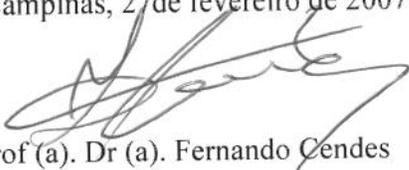


FABIANO REIS

ESCLEROSE MÚLTIPLA:

**Espectroscopia de prótons de alta resolução do líquido e
correlação com atividade inflamatória**

Este exemplar corresponde à versão final da **Tese de Doutorado** apresentada ao Programa de Pós-Graduação Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia Médica, área de Neurociências do (a) aluno (a) **FABIANO REIS**
Campinas, 27 de fevereiro de 2007.


Prof (a). Dr (a). Fernando Cendes
Orientador (a)

CAMPINAS

2007

FABIANO REIS

ESCLEROSE MÚLTIPLA:

Espectroscopia de prótons de alta resolução do líquido
e correlação com atividade inflamatória

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia Médica, área de
concentração em Neurociências*

ORIENTADOR: PROF. DR. FERNANDO CENDES

CAMPINAS

2007

UNID.	80
Nº CH	T/Unicamp R277e
V.	Ed.
TOMBO SC/	71883
PROC.	1614507
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	4,00
DATA	30/03/07
BIB-ID	

BIBID - 406121

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

R277e Reis, Fabiano
Esclerose múltipla : espectroscopia de prótons de alta resolução do líquor e correlação com atividade inflamatória / Fabiano Reis.
Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientador : Fernando Cendes
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Gadolínio. 2. Acetoacetatos. 3. Glutamatos. 4. Quimioterapia. 5. Ressonância magnética. I. Cendes, Fernando. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Multiple sclerosis: high resolution magnetic resonance spectroscopy and correlation with inflammatory course

Keywords: • Gadolinium
• Glutamine
• Glutamates
• Chemotherapy
• Magnetic resonance

Área de concentração : Neurociências

Titulação: Doutorado em Fisiopatologia Médica

**Banca examinadora: Prof Dr Fernando Cendes
Prof Dr Cláudio Campi Castro
Prof Dr Antônio José da Rocha
Prof Dr Nelson Márcio Gomes Caserta
Prof Dr Benito Pereira Damasceno**

Data da defesa: 27-02-2007

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Orientador: Prof. Dr. Fernando Cendes

Membros:

1. Prof. Dr. Fernando Cendes
2. Prof. Dr. Cláudio Campi Castro
3. Prof. Dr. Antônio José da Rocha
4. Prof. Dr. Nelson Márcio Gomes Caserta
5. Prof. Dr. Benito Pereira Damasceno

200713895
Curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 27 / 02 / 2007

DEDICATÓRIA

*Para meus pais, Manoel e Luzia,
e minha avó.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre presente em minha vida, orientando-me pelos melhores caminhos

Ao Prof. Dr. Fernando Cendes

À Prof. Dra. Sandra Ferreira Silveira, pela amizade e apoio constantes

Ao Prof. Dr. Antônio José da Rocha

Ao Prof. Dr. Nelson Márcio Gomes Caserta

À Prof. Dra. Verônica de Araújo Zanardi

À Prof. Dra. Andréia Vasconcellos Faria

À Prof. Dra. Elenice Moraes Ferrari

À Dra. Carla Stella

À Prof. Dra. Anita Marsaioli e Isis Martins Figueiredo, do Instituto de Química

À Prof. Dra. Márcia Ferreira

À Dra. Anna Elisa Scotoni Silva

À Dra. Lisiane Segutti Ferreira

À Dra. Adriana Cristina Correa, pela amizade e companheirismo

À Dra. Viviane Rabello

Aos colegas da Radiologia Clínica de Campinas

Aos colegas do CID-Centro de Imagem Diagnóstica

Aos colegas do Setor de Líquidos Biológicos e Imunologia do Laboratório de Patologia Clínica do HC/Unicamp

Ao Fabrício Ramos, do Laboratório de Neuroimagem

Ao Márcio Lima, Cecília Godoy e Solange Pereira, da Secretaria da Neurologia

Aos amigos, Ana Maria Manzi, Osmary Oliveira, Yvone Gargantini

"A sementeira é livre, mas a colheita é obrigatória"

Espírito Emmanuel

"Há homens que lutam um dia e são bons.

Há outros que lutam um ano e são melhores.

Há os que lutam muitos anos e são muito bons.

Porém, há os que lutam toda a vida.

Esses são os imprescindíveis."

Bertolt Brecht

	PÁG.
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1- INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2- OBJETIVOS.....	42
3- CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	44
3.1- Aspectos éticos.....	45
3.2- Identificação do grupo de estudo.....	45
3.3- Estudo <i>in vitro</i>	46
3.4- Estudo <i>in vivo</i>	49
4- RESULTADOS.....	51
5- DISCUSSÃO.....	58
6- CONCLUSÕES.....	66
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
8- ANEXOS.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS

BHE	barreira hematoencefálica
Col	colina
Cre	creatina
EM	esclerose múltipla
ERM 1H	espectroscopia de hidrogênio por ressonância magnética
Gl	glicina
Glu	glutamato/glutamina
Lac	lactato
Lip	lipídeos
LCR	líquor
MI	mioinositol
NAA	N-acetil aspartato
PP	forma progressiva primária da esclerose múltipla
PS	forma progressiva secundária da esclerose múltipla
RM	ressonância magnética
RR	forma remitente-recorrente da esclerose múltipla
SNC	sistema nervoso central
TE	tempo de eco

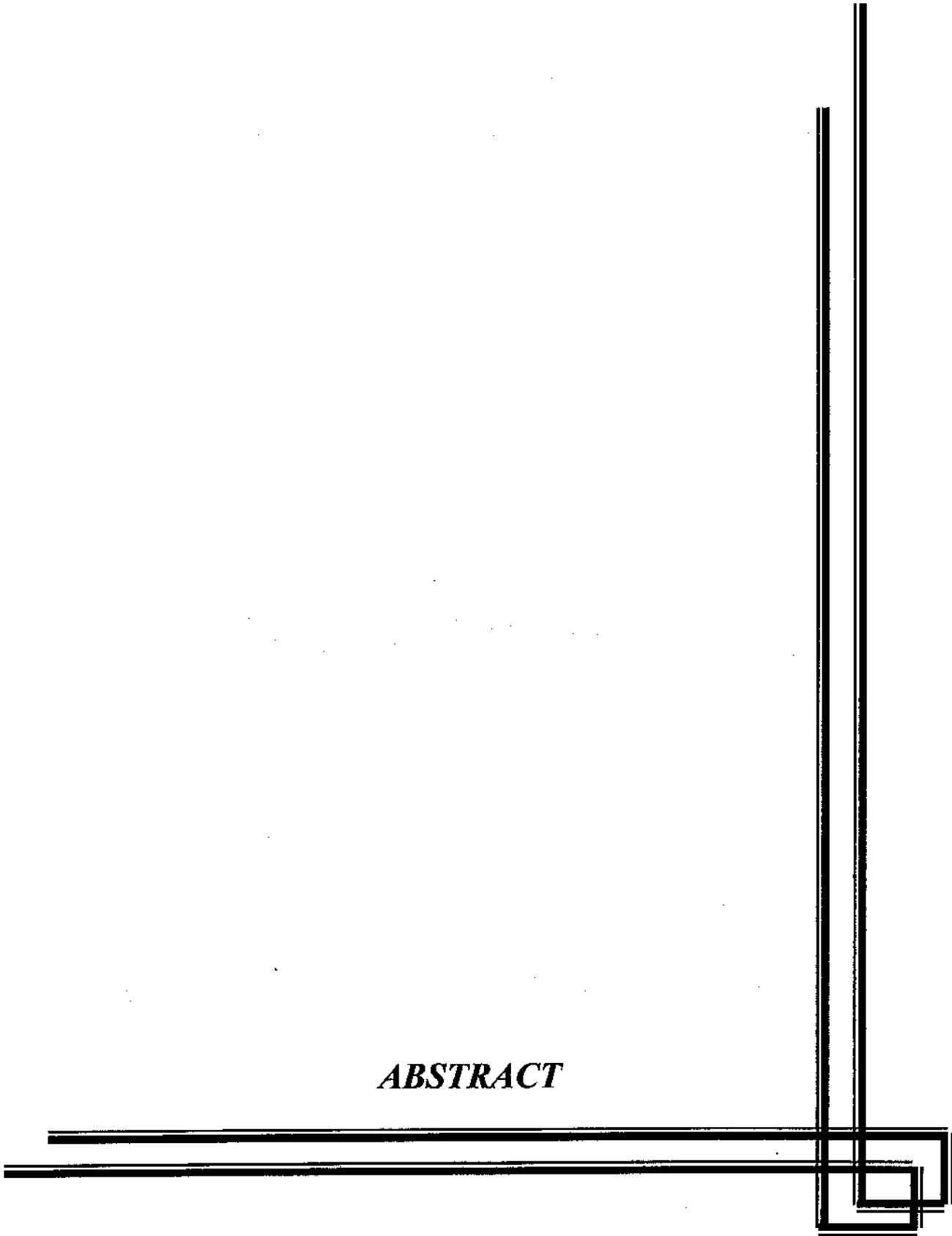
	<i>PAG.</i>
Figura 1- Representação gráfica do índice de IgG.....	27
Figura 2- Padrão espectral típico de uma amostra <i>in vitro</i> (11,7T).....	31
Figura 3- Modelo esquemático do metabolismo do NAA.....	35
Figura 4a- Coleta de material para obtenção do espectro <i>in vitro</i> : 0,5 ml de líquido foi adicionado a 0,1 ml de 0,75 mM de TSP.....	46
Figura 4b- Foi utilizado espectrômetro VARIAN INOVA-500 (11,7 T).....	47
Figura 5- RM seqüência axial, ponderada em FLAIR.....	53
Figura 6- Comparação entre os espectros <i>in vitro</i> (faixa entre 0,15 e 1,25 ppm).....	54
Figura 7- Comparação entre os espectros <i>in vitro</i> (faixa entre 2,0 e 2,5 ppm).....	55
Figura 8- Comparação entre os espectros <i>in vitro</i> (faixa entre 3,5 e 4,0 ppm).....	56
Figura 9- Análise discriminatória dos espectros de LCR de EM e controles.....	57

