibrose hepática, grau de cirrose e terapia de quelação, embora o limite de concordância entre o LIC por R2 e o LIC por biópsia tenha sido amplo (Entre 74% e - 71%). Os autores confirmam ser uma técnica útil para o monitoramento clínico seguro e não invasivo para avaliar os níveis de ferro hepático.

Quanto à calibração e validação de técnicas R2*, Wood *et al.*¹⁰ obtiveram os resultados mais relevantes.¹⁰ Eles calibraram os valores de R2* em 20 pacientes com talassemia não dependentes de transfusão ou anemia falciforme, usando 17 sequências GRE ponderadas em T2*, TR constante, uma única apnéia e TE crescente com intervalos de 0.25 ms. Os dados foram

calculados em uma curva de decaimento monoexponencial com constante defasamento, numa base pixel a pixel, gerando um mapa paramétrico.

Eles também compararam as estimativas do LIC por $R2^*$ com as obtidas por biópsia de pacientes com anemia falciforme ou talassemia. Esses pacientes possuíam LIC entre 1,3 e 32,9 Fe/mg peso seco e uma relação linear entre $R2^*$ e o LIC foi obtida, com correlação de coeficiente de 0,97 e limites de concordância entre -46% a 44%. Essa relação pode ser demonstrada através da equação empírica $[Fe]=0.202+0.0254R2^*$. Assim como no estudo de St. Pierre, esse também foi validado apenas para intensidade de campo particular e parâmetros de imagens de Wood. Ademais, a quantificação da linearidade foi demonstrada em um LIC de até 32,9 mg de ferro/g de peso seco.

O principal ponto negativo das técnicas de $R2^*$ são as variabilidades em diferentes protocolos de aquisição e a pouca reprodutibilidade¹¹. Novas pesquisas estão sendo realizadas a fim de minimizar esses problemas. Estudos de medições $T2^*$ cardíacas e do fígado vêm apresentando bons resultados, a exemplo de Kirk *et al.*²⁹ que avaliaram a reprodutibilidade multicêntrica do fígado e do coração através de $T2^*$ em 49 pacientes. Os pacientes realizaram os exames em diversos países em RM de 1,5T de diferentes marcas, utilizando sequências de apnéia. O resultado mostrou que usando parâmetros consistentes de aquisição e técnicas de quantificação $T2^*$, medições do coração e do fígado apresentam boa reprodutibilidade multicêntrica. (Coeficiente de variação <6% em ambos os casos).

O acesso a esse tipo de método também é limitado e o número equipamentos que conseguem realizar esses cálculos continua pequeno. Alguns centros afirmam que sequências multi-eco $T2^*$ ainda não são comercializadas e necessitam de uma instalação especial. A própria ferramenta pós-processamento autorizada pela FDA necessita taxas de licenciamento, ocasionando custos adicionais ao exame^{6,27}.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A quantificação de ferro hepática é necessária para diagnóstico, tratamento e monitoramento de pacientes com HH. Marcadores séricos são inespecíficos e a biópsia hepática possui alto custo, além de ser invasiva. A RM, por ser amplamente disponível, tem um papel potencial para se tornar um diagnóstico preciso e diferenciado para pacientes com sobrecarga de ferro.

Os métodos por relaxometria tem demonstrado ser a melhor maneira de quantificar o LIC via RM. Possuem resultados mais precisos e que abrangem todos os níveis de sobrecarga férrica, além de avaliar o ferro no miocárdio, auxiliando pacientes com hemocromatose secundária. Em contrapartida, a falta de padronização e alto custo de instalação da ferramenta é um empecilho para que seja usado no monitoramento da doença. Ademais, não há tantos estudos demonstrando a reprodutibilidade de R2*.

Mesmo os métodos por RSR possuindo uma acurácia menor para quantificar o LIC (<350 $\mu\text{mol Fe/g}$), eles já são utilizados na prática clínica e estudos recentes mostram que os protocolos tendem a melhorar. É uma solução a curto prazo, pois já é uma técnica amplamente utilizada e disponível, o protocolo de Rennes é simples e acessível, além de não ter alto custo quanto comparada à relaxometria.

Por fim, a RM tem se mostrado um promissor método diagnóstico para sobrecarga férrica, apesar de falta de maior reprodutibilidade na relaxometria e resultados mais precisos na RSR, os estudos demonstram que em alguns anos essas lacunas serão fechadas e protocolos novos tendem a surgir, proporcionando um diagnóstico não invasivo e um monitoramento adequado para pacientes com HH.

REFERÊNCIAS

1. Aymone WC, Valiati V, Resem MGFS, Peres W. Hemocromatose hereditária. J Bras Med. 2013;101(6):27-33.
2. Cancado RD, Chiattoni CS. Visão atual da hemocromatose hereditária. Rev Bras Hematol Hemoter. 2010;32(6):469-75.
3. Pinho R, Fernandes S, Leite S, Pinto J, Afonso M, Silva AP, *et al.* Revisão das manifestações da hemocromatose a propósito de um caso clínico com 25 anos de evolução. J Port Gastroenteol. 2008;15(4):161-7.
4. Cappellini MD, Cohen A, Eleftheriou A, Piga A, Porter J, Taher A. Guidelines for the clinical management of thalassaemia, 2nd revised edition. Thalassaemia International Federation; 2008.
5. Emond MJ, Bronner MP, Carlson TH, Lin M, Labbe RF, Kowdley KV.