RESUMO



Estudamos o líquido cefalorraquidiano (LCR) de 24 pacientes com esclerose múltipla (EM) e 11 sujeitos controles por espectroscopia de prótons de alta resolução por ressonância magnética. A aplicação da espectroscopia de prótons do LCR pode detectar metabólitos em situações normais e patológicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar quais alterações metabólicas estão associadas à EM e estabelecer se as alterações da composição do líquido dos pacientes com EM refletem alterações metabólicas que ocorrem nesta doença desmielinizante. Foram analisadas amostras de líquido obtidas por punção lombar em 24 pacientes com EM (cl clinicamente definida), 9 homens e 15 mulheres, com idade média de início da doença de 30 anos; pacientes com polineuropatia idiopática, cefaléia, síndromes meningo-radiculares e um paciente que fora submetido à punção para mielo-CT, foram utilizados como controles (11 pacientes). Uma porção de cada amostra de líquido foi armazenada para análise por RM, na qual 0,5 ml de LCR foram adicionados a 0,1 ml de 0,75 mM de TSP (sodium 3-trimethyl-silylpropionate-2,2,3,3-d). Foi utilizado um espectrômetro VARIAN INOVA-500 (11,7 T), que opera a 499,886 MHz. Os espectros foram armazenados a 298 K e representaram a soma de 64 transientes adquiridos de dados 64 K, com amplitude espectral de 10 kHz. Todos os espectros foram ajustados previamente à análise estatística multivariada e o padrão de reconhecimento foi ajustado ao pico do TSP para a mesma altura em todas as amostras e corrigidos os desvios espectrais e a linha de base. A concentração de metabólitos do líquido de pacientes com EM e controles foi estabelecida pela integração de picos isolados medidos relativos a TSP, corrigidos para o número relativo de prótons. As principais diferenças encontradas entre EM e controles foram aumentos dos níveis de acetoacetato, glutamina/glutamato e beta-hidroxi-butarato nos pacientes com EM em comparação aos controles. Alanina, treonina, valina, leucina e isoleucina constituem cerca de 40% dos proteolípides da mielina e cerca de 20% da proteína básica da mielina. Acetoacetato e beta-hidroxi-butarato resultam da degradação destes aminoácidos, que além de estarem relacionados à degradação desses aminoácidos, podem ser resultantes da patologia em oligodendrócitos.

ABSTRACT



Abstract: We studied cerebrospinal fluid (CSF) of 24 patients with multiple sclerosis (MS) and 11 control subjects by high resolution proton MR spectroscopy. The application of ^1H magnetic resonance spectroscopy in cerebrospinal fluid (CSF) analysis may detect metabolites in normal and pathological conditions. The purpose of this work was to evaluate what biochemical changes were related to multiple sclerosis (MS) and establish whether the CSF composition in MS patients reflects metabolic changes occurring in this demyelinating disease. CSF samples obtained by lumbar puncture in 24 MS patients (clinically definite), 9 male and 16 female, with mean age of disease beginning around 30 years; patients with idiopathic polyneuropathy ; headache, and meningitis, and one patient submitted to myelo-tomography were used as controls (11 patients). A portion of each CSF sample was stored until NMR analysis, at which time 0,5 ml CSF were added to 0,1 ml of 0,75 mM sodim 3-trimethyl-silylpropionate-2,2,3,3-d (TSP), chemical shift reference (0,0 ppm), in D_2O . A Varian INOVA-500 (11,7 T) spectrometer, operating at 499,886 MHz, was used. Spectra were recorded at 298 K and represented the sum of 64 transients acquired over 64 K data points with a spectral width of 10 kHz. All spectra were treated prior to the multivariate statistics and pattern recognition by adjusting the TSP peak to the same height and by correcting the spectra shift and baseline. Metabolite concentrations in CSF from the patients with MS and controls were determined by integration of isolated peaks measured relative to TSP, correcting for the relative number of protons. The major differences between the MS and control patients by visual inspection were the relative increased levels of acetoacetate; glutamine/glutamate and beta-hydroxybutirate in MS patients, compared to controls. Alanine, threonine, valine, leucine and isoleucine account for 40% of the myelin proteolipid protein and for 20% of the myelin basic protein. Acetoacetate and beta-hydroxybutirate result from the degradation of these aminoacids, which besides being related to the breakdown of myelin, may result of oligodendrocyte pathology. During inflammation, lymphocytes, microglia and macrophages release excessive amounts of glutamate. Astrocytes impairment of glutamate uptake may contribute to excitotoxic damage of oligodendrocytes in MS.

1- INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória crônica do sistema nervoso central (SNC) de etiologia desconhecida, caracterizada pela infiltração de células do sistema imune e destruição localizada da mielina, provavelmente desencadeada por reação auto-imune contra proteínas que constituem a bainha de mielina, resultando na perda de oligodendrócitos e axônios (Bruck *et al.*, 1997). O substrato patológico envolve a ativação de uma população específica de linfócitos T pró-inflamatórios, os Th1, que são auto-reativos, reconhecendo auto-antígenos relacionados com os epítopos da proteína básica de mielina. Com esta ativação, eles atravessam a barreira hematoencefálica e penetram no SNC. As células são reativadas por antígenos locais e respondem com a produção de ampla gama de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-2 e interleucina-12. Estas citocinas ativam os macrófagos, que destroem a bainha de mielina dos axônios.

Há evidências de susceptibilidade genética ao desenvolvimento da EM. Em geral, parentes de primeiro grau de probandos apresentam risco de 30-50 vezes maior de terem a doença do que a população em geral. Há associação da EM com alelos específicos de HLA. Os genes de HLA que codificam estes antígenos são encontrados no braço curto do cromossomo 6. Associa-se o HLA-DR2 com a EM, e, de modo menos significativo, com HLA-A3 e B7 na EM em caucasianos. O sistema HLA é parte integrante da resposta do sistema imune. Alguns alelos, como o HLA DR e HLA DQ, conferem risco aumentado para o desenvolvimento da EM. Provavelmente, existem muitos genes que conferem susceptibilidade ao desenvolvimento da EM, e a expressão de modificações sutis destes genes depende de fatores ambientais. Estudos epidemiológicos de migrantes apontam para a existência de fatores ambientais, particularmente quando estiverem presentes antes dos 15 anos de idade. Especula-se a possibilidade de uma etiologia viral, entretanto, nunca um agente viral específico foi isolado do sistema nervoso central destes pacientes. Alguns vírus como o Herpes tipo 6, influenza, papiloma e Epstein-Barr, apresentam genes que codificam peptídeos que contêm seqüências de aminoácidos semelhantes às observadas nas proteínas estruturais maiores da mielina. Assim, anticorpos reativos a estas seqüências de peptídeos podem apresentar reação cruzada com componentes da bainha de mielina. Contudo, nenhum vírus isoladamente pôde ser definido como o agente causador da EM, assim,

nenhum agente causal, isoladamente, existe e a combinação de vírus agindo sinergicamente pode ser necessária para desencadear a patologia observada (Dalglish, 1997).

Particularidades da proteína básica de mielina (PBM) também têm sido associadas com a EM. Admite-se que em pacientes com EM, a PBM tem uma natureza menos catiônica, o que é atribuído a um aumento da proporção relativa de componente menos catiônico (C-8) (componente citrulinado principal) que é de 18% em indivíduos controles e de 45% em pacientes com EM; há um decréscimo compensatório do componente mais catiônico (C-1) (Moscarello *et al.*, 1994). E, desde que a capacidade da PBM de formar camadas estáveis e compactas depende das cargas positivas, a natureza menos catiônica em pacientes com EM pode torná-la menos capaz de executar esta função, sugerindo uma perda inerente da estabilidade da mielina (Moscarello *et al.*, 1986)

A doença apresenta maior prevalência nos países do hemisfério norte (80 a 100 casos por 100.000 habitantes). Na cidade de São Paulo, a prevalência estimada de EM, no ano de 1997, foi de 15 casos por 100.000 habitantes (Goldbaum, 1998; Callegaro, 2001). A EM é mais prevalente em mulheres, dos 20 aos 40 anos, com evolução em surtos em 50 a 70% dos casos. A EM infreqüentemente se inicia na infância e, em geral, raramente se inicia após os 50 anos. Estima-se que em 3 a 5% dos casos a doença se inicie antes dos 16 anos, com preponderância no sexo feminino; o início antes da puberdade tem sido considerado excepcional, e representa 0,2% dos casos de EM (Balássy *et al.*, 2000). A apresentação clínica da EM é extremamente variável. A forma aguda progressiva (tipo Marburg) é rara. Para as outras formas clínicas, costumam-se identificar quatro tipos. Na maioria dos pacientes, a doença inicia com um curso remitente-recorrente (RR), definido pela observação de recorrências em intervalos distintos, com períodos de estabilidade entre os mesmos. A incapacidade nos pacientes com a forma RR ocorre porque a recuperação, entre os intervalos de atividade da doença, costuma ser incompleta. Pacientes com a forma RR evoluem para a forma progressiva secundária (SP), com incapacidade crescente, num período variável. Admite-se que nos pacientes com a forma SP, o desenvolvimento da incapacidade decorra da perda axonal progressiva e pronunciada, nas lesões ou na forma disseminada de doença multifocal. Há também, em 5-10% dos pacientes, uma forma primária progressiva (PP), na qual os pacientes, desde o início,

apresentam incapacidade progressiva. O termo forma benigna (BF) é utilizado quando, após remissões e recorrências, nenhuma progressão adicional da doença ocorre e o paciente é neurologicamente funcional 15 anos após os sintomas iniciais. Formas pseudo-tumorais da EM apresentam manifestações clínicas de lesões que exercem efeitos expansivos. Nestes casos, a história clínica, a presença de outros sintomas ou outras lesões no estudo de RM, bem como o efeito terapêutico de corticoesteróides podem auxiliar no diagnóstico correto.

O quadro clínico depende da distribuição das lesões, sendo mais freqüentes as síndromes medulares, de tronco cerebral, prejuízos na visão decorrentes de neurite óptica, hemiparesias, paraparesias e monoparesias, por acometimento do SNC. Menos freqüentemente pode apresentar manifestações clínicas atípicas, que incluem alterações comportamentais. A prevalência de epilepsia é de 2 a 5% nos pacientes com EM, e é maior que na população geral. A freqüência de crises parciais está aumentada nos pacientes que apresentam EM e convulsões. As lesões que geram as crises costumam estar localizadas nas áreas corticais e subcorticais (Thompson, 1993). O prejuízo cognitivo ocorre em 45 a 65% dos indivíduos e se correlaciona com a carga total de lesões justacorticais. Num estudo de Bo *et al.* (2003), 4 de 5 pacientes que à histopatologia apresentavam desmielinização subpial cortical generalizada mostraram sinais e sintomas de prejuízo cognitivo. Assim, isto pode indicar que lesões intracorticais podem ser a causa de demência em pacientes com EM.

Variantes da esclerose múltipla podem ser consideradas: esclerose múltipla clássica (Charcot); neuromielite óptica (NMO, ou doença de Devic); esclerose concêntrica (CS, doença de Baló); esclerose difusa (DS, ou doença de Schilder).

O diagnóstico da EM se baseia no quadro clínico evolutivo, com suporte de exames complementares. Em 1965, Schumacher foi o primeiro a definir critérios para o diagnóstico definitivo de EM. A idéia principal destes critérios é de que deve haver sintomas e sinais objetivos de doença multifocal da substância branca, com disseminação no tempo e no espaço, para os quais não há melhor explicação neurológica. Em 1983, Poser *et al.* foram os primeiros a estabelecer critérios diagnósticos que não fossem puramente clínicos, incluindo parâmetros laboratoriais (como anormalidades líquóricas) e evidência paraclínica de lesões multifocais na substância branca (através de tomografia

computadorizada e potenciais evocados). Atualmente, a ressonância magnética (RM) tem sido utilizada amplamente e é considerado o principal elemento paraclínico para demonstrar disseminação no tempo (pela presença de lesões com realce ou novas lesões em T2) e disseminação espacial (pelas múltiplas lesões observadas no cérebro e na medula) e mostra alterações em 95% dos pacientes com EM clinicamente definida .

Os achados típicos de RM encontrados na EM são um reflexo da histopatologia da doença. A localização periventricular, particularmente no corpo caloso, e o aspecto ovóide das lesões com extensões à substância branca adjacente (com aspecto de “dedos de Dawson”) são decorrentes da distribuição perivenular das placas. O painel internacional sobre diagnóstico de EM publicado por McDonald *et al.* (2001) estabelece os critérios de RM para caracterizar disseminação no espaço são baseados nos critérios de Barkhof (1997), com modificação proposta por Tintoré *et al.* (1999). Nestes, consideram-se quatro itens, sendo considerados preenchidos os critérios quando houver positividade em pelo menos três itens. Estes critérios são: uma lesão com realce pelo gadolínio ou nove lesões hiperintensas em T2 (uma lesão medular substitui uma lesão cortical); pelo menos uma lesão infratentorial; pelo menos uma lesão justacortical; pelo menos três lesões periventriculares. Lesões medulares podem ser consideradas como lesão infratentorial. Lesão medular captante é considerada equivalente à lesão encefálica captante e lesões medulares podem contribuir com lesões cerebrais para atingir o número de lesões necessárias em T2 para preenchimento dos critérios. Estes novos critérios diagnósticos permitem um diagnóstico mais precoce, sem comprometimento da acurácia, e, num grupo de pacientes acompanhados por 3 anos, apresentou sensibilidade de 74%, especificidade de 86% e acurácia de 80%, para o diagnóstico de EM clinicamente definida. Destes critérios, lesões com realce pelo gadolínio e lesões justacorticais foram as mais relevantes (com acurácia de 72 e 74%, respectivamente). Neste estudo de Barkhof (1997), foram acompanhados pacientes com síndromes desmielinizantes isoladas e avaliou-se, a longo prazo (39 meses), a evolução dos mesmos para EM clinicamente definida. A conversão para EM clinicamente definida em 50% dos casos foi observada em até 9 meses e 90% em 30 meses. Além disso, lesões localizadas nas regiões temporais e occipitais são observadas na EM (e têm valor preditivo positivo para o diagnóstico) (Namer *et al.*, 1993).RM do encéfalo normal tem alto valor preditivo negativo para EM. Entretanto, não se pode excluir

definitivamente o diagnóstico de EM quando a RM for normal. Thorpe *et al.* (1996) descreveram uma série de 20 pacientes com suspeita de EM com RM do encéfalo normal, porém todos eles apresentavam lesões na RM de medula, o que sugere que a avaliação por RM da medula aumenta a sensibilidade e também o valor preditivo negativo.

A disseminação no tempo e espaço pode ser bem caracterizada pela RM. Nos casos com mais de um surto e evidências clínicas de 2 ou mais lesões, o painel afirma não ser necessário nenhum teste adicional para confirmação do diagnóstico.

A RM do encéfalo é alterada em 87 a 95% dos casos e mostra lesões hipo ou isointensas em T1, hiperintensas nas aquisições em TR longo (T2, DP, FLAIR), com ou sem realce após a administração venosa do agente de contraste paramagnético. Lesões com padrão de realce anelar, incompleto ou aberto (a porção aberta do halo em geral é a que toca o córtex ou a substância cinzenta profunda), são sugestivas de etiologia desmielinizante, e este padrão pode ser útil para diagnóstico diferencial com lesões de natureza neoplásica ou até mesmo inflamatória (Masdeu, 2000). A distribuição das lesões na EM pode ser bastante variável, entretanto, há um padrão preferencial de localização das mesmas: a substância branca periventricular, particularmente nos ângulos laterais dos ventrículos laterais, assoalho do quarto ventrículo, pedúnculos cerebelares, medula espinhal, no nível cervical, nervos ópticos. Placas de desmielinização costumam ser observadas nas regiões subcorticais, na transição entre as substâncias branca e cinzenta. À RM também pode ser observado alargamento das dimensões do ventrículo, mesmo nos estágios iniciais da doença (Brex *et al.*, 2000). A desmielinização pode resultar em redução dos diâmetros dos axônios e fibras remielinizadas costumam ser mais finas que os axônios não afetados. A gliose reacional, que também pode ser observada nos pacientes com EM, pode causar contração tissular e resultar num aumento das dimensões ventriculares.

Do ponto de vista microscópico, o estágio mais precoce no desenvolvimento de placa de EM é um infiltrado linfocítico perivenular. E, no desenvolvimento das lesões da EM, admite-se que ocorra uma alteração da BHE, que permite a infiltração de células inflamatórias no SNC. Contudo, não se sabe se monócitos derivados do sangue ou se células microgliais são as mais importantes fontes do acúmulo de fagócitos. Ocorre um estágio no qual há infiltração tissular, difusa, de linfócitos e macrófagos, com edema,

desmielinização, proliferação e hiperplasia de astrócitos, aumento do número de macrófagos xantomatosos e axônios desmielinizados. A seguir, o processo inflamatório se torna menos exuberante, observam-se menos macrófagos e a gliose passa a ser proeminente. As placas crônicas de EM são áreas focais relativamente hipocelulares, de gliose, e com perda quase total de oligodendrócitos. Quatro tipos de reações histopatológicas são observados na EM (Lassmann, 2001): mediado por macrófagos, com processo inflamatório mediado por linfócitos T; mediado por anticorpos, com inflamação mediada por células T e lise mediada por complemento, com anticorpo anti-mielina como mecanismo básico; oligodendropatia distal, com vasculite de pequenos vasos mediada por células T; dano primário no oligodendrócito e desmielinização secundária, com inflamação mediada por células T e desmielinização induzida por toxinas de macrófagos. Há correlação entre a ressonância magnética de encéfalo e a incapacidade, sugerindo uma correlação positiva entre volume de lesão em T1 e atrofia cerebral com o comprometimento pela doença.

Os padrões de lesão, como tamanho e formato, em diferentes amostras de encéfalo, estudados histopatologicamente (De Groot, 2001), mostraram certa homogeneidade num mesmo paciente. Isto sugere que exista algum fator paciente-específico no desenvolvimento de lesão. Lucchinetti *et al.* (2000) encontraram também um padrão de desmielinização homogêneo num mesmo paciente e um padrão heterogêneo de lesões entre diferentes pacientes, que apresentavam lesões desmielinizantes em atividade.

Embora a desmielinização com preservação de axônios seja o achado patológico mais associado à EM, um estudo de Van Walderveen *et al.* (1995) mostrou que 87,5% dos pacientes de sua série apresentavam perdas axonais.

A quantificação de áreas e volumes de lesões cerebrais através da RM tem importância nas correlações entre incapacidade e neuroimagem, e na condução de estudos cuja finalidade é avaliar o efeito de medicações sobre a atividade da doença. Em RM, a atividade inflamatória da doença pode ser caracterizada pela presença de lesões que apresentam realce após a administração venosa do agente de contraste paramagnético (gadolinio), achado que denota aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica e

caracteriza inflamação aguda. Na encefalomielite alérgica experimental (Hawkins *et al.*, 1990) concluíram que lesões captantes de contraste não eram observadas sem evidências histológicas de inflamação, achado que corrobora a associação entre captação de contraste, com processo inflamatório e doença em atividade. Assim, a importância do realce pelo contraste na monitorização do tratamento é evidente. Os linfócitos podem ser ativados por causas não identificadas e podem penetrar a barreira hematoencefálica. As células endoteliais dos capilares do SNC não são fenestradas e são conectadas por “tight junctions”. As células endoteliais capilares expressam moléculas de adesão (V-CAM) e moléculas de classe II do complexo de histocompatibilidade. Linfócitos ativados podem penetrar a barreira do endotélio, guiados por moléculas de adesão, como as integrinas, que se ligam a V-CAM.

O realce pelo contraste paramagnético também pode ser decorrente do aumento do transporte vesicular, já que grande número de vesículas de pinocitose têm sido observadas no endotélio de vênulas cerebrais em placas agudas e subagudas (Brown, 1978). Além disso, a presença de realce pode ser o evento mais precoce no desenvolvimento de uma lesão. Entretanto, Lee *et al.* (1999), mostraram que muitas lesões novas podem aparecer em T2, sem correlação com lesões prévias captantes de gadolínio. Gay *et al.* (1997) evidenciaram que lesões agudas não estão necessariamente associadas à quebra da barreira hematoencefálica. Num estudo de Smith *et al.* (1993), 75% das lesões com realce mostraram esta alteração por um período menor ou igual a um mês. Aproximadamente 20% continuaram a ter realce por mais de um mês, e, em 5% dos casos o realce persiste por 3-4 meses. Lesões que mostrem realce por mais de 4 meses devem ser reavaliadas, e sua relação com a esclerose múltipla pode ser questionada, já que esta característica é mais compatível com outras entidades inflamatórias, infecciosas ou até mesmo com neoplasias.

De um modo geral, as alterações observadas nas seqüências ponderadas em T2 (e quantificação das mesmas) apresentam baixa correlação com o comprometimento dos pacientes (Barkhof & Filippi, 1995). As alterações detectadas nas seqüências ponderadas em T2 apresentam baixa especificidade e podem denotar edema, desmielinização, gliose e perda axonal. Particularmente nas regiões periventriculares (nas quais há grande densidade

de fibras comissurais de vias longas), admite-se que o surgimento de novas lesões em T2, possa, em parte, representar gliose progressiva secundária à degeneração Walleriana dos axônios. Análises histopatológicas de um grupo de 29 pacientes com EM (com idade média de 63 anos, com variação de 34 a 85 anos; com duração média da doença de 25 anos, com variação entre 7 e 54 anos) (De Groot, 2001) revelaram que 48% das lesões hiperintensas em T2 representavam lesões ativas, incluindo lesões localizadas na substância branca com aparência normal, não apresentavam perda significativa da mielina, e apresentavam graus variáveis de edema, pequenos agrupamentos de células microgliais, com expressão do complexo de histocompatibilidade classe II, e expressão dos antígenos CD 45 e CD 68 e infiltrados linfocitários perivasculares.