- Quantitative study of the variability of hepatic iron concentrations. *Clin Chem*. 1999;45(3):340-6.
6. Echeverria JMA, Castiella A, Empananza JI. Quantification of iron in the liver by RMI. *Insights Imaging*. 2012;3(2):173-80.
 7. Sirlin CB, Reeder SB. Magnetic resonance imaging quantification of liver iron. *Magn Reson Imaging Clin N Am*. 2010;18(3):359-81.
 8. Gandon Y, Olivie D, Guyade D, Aubé C, Oberti F, Seville V, *et al*. Non-invasive assessment of hepatic iron stores by MRI. *Lancet*. 2004;363(9406):357-62.
 9. St Pierre TG, Clark PR, Chua-Anusorn W. Single spin-echo proton transverse relaxometry of iron-loaded liver. *NMR Biomed* 2004;17(7):446-58.
 10. Wood JC, Enriquez C, Ghugre N, Tyzka JM, Carson S, Nelson MD, *et al*. MRI R2 and R2* mapping accurately estimates hepatic iron concentration in transfusion-dependent thalassemia and sickle cell disease patients. *Blood*. 2005;106(4):1460-5.
 11. Hernando D, Levin YS, Sirlin CB, Reeder SB. Quantification of liver iron with MRI: State of the art and remaining challenges. *J Magn Reson Imaging*. 2014;40(5):1003-21.
 12. Gandon Y, Guyader D, Heautot JF, Reda MI, Yaouanq J, Buhé T, *et al*. Hemochromatosis: diagnosis and quantification of liver iron with gradient-echo MR imaging. *Radiology*. 1994;193(2):533-8.
 13. Bonkovsky HL, Rubin RB, Cable EE, Davidoff A, Rijcken TH, Stark DD. Hepatic iron concentration: noninvasive estimation by means of MR imaging techniques. *Radiology*. 1999;212(1):227-34.
 14. Virtanen JM, Komu ME, Parkkola RK. Quantitative liver iron measurement by magnetic resonance imaging: in vitro and in vivo assessment of the liver to muscle signal intensity and the R2* methods. *Magn Reson Imaging*. 2008;26(8):1175-82.

15. Olthof AW, Sijens PE, Kreeftenberg HG, Kappert P, van der Jagt EJ, Oudkerk M. Non-invasive liver iron concentration measurement by MRI: Comparison of two validated protocols. *Eur J Radiol.* 2009; 71(1):116-21.
16. St Pierre TG, Clark PR, Chua-Anusorn W. Measurement and mapping of liver iron concentrations using magnetic resonance imaging. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1054:379-85.
17. Rose C, Vandevenne P, Bourgeois E, Cambier N, Ernst O. Liver iron content assessment by routine and simple magnetic resonance imaging procedure in highly transfused patients. *Eur J Haematol.* 2006;77(2):145-9.
18. Castiella A, Alústiza JM, Emparanza JI, Zapata EM, Costero B, Díez MI. Liver iron concentration quantification by MRI: are recommended protocols accurate enough for clinical practice? *Eur Radiol.* 2011;21(1):137-41.
19. Alustiza JM, Emparanza JI, Castiella A, Casado A, Garrido A, Aldazabal P, *et al.* Measurement of liver iron concentration by MRI is reproducible. *BioMed Res Int.* 2015; 2015:8.
20. St Pierre TG, Clark PR, Chua-Anusorn W, Fleming AJ, Jeffrey GP, Olynyk JK, *et al.* Noninvasive measurement and imaging of liver iron concentrations using proton magnetic resonance. *Blood.* 2005;105(2):855-61.
21. Alexopoulou E, Stripeli F, Baras P, Seimenis I, Kattamis A, Ladis V, *et al.* R2 relaxometry with MRI for the quantification of tissue iron overload in beta-thalassemic patients. *J Mag Reson Imaging.* 2006;23(2):163-70.
22. Wood JC, Ghugre N. Magnetic resonance imaging assessment of excess iron in thalassemia, sickle cell disease and other iron overload diseases. *Hemoglobin.* 2008; 32(1-2):85-96.
23. Westwood MA, Anderson LJ, Firmin DN, Gatehouse PD, Charrier CC, Wonke B, *et al.* A single breath-hold multiecho T2* cardiovascular magnetic resonance technique for diagnosis of myocardial iron overload.

- J Magn Reson Imaging. 2003;18(1):33-9.
24. Hankins JS, McCarville MB, Loeffler RB, Smeltzer MP, Onciu M, Hoffer FA, *et al.* R2* magnetic resonance imaging of the liver in patients with iron overload. *Blood*. 2009;113(20):4853-5.
 25. Argyropoulou MI, Astrakas L. MRI evaluation of tissue iron burden in patients with beta-thalassaemia major. *Pediatr Radiol*. 2007;37(12):1191-200.
 26. Brewer CJ, Coates TD, Wood JC. Spleen R2 and R2* in iron-overloaded patients with sickle cell disease and thalassemia major. *J Magn Reson Imaging*. 2006;29(2):357-64.
 27. Wood JC. History and current impact of cardiac magnetic resonance imaging on the management of iron overload. *Circulation*. 2009;120(20):1937-9.
 28. St Pierre TG, El-Beshlawy A, Elalfy M, Al Jefri A, Al Zir K, Daar S, *et al.* Multicenter validation of spin-density projection-assisted R2-MRI for the noninvasive measurement of liver iron concentration. *J Magn Reson Imaging*. 2014;71(6):2215-23.
 29. Kirk P, He T, Anderson LJ, Roughton M, Tanner MA, Lam WW, *et al.* International reproducibility of single breathhold T2* MR for cardiac and liver iron assessment among five thalassemia centers. *J Magn Reson Imaging*. 2010;32(2):315-9.