As seqüências ponderadas em T2 apresentam baixa sensibilidade para detectar lesões intracorticais, o que pode ser explicado pelo tempo de relaxação de lesões da substância cinzenta ser mais prolongado em razão da alta celularidade do córtex e efeitos de volume parcial em decorrência da proximidade com o líquido, além da ausência de inflamação significativa em lesões corticais. Assim, a menor sensibilidade das seqüências ponderadas em T2 para detectar lesões corticais pode explicar a fraca correlação entre a carga global de lesões e comprometimento dos pacientes. Técnicas em FLAIR (fluid-attenuated inversion recovery) têm mostrado um melhor contraste entre áreas de lesões corticais e justacorticais e aumentam a sensibilidade da RM para lesões corticais. Num estudo de Filippi (1996) incluindo 7 pacientes com EM, nas formas RR e SP, com utilização das seqüências FLAIR, mostrou-se 45% de lesões em regiões corticais ou subcorticais. Lesões justacorticais estão relacionadas com axônios que se dirigem para o córtex e costumam sugerir natureza desmielinizante, uma vez que doenças hipóxico-isquêmicas costumam preservar estas regiões (que contêm as fibras “U”).

O envolvimento da substância cinzenta, demonstrado por estudos patológicos e por RM, podem representar efeitos remotos da injúria à substância branca (diásquisis) ou efeitos diretos da doença sobre o córtex (Bermel *et al.*, 2005). Nestes pacientes, também se observa acúmulo de ferro, bem como alterações no metabolismo deste metal, que tem sido associados com os mecanismos fisiopatológicos da doença. Os níveis de ferritina estão elevados em pacientes com as formas crônicas progressivas. A heme oxigenase 1 está com

atividade alterada e isto leva a aumento tissular do ferro na EM. Grupos de ferro não-heme que atuam como catalisadores em reações de oxidação podem estar anormalmente seqüestrados na substância cinzenta, e isto pode contribuir para dano secundário causado pela peroxidação de lipídeos. Especula-se que a associação entre as hipointensidades em T2 e atrofia cerebral possa explicar o papel de depósitos patológicos de ferro como um mediador ou mesmo como um epifenômeno da doença. Particularmente os tálamos, locais em que as hipointensidades em T2 foram mais significativamente preditoras da progressão da atrofia, foram implicados como sítio de envolvimento na EM (Bermel *et al.*, 2005).

A perda tecidual irreversível na esclerose múltipla pode ser avaliada através da caracterização dos “buracos negros”, que são áreas focais com hipossinal em T1, que não apresentam realce pelo gadolínio. Este conceito é corroborado pelos achados post mortem que demonstram que a densidade de axônios diminui acentuadamente nos “buracos negros” (Van Waeseberghe *et al.*, 1999). Estas áreas são representativas das lesões crônicas da esclerose múltipla, nas quais proliferação astrocitária e cicatrizes se desenvolvem, e assim, dano local permanente ocorreu (Van Walderveen *et al.*, 1995).

Há também boa correlação entre a magnitude dos “buracos negros” e o nível de incapacidade. Contudo, num estudo de Truyen *et al.* (1996), mostrou-se que esta correlação foi encontrada somente em pacientes com a forma SP e não foi estabelecida em pacientes com a forma RR, e, dessa forma, estes achados sugerem que as lesões hipointensas, e a conseqüente perda axonal, desenvolvem-se como uma conseqüência na falha na remissão. Num estudo de Barkhof *et al.* (2001), encontrou-se uma menor progressão da carga lesional em T1 nos pacientes SP em uso de interferon-beta, o que sugere uma menor perda progressiva de axônios, e, portanto, um efeito protetor desta medicação. Em outro estudo, de Stone *et al.* (1995), demonstrou-se um efeito significativo do interferon-beta como agente protetor do desenvolvimento de novas lesões com realce pelo gadolínio. Estudos do mecanismo de ação desta medicação indicam que há redução na expressão de HLA classe II. Admite-se também que possa existir uma depressão da ativação de células T periféricas, modificações em moléculas de adesão e células endoteliais. Desse modo, estes efeitos do interferon-beta sobre a barreira hematoencefálica, indicam que os mecanismos de ação desta droga envolvem eventos muito precoces no desenvolvimento das lesões.

O LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO NA ESCLEROSE MÚLTIPLA

O exame do LCR define a natureza inflamatória e imunológica das lesões do SNC, por meio de estudo quantitativo e qualitativo da resposta imunológica intratecal. Os testes para o diagnóstico liquórico da EM foram divididos em essenciais, complementares e opcionais (Andersson, 1994).

O exame citológico é considerado um teste complementar no diagnóstico de EM, e 50% dos casos apresentam celularidade normal (menos de 4 células/mm³), 49% entre 4-35 células por mm³, e 1% acima de 35 células (Andersson, 1994).

As proteínas totais estão aumentadas no LCR em 40% dos casos de EM, geralmente abaixo de 70 mg/dl.

A barreira hematoencefálica (BHE) pode ser avaliada pela quantificação de proteínas totais do LCR, da concentração absoluta de albumina no LCR ou pelo quociente de albumina. A albumina é a principal proteína do LCR, sintetizada nos hepatócitos e transferida através da barreira, não sendo metabolizada no SNC. Na EM, a BHE é afetada em 12 a 20% dos pacientes, quando avaliada pelo quociente de albumina. A disfunção da barreira é mais freqüente na forma progressiva primária (McLean, 1993; Maciel, 2002). Entretanto, em algumas séries (Rovaris *et al.*, 1996) a ocorrência de realce pelo agente paramagnético (que representa disfunção/aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica), ocorre em até 70% dos pacientes estudados (sendo freqüente mesmo nos pacientes RR em fase de remissão de 60%). Na realidade, estima-se que novas lesões, com realce, sejam 5 a 10 vezes mais freqüentes que surtos clínicos. As células endoteliais são os principais constituintes da BHE e modificações morfológicas e bioquímicas destas células podem levar a um aumento da permeabilidade da barreira. Durante a ocorrência de inflamações no SNC, a liberação de citocinas como fator de necrose tumoral alfa, interferon gama e interleucina 1 beta podem levar à ativação de células endoteliais e aumento da síntese de moléculas de adesão, que facilitam o contato celular com células sanguíneas circulantes e permitem a entrada de linfócitos ativados no SNC. Moléculas de adesão podem ser liberadas da membrana de células endoteliais com estimulação por citocinas. Foi proposto que os níveis de proteínas (e também de moléculas de adesão) no líquor

produzidos por lesões cerebrais depende da distância das lesões aos ventrículos ou cisternas da base, já que a difusão restrita é a via de transporte predominante para o transporte de proteínas do espaço extracelular para o sistema liquórico. Além disso, admite-se que lesões medulares (que histopatologicamente apresentam menores graus de inflamação perivascular que lesões hemisféricas ou no tronco) contribuam pouco para as alterações liquóricas observadas no curso da doença (Rieckmann *et al.*, 1997)

A concentração no LCR de uma proteína derivada do plasma depende da concentração no plasma da proteína, da integridade da BHE, velocidade do fluxo liquórico, peso molecular, raio hidrodinâmico da proteína, idade do paciente e volume de líquido retirado (Andersson, 1994).

A quantificação da resposta imune humoral do SNC pode ser feita pela concentração absoluta de imunoglobulinas no LCR (fração gama da eletroforese), concentração absoluta de IgG no LCR, e pelo índice de IgG ($\text{IgG LCR/IgG soro} - \text{albumina LCR/albumina soro}$) (Andersson, 1994). A passagem de IgG e albumina para o espaço intratecal em situações de disfunção da barreira não é linear, pois a IgG passa com maior facilidade a barreira. Devem ser utilizados gráficos que expressam relações não lineares entre o quociente de albumina e o quociente de IgG. Os resultados podem ser representados no gráfico logarítmico em 4 áreas distintas: (1) normal; (2) síntese local; (3) síntese local e passagem passiva por disfunção da barreira; (4) passagem passiva através do soro (transudato). Dessa forma, é possível definir se a concentração liquórica depende de imunoprodução local ou da transferência do soro por disfunção da barreira (Gráfico de Felgenhauer & Reiber, 1987) [Figura 1].

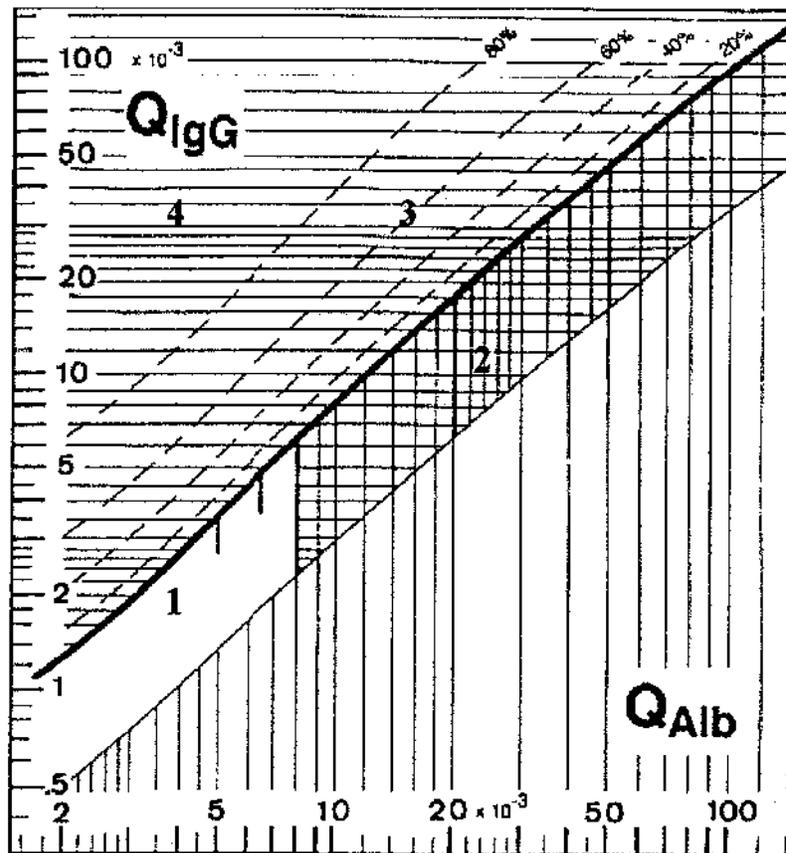


Figura 1- Representação gráfica do índice de IgG (Felgenhauer & Reiber, 1992).

As bandas oligoclonais de IgG na EM são bandas encontradas exclusivamente no LCR, estando presentes em até 95% dos casos quando identificadas por focalização isoeétrica (Andersson, 1994). Os casos com a presença de bandas oligoclonais podem ser divididos em dois grupos: um com bandas exclusivamente no LCR e outro com bandas idênticas no LCR e soro, porém com bandas adicionais no LCR (Thompson, 1995). A focalização isoeétrica é o método mais sensível para a detecção de bandas oligoclonais usando amostras em paralelo de LCR e soro com a mesma concentração de IgG, coletadas simultaneamente (Stautgaitis, 1985; Luxton, 1990). O método consiste em submeter as amostras à eletroforese na qual o gel apresenta um gradiente de pH, separando os diferentes subtipos de IgG, com base nos seus pontos isoeletricos. A visualização de bandas pode ser feita por vários métodos, sendo a coloração pela prata e detecção imunológica os mais sensíveis.

A presença de bandas oligoclonais indica que a resposta imune está sendo direcionada contra um grupo restrito de antígenos mielínicos. As bandas oligoclonais não são específicas da EM, ocorrendo também em outras doenças inflamatórias do SNC e doenças sistêmicas com repercussão liquórica. Para diferenciação entre a imunoprodução local e sistêmica de IgG é necessário o exame do LCR e soro em paralelo. Este exame pode apresentar 5 padrões: policlonal no líquido e soro (normal); monoclonal no LCR e soro (paraproteinemias); oligoclonal no LCR (EM); oligoclonal no LCR e soro com bandas diferentes (EM e sarcoidose); oligoclonal com bandas idênticas no LCR e soro (Guillain-Barré) (Thompson, 1995).

A frequência das bandas oligoclonais é influenciada pela administração de medicação. Após a administração de metilprednisolona em altas doses, o desaparecimento de bandas no líquido pode ocorrer. Casos tratados com metilprednisolona no primeiro surto podem negar uma segunda pesquisa confirmatória, mesmo com técnicas mais sensíveis (Frequin, 1992).

O estudo sistemático do LCR é essencial para o diagnóstico da EM e para excluir ou confirmar diagnóstico de outras doenças com quadro semelhante.

Kappos (1988) encontrou uma correlação significativa entre valor absoluto de IgG, índice de IgG, e número de bandas oligoclonais com volume de lesões periventriculares, mas não com o volume total de lesão na RM de encéfalo. A íntima relação entre as lesões periventriculares e o espaço liquórico pode explicar esta correlação.

Barkhof (1992) comparou o número de lesões com atividade inflamatória (com realce pelo gadolínio) e os parâmetros liquóricos antes e após 20 ciclos de metilprednisolona e encontrou uma correlação entre o número de lesões ativas e os níveis de proteína básica de mielina no LCR, sugerindo que a inflamação e aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica estão associadas com a desmielinização. É também bastante relevante observar que pela RM podem ser caracterizados casos de atividade inflamatória subclínica na EM, já que lesões novas ou com realce pelo gadolínio ocorrem com uma frequência de 5 a 10 vezes maior do que o surto com repercussões clínicas.

Wang (2002) relatou correlação significativa entre o grau de pleocitose e o número de lesões ativas na RM, e entre o índice de IgG e o volume de lesão em T2.

Assim, as relações entre os diferentes parâmetros líquóricos e a quantificação de lesões à RM de encéfalo indicam que estas variáveis refletem a atividade biológica da EM.

No estudo de Capra *et al.*, (1992) não houve correlação entre os níveis séricos de IL-2 e a presença de ou ausência de lesões com realce pelo gadolínio, num estudo com 10 pacientes, com a forma surto-remissão, que foram examinados a cada duas semanas, por três meses.

Rieckmann *et al.* (1997) descreveram correlação entre o nível de TNF-alfa no sangue periférico e com surtos clínicos e atividade inflamatória em 29 pacientes com EM, forma surto remissão.

Hartung *et al.* (1995) relataram que receptores solúveis do TNF e algumas moléculas de adesão de linfócitos T estão elevados em pacientes com a forma progressiva secundária e em pacientes com a forma remitente-recorrente com atividade clínica da doença, e com a presença de lesões com realce pelo gadolínio.

A ERM ^1H é um método não invasivo muito promissor do estudo da bioquímica cerebral.

Baseia-se no princípio de que a frequência de ressonância do núcleo de cada átomo submetido a um campo magnético estático é alterada de maneira perceptível pela interação dos prótons com os elétrons circundantes, no nível atômico (gerando o efeito chamado deslocamento químico) e pela interação do núcleo do átomo com outros prótons de hidrogênio, no nível molecular (gerando o efeito chamado acoplamento nuclear) [Spisni, 1992].

Assim, são obtidas informações sobre a estrutura química da molécula e de sua interação com o meio. A obtenção do sinal é feita de maneira semelhante à obtenção de imagens por RM. A resposta ao pulso de rádio-freqüência, porém, ao invés de um ponto no

espaço, é dada em um valor de frequência num espectro que traz informações sobre a composição química da amostra em questão.

O hidrogênio tem, *in vivo*, o núcleo mais sensível ou, tecnicamente, o que produz melhor sinal-ruído. Além disso, o fato de ser o mais abundante na maioria dos sistemas vivos contribui para que os estudos da bioquímica do SNC tivessem-no como base. Porém, muitas das dificuldades na individualização de sinais químicos decorrem do fato de que os metabólitos estudados pela ERM ^1H produzem sinal numa faixa espectral muito curta, levando à sobreposição dos picos de muitas das substâncias de interesse. Somado a isso, o fato ser realizada em campos magnéticos relativamente baixos na prática clínica (por volta de 1,5 a 2 T, ou aproximadamente 90 MHz) leva a ERM ^1H *in vivo* à menor definição do espectro (picos mais largos e irregularidade da linha de base), quando comparada a ERM ^1H *in vitro* (Gadian, 1995a; Faria AV, 2004).

A ERM ^1H realizada em altos campos magnéticos (como por volta de 11,7 tesla, ou 500 MHz), é capaz de refinar tanto a posição da substância dentro do espectro como precisar a amplitude de seu sinal. Fornece informações mais precisas que a ERM ^1H *in vivo* melhorando a resolução de picos clinicamente indistinguíveis da linha de base e evitando a sobreposição de sinais (Figura 2).

Os metabólitos clinicamente significativos mais estudados atualmente são o *N*-acetil aspartato (NAA), a colina, a creatina, o lactato e os lipídeos, que são aqueles detectados, *in vivo*, na faixa de tempos de eco (TE) entre 136 e 270 ms. Porém, podem ser empregados TEs tão baixos quanto 20 ms, permitindo a melhor resolução de alguns outros compostos como o mioinositol, o glutamato, a glutamina e a glicina (Castillo *et al.*, 1996). A importância das alterações dos níveis de cada uma destas substâncias pode ser compreendida através do conhecimento de seu papel no metabolismo cerebral.

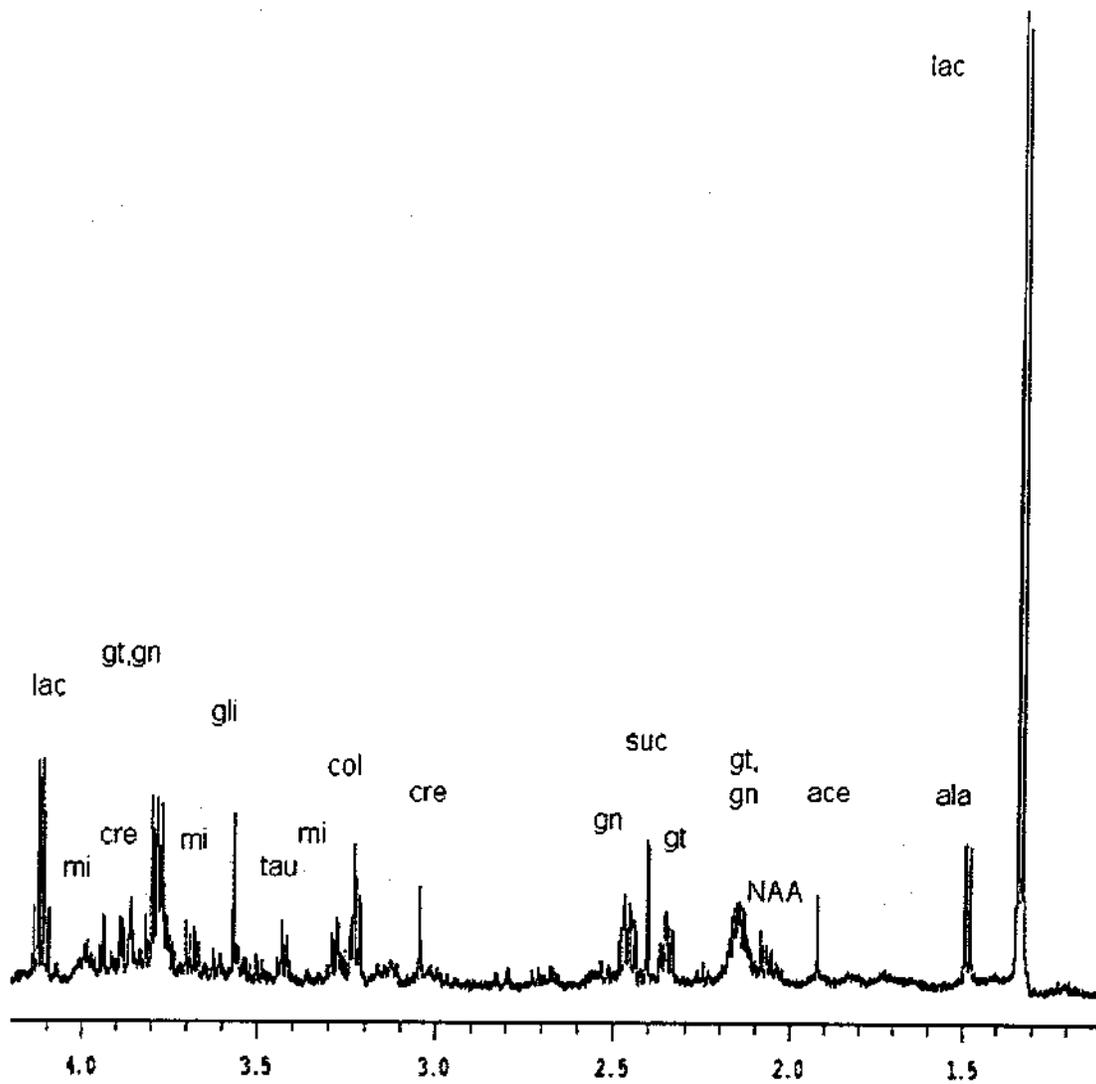


Figura 2- Padrão espectral típico de uma amostra *in vitro* (11,7T). Estão identificados os picos de mioinositol (mi), glicina (gli), colina (col), creatina (cre), glutamina (gn), glutamato (gt), *N*-acetil aspartato (NAA), taurina (tau), succinato (suc), acetato (ace), alanina (ala) e lactato (lac).

Uma característica particularmente interessante do metabolismo cerebral normal é a estreita ligação entre a atividade neuronal e o consumo de energia. Este fato é a base das técnicas funcionais de imagem cerebral como a tomografia por emissão de pósitrons (PET) e a RM funcional. Assim como essas técnicas, a análise da ERM ^1H dá

informações sobre o equilíbrio entre o consumo da glicose e oxigênio e a atividade celular e também sobre produtos intermediários e finais de cadeias como a glicólise, o ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa, o metabolismo de lipídeos e o anabolismo e catabolismo de aminoácidos (Leach *et al.*, 1992).

Assim como nos demais tecidos, a especialização de tipos celulares no cérebro é evidente. Os neurônios variam consideravelmente na estrutura e função. As células da glia e seus subgrupos, os astrócitos (células de suporte onde ocorrem inúmeras reações metabólicas para manutenção do balanço energético e movimento de fluidos), os oligodendrócitos (responsáveis pela produção e manutenção da mielina), a glia subependimária (que forma o epitélio de cobertura ventricular, o epêndima) e a micróglia (que funciona como macrófagos fixos do SNC), além de inúmeras outras variações pela própria localização de um mesmo tipo celular, provam a existência de células especializadas com funções que exigem a predominância de algumas reações metabólicas (Faria AV, 2004).

Lactato

A taxa de utilização basal de glicose é maior nos astrócitos que nos neurônios (Maistretti *et al.*, 2003) o que revela uma significativa contribuição dos astrócitos no metabolismo basal da glicose. Durante a ativação neuronal, o glutamato, principal neurotransmissor excitatório, é captado do meio extracelular pelos astrócitos (especializados em recaptação de neurotransmissores) e co-transportado com o Na⁺, estimulando a bomba Na⁺/K⁺ e, deste modo, a glicólise. O principal produto desse processo, o lactato, assim como outro componente da glicólise, o piruvato, é usado como substrato para a produção de energia no cérebro (Schurr *et al.*, 1999; Faria, 2004).

O pico do lactato na ERM ¹H consiste num dubleto (dois picos distintos devido às interações magnéticas entre prótons adjacentes na mesma molécula, já descritas como acoplamento nuclear) em 1,32 ppm. É muitas vezes necessário diferenciar o lactato de macromoléculas/lipídeos que, em TE curto, podem ser expressos juntamente com o lactato.

É possível confirmá-lo como procedente do lactato alterando-se o TE: em 272 ms projeta-se acima da linha de base enquanto que em 136 ms, aparece abaixo da linha de base. Um segundo pico ocorre em 4.1 ppm, podendo estar muito próximo ao pico suprimido da água, e subexpresso na ERM ^1H *in vivo*. Normalmente, o pico de lactato no cérebro normal é baixo ou não se distingue da linha de base: equivalente a 0,5 a 1 mM/L, dependendo do estágio de ativação do tecido cerebral normal (Merboldt, 1992), (Faria AV, 2004).

O aumento do pico de lactato geralmente indica uma “falência” do mecanismo normal de respiração oxidativa e ativação do catabolismo de carboidratos (Sanders, 1995). É um dos metabólitos mais freqüentes nos tumores e considerado muitas vezes marcador de agressividade tumoral, um reflexo de seu metabolismo neoplásico de aumento da glicólise (Small *et al.*, 1989). Porém, a presença de lactato é inespecífica (Cendes, 2000), ocorrendo também em tumores de baixa agressividade (Sutton *et al.*, 1992; Ott *et al.*, 1993; Poptani *et al.*, 1995) e em lesões de etiologia não neoplásica (Demaerel *et al.*, 1991). Por exemplo, na EM, pode haver aumento dos níveis de lactato nas placas agudas, que pode ser decorrente de anaerobiose e inibição da fosforilação oxidativa pela hipóxia. Há ainda a possibilidade de que este metabólito possa ser produzido por metabolismo glicolítico anaeróbico por leucócitos ativados, mesmo em condições de níveis normais de oxigênio. Os macrófagos são altamente dependentes de mecanismos anaeróbios de produção de energia. O aumento do número de macrófagos, que são observados nas placas agudas, poderia ser a principal fonte de lactato detectado pela espectroscopia (Arnold, 1992). O aumento dos níveis de lactato pode levar a aumento dos níveis de alanina, que pode se tornar visível no espectro.

Glutamina e glutamato

Este mesmo processo (glicólise) fornece a energia necessária para a transformação de glutamato (neurotransmissor excitatório), de importante função no metabolismo mitocondrial (Van Der Knaap *et al.*, 1994), em glutamina, evitando que o excesso de glutamato se transforme em amônia (tóxica) e fornecendo a substância

(glutamina) que pode ser captada pelo neurônio pré-sináptico para a nova produção de glutamato, fechando assim o ciclo (Maistretti, 2003). O ácido gama amino butírico (GABA) é um importante produto da descarboxilação do glutamato. O glutamato é o mais abundante neurotransmissor excitatório do cérebro humano, enquanto o GABA é o mais importante neurotransmissor inibitório. A glutamina é encontrada primariamente em astrócitos. O aumento dos níveis de amônia estimula a síntese de glutamina, ativando a glutamina sintetase, inibindo a recaptção do glutamato pelos astrócitos. Nas situações de aumento dos níveis de amônia, os níveis de glutamato diminuem e de glutamina aumentam. Os aumentos dos níveis de glutamato podem ser observados em situações de dano tissular, como nas injúrias com mecanismos hipóxico-isquêmicos. Além disso, o glutamato pode ser componente do ciclo de Krebs via alfa-ceto-glutarato. A glutamina pode também ser considerada um marcador glial.

As concentrações de glutamato são de 8,1mM/Kg na substância branca, 12,5 mM/Kg na cinzenta e 9,5 mM/Kg no cerebelo (Michaelis *et al.*, 1993). As concentrações *in vitro* variam de 6 a 10,2 mM/Kg (Petroff *et al.*, 1993), provavelmente em decorrência da pequena queda dos níveis que ocorre imediatamente após a isquemia, durante a coleta do tecido (Perry *et al.*, 1981). A glutamina ocorre em pequenas quantidades, chegando no máximo a representar 20% da quantidade de glutamato no córtex. Estes dois metabólitos estão sobrepostos, em aparelhos com campos de 1,5 e 2,0 T, e representados por um pico único, *in vivo*, entre 2,1 e 2,5 ppm. Alguns autores (Kreiss, 1992), distinguiram estes dois metabólitos, em campos de 4,0 T ou maiores. *In vitro*, os picos de glutamina e glutamato aparecem como multipletos em 2,08; 2,09; 2,14; 2,36; 2,41 ppm e, ainda, a glutamina aparece como um tripleto em 3,7 ppm.

***N*-acetil aspartato**

O NAA é marcador neuronal (Serles *et al.*, 2001), já que é localizado quase que exclusivamente em neurônios. É também encontrado em culturas de células progenitoras de oligodendróglia, porém está ausente em células gliais maduras, LCR e sangue. Algumas células não-neuronais, como mastócitos, apresentam este metabólito. A quebra do *N*-acetil

aspartil glutamato na mitocôndria dos neurônios dá origem ao NAA e ao glutamato e a quebra subsequente do NAA dá origem ao aspartato, outro aminoácido excitatório. Apesar de sua síntese neuronal, o catabolismo do NAA ocorre nos astrócitos, já indicando que esta substância possa desempenhar importante papel no equilíbrio inter-compartmental (Baslow, 2003) [Figura 3]. Suas funções biológicas ainda não são totalmente conhecidas. Sugere-se, porém, que seja doador de grupos acetil para a síntese lipídica, particularmente durante o período de desenvolvimento da mielinização (Danamo *et al.*, 1968), que tenha papel na síntese de neuropeptídeos (Reichelt & Kvamme, 1973) ou ainda que sirva como ânion orgânico nos neurônios (Macintosh & Cooper, 1965).

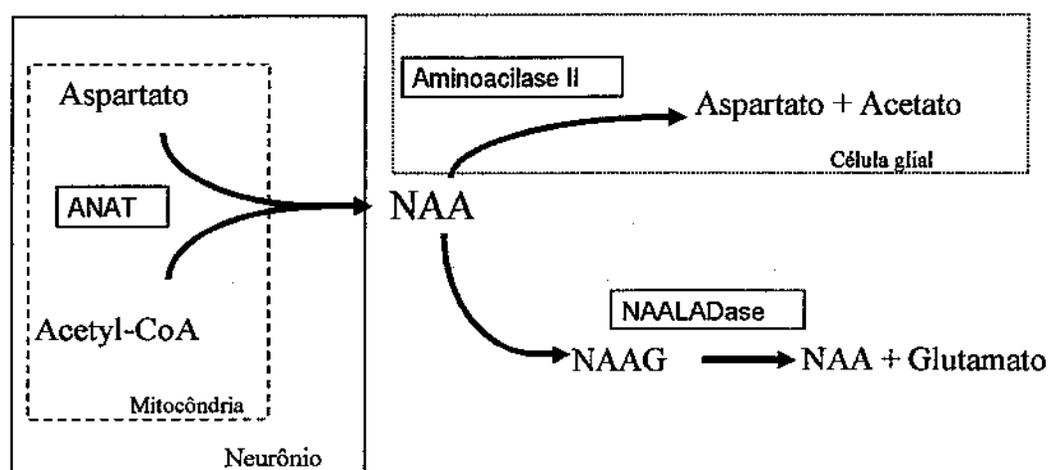


Figura 3- Modelo esquemático do metabolismo inter-compartmental do NAA. ANAT: aspartato *N*-acetiltransferase, NAAG: *N*-acetil-aspartil-glutamato, NAALADase: dipeptidase ácida α -ligada *N*-acetilada.

Sua presença na ERM ^1H é atribuída aos grupos *N*-acetil que ressonam em 2,0 ppm. Ocorre em concentrações 2 a 3 vezes maiores que as do aspartato e distintas dos seus níveis séricos, graças à permeabilidade específica da barreira hematoencefálica. Nas lesões agudas de EM, pode ser observada redução dos níveis do NAA. Uma recuperação parcial dos níveis de NAA pode ser observada após alguns meses da lesão aguda, o que reflete recuperação da integridade axonal e também contração tissular após resolução do

edema. Uma redução dos níveis de NAA, que denota perda/disfunção axonal, também costuma ser observada nas placas crônicas da EM (Matthews *et al.*, 1991). *In vivo*, sua concentração está por volta de 11,4 mM/Kg, com pouca variabilidade regional (Michaelis *et al.*, 1993). No líquor, *in vitro*, o NAA não é detectado devido à hidrólise.

Assim como na EM, em outras situações, eventualmente, a diminuição de NAA é transitória, pois seus níveis podem voltar a aumentar, como por exemplo, após cirurgias para epilepsia de difícil controle clínico (Serles *et al.*, 2001) ou após radioterapia, pela consolidação de neurônios que sobreviveram e pelo fato de que suas mitocôndrias regeneram NAA. Porém está ausente em cicatrizes tanto da radioterapia como de outros tipos de lesão gliomatosa (Davidson *et al.*, 2000), (Faria AV, 2004).

Alanina

A alanina é um metabólito não essencial de função biológica incerta. Seu pico ocorre entre 1,3 e 1,4 ppm e muitas vezes é obscurecido pela sobreposição ao do lactato. As concentrações *in vitro* são discretamente maiores que *in vivo* (0,3-0,8 mM/Kg) (Peeling & Sutherland, 1989). Como anteriormente exposto, aumento dos níveis de lactato pode levar, secundariamente, a aumento dos níveis de alanina.

Glicina

A glicina é um aminoácido neurotransmissor excitatório. É detectada pela ERM ^1H *in vivo* com o uso de baixos TEs, em concentrações de aproximadamente 1 mM/Kg. Há discreta queda dos níveis de glicina nos primeiros segundos após a ressecção tecidual (Perry *et al.*, 1981).

Seu pico é muito próximo ao de mioinositol, ressonando em 3,56 ppm. Assim, a discriminação entre estes dois picos é problemática e a maioria dos autores considera, nos estudos clínicos, um pico conjunto. Aumento da glicina é detectado em diferentes distúrbios cerebrais como na vigência de hiperglicemia (Gyngell *et al.*, 1991), infarto

cerebral, meningoencefalite, coréia de Huntington, migrânea, Parkinson e doença de Alzheimer, possivelmente refletindo lesão excitatória (Sener, 2003).

A oligodendróglia é o tipo celular mais rico em glicina, o que pode contribuir para seu aumento nos tumores desta origem celular (Urenjak *et al.*, 1993). Aumento da glicina foi relatado ainda em extratos de gliomas, variando com a malignidade tumoral (Gutowski *et al.*, 1999).

Taurina

Outro aminoácido com significado clínico, a taurina apresenta concentração por volta de 1,2 a 1,5 mM/Kg *in vitro* e produz um pequeno sinal *in vivo* por ter grupos metila ligados ao nitrogênio e ao enxofre (Michaelis *et al.*, 1993). Está envolvida com a neurotransmissão, osmorregulação e crescimento cerebral. Está relacionada também com a homeostase do magnésio e do cálcio.

Creatina

A quantidade de ATP no citoplasma depende do equilíbrio químico da reação PCr (fosfocreatina) + ADP + H = ATP + Cr (creatina). É uma reserva para fosfatos de alta energia e um tampão de ADP e ATP. Assim, os níveis de creatina somados aos de fosfocreatina costumam ser relativamente constantes (Henriksen *et al.*, 1992). A creatina e a fosfocreatina são compostos envolvidos na regulação do metabolismo energético celular. É, porém, indicativa do balanço energético por refletir o funcionamento das mitocôndrias neuronais e gliais (onde é sintetizada) e o suprimento energético de neurônios e oligodendrócitos, responsáveis pelo seu transporte ativo. Nas medidas detectadas pela ERM ¹H, o pico combinado de creatina e fosfocreatina está em 3.03 ppm e tem ainda contribuições, em menor escala, do ácido alfa amino butírico, lisina e glutatona. Um segundo pico é visto em 3,94 ppm. Exibe uma heterogeneidade de concentrações regionais que vai de 6,1 mM/Kg na substância branca a 8,2 mM/Kg na substância cinzenta e 9,1 mM/Kg no cerebelo (Michaelis *et al.*, 1993).

A creatina e fosfocreatina embora sejam considerados compostos relativamente estáveis, podem sofrer variações de concentrações em algumas situações como infartos, tumores, trauma crânio encefálico e em placas desmielinizantes. A concentração da creatina em células gliais é relativamente elevada, e, conseqüentemente, aumento da creatina pode ser observado em situações de gliose. A creatina é somente observada no nível intracelular e a creatina também pode ser utilizada como marcador da densidade celular.

Colina

A mielina é uma estrutura rica em lipídeos, com predomínio de colesterol, esfingolipídeos e fosfoglicerolipídeos (fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina). A fosfatidilcolina, juntamente com a fosfocolina, a glicerofosfocolina e a própria colina (precursora da acetilcolina) formam o pico de colina na ERM¹H em 3,2 ppm. Alterações nos níveis de colina estão ligadas a alterações bioquímicas das membranas. A colina é um produto da degradação da mielina. Suas concentrações relativas, *in vivo*, são de 1,4 mM/Kg na substância cinzenta, 1,8 mM/Kg na substância branca, 2,5 mM/Kg no cerebelo e 2,9 mM/Kg na ponte. Processos que levam a aumento da colina incluem desmielinização ativa (Davie, 1993), resultando da degradação de fosfolipídeos da mielina à glicerofosfocolina, ou até mesmo pelo aumento de células gliais (Gill, 1989). A redução da colina pode ser observada na encefalopatia hepática. Além disso, elevação da colina é um achado observado em muitos tipos de neoplasias, incluindo tumores de alto grau. A baixa concentração da colina no líquor (1,5 a 3,5 µM/L por ensaio enzimático) está abaixo do limite de detectável pela técnica (100 µM/L). A colina também é um regulador da osmolaridade e alteração dos seus níveis pode refletir alterações para compensar modificações osmóticas.

Lipídeos

A maior quantidade de ácidos graxos associados ao complexo lipídico são os ácidos oléicos mono-insaturados, cujo metabolismo decorrerá em ácido aracdônico. Os lipídeos têm um tempo de relaxação muito baixo e no tecido normal são dificilmente

visualizados *in vivo*, a não ser que sejam usados TEs muito baixos, situação, porém, em que pode haver sobreposição a sinais de proteínas citossólicas (macromoléculas) (Negendank *et al.*, 1996).

Produzem picos em 0,8, 1,2, 1,5 e 6 ppm, que contém prótons de grupos metil, metileno, alílico e vinil dos ácidos graxos insaturados. Na ERM¹H, *in vivo*, geralmente surgem quando há contaminação da amostra com o tecido subcutâneo. Nos casos patológicos, de maneira geral, refletem processos necróticos e degradação de membrana celular (Zoula *et al.*, 2003). Estão presentes nas placas agudas da EM, e também em neoplasias de alta agressividade, como nas metástases e linfomas (Jayasundar *et al.*, 1995).

Mioinositol

É um pico composto, que contém mioinositol, monofosfato de inositol, fosfatidil inositol e difosfato de inositol. O inositol difosfato funciona como segundo e terceiro mensageiros para vários hormônios. Difosfato de inositol está envolvido na regulação dos níveis de cálcio no retículo endoplasmático e na mitocôndria. O pico de mioinositol ocorre em 3,56 ppm e sobrepõe-se ao pico de glicina dependendo do TE utilizado na ERM¹H *in vivo*. Suas concentrações variam de 4,7 mM/kg na substância branca a 6,8 mM/Kg no cerebelo, *in vivo* e 5,8 a 7 mM/Kg, *in vitro*.

Sua concentração pode estar alterada em tumores malignos pela destruição celular e pela ativação da via sinalizadora pela rápida divisão celular (Rutkowski *et al.*, 2003). Além disso, o mioinositol é um importante marcador de células gliais.

O inositol é importante porque está relacionado ao conteúdo intracelular de sódio e à ativação glial. Os aumentos nos níveis de mioinositol tem sido associados com aumentos na osmolaridade do cérebro. No cérebro, o mioinositol está primariamente localizado em células gliais e ausente nos neurônios. Elevações no mioinositol podem ser atribuídas à gliose e à astrogliose reativas.

Além disso, assim como a colina, o mioinositol pode ser considerado um marcador da quebra da mielina, já que tem sido visto em concentrações elevadas em placas de EM, infecção pelo HIV e na leucodistrofia metacromática, entretanto, estas são evidências indiretas desta associação.

OUTROS COMPOSTOS MENOS COMUMENTE DETECTADOS

Alguns destes compostos podem estar presentes em circunstâncias normais, mas, por terem baixos pesos moleculares e/ou superposição aos picos de outras substâncias, pode ser difícil distingui-los na RM *in vivo*. Alguns exemplos destes compostos incluem: scyllo-inositol, betaina, etanolamina, nucleotídeos, glicose, glicogênio, ácido gama-amino-butírico, glutatona, beta-hidroxi-butarato, acetona, fenilalanina, galactitol, ribitol, arabitol.

ERM ^1H no líquido

A composição química de amostras do líquido reflete, indiretamente, os processos bioquímicos que ocorrem no parênquima cerebral. Assim, a espectroscopia de amostras de líquido pode informar detalhes adicionais sobre o metabolismo cerebral normal e patológico. A espectroscopia de prótons do líquido permite detecção simultânea e quantificação de metabólitos importantes envolvidos no metabolismo oxidativo (lactato, piruvato, citrato) e intermediário (glutamina, alanina, valina, leucina e aminoácidos aromáticos). Muitos destes aminoácidos estão envolvidos com neurotransmissão. Além disso, a espectroscopia também permite a detecção de moléculas não esperadas e até mesmo desconhecidas (Nicoli *et al.*, 1993).

A espectroscopia de alta resolução vem sendo empregada de modo crescente para investigar a complexa composição de fluidos corporais, devido à capacidade da técnica em quantificar uma variedade de metabólitos de modo simultâneo, sem conhecimento prévio a respeito de metabólitos que possam estar associados com

determinada patologia. O uso de técnicas de análise multivariada, como a análise de componentes principais (PCA), é uma ferramenta estatística para discriminação entre os espectros de diferentes classes, associados a distúrbios de metabólitos específicos (Dunne *et al.*, 2005).

Qureshi & Baig (1988) demonstraram que há diferenças significativas entre muitos metabólitos comparando a concentração de aminoácidos no líquido de pacientes com EM em relação aos controles. A maioria destes compostos está presente em quantidade muito pequena para ser quantificada pela espectroscopia de prótons, com exceção da glutamina, que costuma mostrar elevação em pacientes com EM.

Muitos pesquisadores (Arnold *et al.*, 1992; Matthews *et al.* 1991; Simone *et al.*, 1996) têm observado uma redução do NAA nas placas de EM. Este composto serve como doador do grupo acetil na síntese de lipídeos no cérebro, participando, desta forma, do processo de mielinização. NAA não foi detectado no líquido de pacientes controle e nem de pacientes com EM. A colina também não foi detectada nos estudos *in vitro* de espectroscopia do líquido, nem nos pacientes com EM e nem nos controles.

Níveis elevados de N-metilaminas e formaldeído foram observados no líquido de pacientes com EM, corroborando a hipótese de que existe uma anormalidade no ciclo colina-glicina nestes pacientes (Lynch *et al.*, 1993). Na conversão de colina à glicina, formam-se intermediários metilados, com liberação de formaldeído. Sugere-se que os grupamentos metil sejam utilizados na síntese de fosfolípidos, um dos principais componentes da mielina. Um bloqueio desta via pode resultar em acúmulo de intermediários N-metil, interferir na síntese de mielina, e reduzir a liberação de formaldeído. A detecção de um metabólito N-metil no líquido de pacientes com EM, no estudo de Lynch confirma esta hipótese.

2- OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o papel da ERM¹H na caracterização do padrão liquórico de pacientes com EM.

Os objetivos específicos foram:

- Caracterização do padrão de ERM¹H *in vitro* do líquido de pacientes com EM;
- Verificar se existe algum padrão entre dois subgrupos desta doença:
 - a). Pacientes que apresentam lesões com realce pelo agente de contraste paramagnético na RM, e, portanto, atividade inflamatória em curso;
 - b). Pacientes que não apresentam lesões com realce pelo agente de contraste paramagnético;
- Caracterizar a existência de substâncias (ou da relação entre elas) na ERM¹H *in vitro* e correlacionar com alterações em vias metabólicas que possam estar envolvidas na fisiopatologia da EM.

3- CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1- Aspectos éticos

Todos os indivíduos participantes desse estudo foram devidamente esclarecidos quanto às finalidades da pesquisa, através de formulário de consentimento informado. O formulário, assim como o presente estudo, foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Este estudo não envolveu riscos biológicos para os participantes.

3.2- Identificação do grupo de estudo

Foram selecionados pacientes admitidos no Hospital das Clínicas da UNICAMP com diagnóstico de EM clinicamente definida de acordo com os critérios de POSER.

Dados clínicos como sexo, idade do primeiro surto, duração da doença, índice de IgG, presença de bandas oligoclonais, forma clínica e presença de lesões captantes de contraste paramagnético (gadolínio) foram consideradas. Quinze pacientes eram do sexo feminino (62,5%) e 9 do sexo masculino (37,5%). A idade média de início da doença foi de 30,3 anos (variando de 16 a 40 anos). A duração média da doença foi de 6,2 anos (variando de 1 a 15 anos). O índice médio de IgG foi de 0,94 (variando de 0,4 a 1,49). A forma clínica predominante foi a remitente-recorrente (20 pacientes, 83,3%), sendo a progressiva secundária observada em 3 pacientes (12,5%) e a progressiva primária em 1 paciente (4,2%). Lesões captantes de gadolínio (pelo menos uma) foram observadas em 14 pacientes (58,3%). Destes, 10 apresentavam apenas uma lesão captante, 1 apresentava 2 lesões captantes e 3 apresentavam 3 lesões captantes. Dos pacientes estudados, 10 (41,7%) não apresentam lesões com realce pelo agente paramagnético. Todos os pacientes (100%) apresentaram bandas oligoclonais de IgG, que foram identificadas por focalização isoelétrica.

3.3- Estudo *in vitro*

Foram analisadas por ERM¹H de alto campo de 35 amostras de líquido (Figura 4a), sendo 24 provenientes de pacientes com EM (14 pacientes apresentavam lesões com realce e 10 pacientes não apresentavam lesões com realce). Onze pacientes com polineuropatia, cefaléia e síndromes meningorradiculares (além de um paciente que fora submetido à punção lombar para mielo-CT) foram utilizados como controle. Estes indivíduos tiveram seus prontuários revisados e exames de RM nos quais não havia lesões que pudessem ser compatíveis com substrato desmielinizante. Os indivíduos controles tinham faixas etárias semelhantes (média de idade) dos pacientes com EM. As amostras de LCR com acidente de punção foram excluídas do estudo. As características destes pacientes (EM e controles) são demonstradas na Tabela 1 (Anexo 1).



Figura 4a- Coleta de material para obtenção do espectro *in vitro*: 0,5 ml de líquido foi adicionado a 0,1 ml de 0,75 mM de TSP

O espectro foi adquirido em espectrômetro Varian INOVA-500 ($B_0 = 11,7 \text{ T}$), operando a 499,886 MHz para ^1H , usando sonda tripla de ressonância (H, C, N) de 5 mm (Figura 4b). O sinal residual da água foi suprimido usando pulso seletivo de excitação (pulso de 90 graus), seguido por gradiente de campo pulsado no eixo z (wet 1 d). As amostras de líquido (0,5 ml) foram adicionadas à 0,1 ml de 0,75 mM de TSP (referência externa utilizada para determinar o fator de escala beta). Esta referência externa contém uma concentração química conhecida e é colocada no aparelho de RM junto com o líquido. Assim, é obtida uma medida precisa da concentração dos metabólitos.

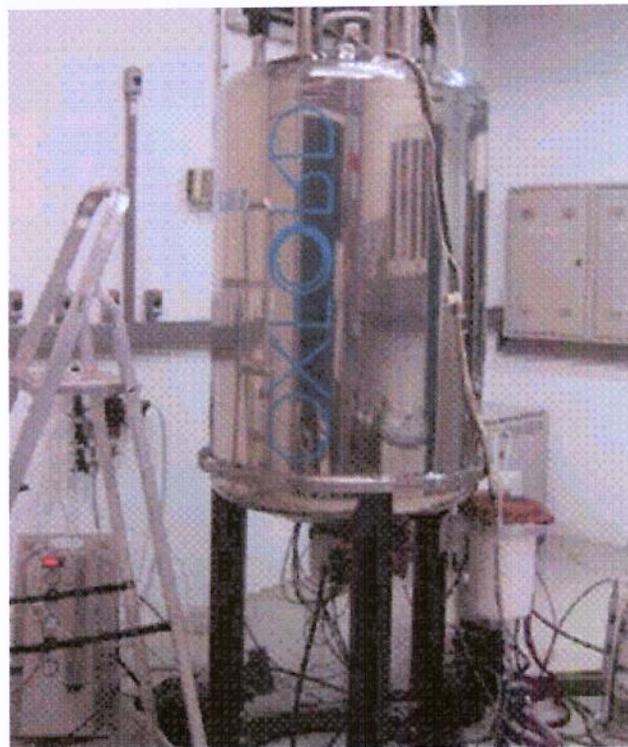


Figura 4b- Foi utilizado espectrômetro VARIAN INOVA-500 (11,7 T)

O espectro de RM original foi refinado por análise “Wavelet” (Johstone et al., 1997) seguido por correção da linha de base. O resultado foi armazenado em matriz de duas entradas (X), em que cada linha corresponde às amplitudes de sinal do espectro e cada coluna aos deslocamentos químicos em hertz.

A análise dos dados foi realizada através de análise discriminatória (Partial Least Square Discriminant Analysis- PLS-DA) (Indhal *et al.*, 1999), em que a matriz resposta (Y) de n linhas (correspondentes aos espectros da matriz X) e k colunas foi construída da seguinte maneira: na linha i de Y ($i=1, \dots, n$), 1 foi colocado na k -ésima coluna e 0 em todas as demais se o i -ésimo espectro de X pertence à classe K. Conseqüentemente, B é obtido ajustando-se $Y=XB$. Essa análise indica que frequências em B são importantes para discriminar as classes em Y.

Toda a análise computacional foi realizada no programa "R" (www.r-project.org) e pacote Wavetresh para "R" para realização de análise Wavelet.

A análise de agrupamentos hierárquicos é outro método importante de análise exploratória não supervisionado. O objetivo desta análise é encontrar agrupamentos e estruturas no conjunto de dados, agrupando amostras que tenham atributos semelhantes, daí o nome do método.

Visualizar as amostras utilizando variável por variável, ou duas a duas, não é uma maneira eficiente de extrair informações de dados multidimensionais. Neste contexto, HCA é um método interessante, porque representa graficamente os dados multidimensionais (JD) em um espaço bidimensional (2D). Os resultados aparecem na forma de uma árvore hierárquica, também conhecida como dendograma onde a similaridade entre os compostos é dada pelo comprimento dos ramos da árvore.

Há duas maneiras de agrupar os dados: aglomerativa e divisiva. HCA é uma técnica aglomerativa, pois assume *a priori* cada amostra individual como sendo um agrupamento. É natural admitir que amostras próximas entre si no espaço JD sejam semelhantes em relação às variáveis consideradas. Sendo assim, elas são sistematicamente agrupadas por ordem de proximidade (similaridade), resultando, no final, em um único agrupamento.

Para gerar um dendograma, as distâncias entre todas as amostras são calculadas. A distância entre as amostras a e b , d_{ab} , no espaço de dimensão J pode ser calculada por meio da distância Euclideana, onde x_{ij} é um elemento da matriz X, correspondente ao valor

numérico da j -ésima variável do i -ésimo composto. A seguir, as duas amostras que estão mais próximas são agrupadas, restando $(I-1)$ grupos. O processo se repete até que todas as amostras formem um único agrupamento.

Há várias maneiras descritas na literatura para se fazer o agrupamento das amostras. Por exemplo, utilizando a menor distância entre duas amostras de diferentes grupos (agrupando os dois vizinhos mais próximos) ou a menor distância entre os centróides de dois grupos diferentes. Estas distâncias são então transformadas numa matriz de similaridade S , cujos elementos são os índices de similaridade.

A análise de agrupamentos também pode ser feita para as variáveis, bastando neste caso analisar a matriz transposta dos dados, X^T . Esta análise pode ser muito útil pois permite visualizar, por meio de um dendograma no espaço 2D, os agrupamentos dos descritores, identificando aqueles que contêm informação semelhante, *i. e.*, aqueles que são altamente correlacionados (Figueiredo IM, 2006).

3.4- Estudo *in vivo*

O exame de RM 1H *in vivo* foi realizado nos pacientes estudados *in vitro*, com intervalo, em média, de até duas semanas após a coleta do LCR.

As imagens de RM foram obtidas em aparelho ELSCINT Prestige, em campo magnético de 2 T, com aquisições nos planos axial, sagital e coronal. Os parâmetros para as diferentes aquisições de imagem foram:

- Imagens sagitais pesadas em T1 spin echo (espessura de 6 mm, ângulo de inclinação de 180^0 , TR (tempo de relaxação, em ms)/TE (tempo de eco, em ms) = 550/10, matriz de 200x350, FOV de 25x25cm), utilizadas para orientar o plano de aquisição das demais imagens.
- Imagens axiais pesadas em T1 spin echo (TR/TE = 540 /12), T2 duplo echo, spin echo (TR/TE = 4800 /128-16), FLAIR (TR/TI (tempo de inversão, em ms)/TE = 10099 /2550 /90), ângulo de inclinação zero nos ouvidos internos, com demais especificações iguais às do item 1.

- A administração do contraste paramagnético (gadolinio – gadopentetato de dimeglumina) foi avaliada em cada exame e realizada de acordo com os critérios já determinados no nosso serviço. A dose habitual utilizada é de 0.1 ml/kg.

As aquisições pós-gadolinio foram obtidas 15 minutos após a administração venosa do mesmo. O exame de RM foi realizado com intervalo de até duas semanas da coleta do líquido.

Em se considerando a presença ou ausência de lesões com realce pelo agente de contraste paramagnético, os pacientes foram divididos em dois grupos.

4- RESULTADOS

No estudo *in vivo*, 14 pacientes do grupo EM (58,3%) apresentaram realce pelo agente de contraste paramagnético (gadolinio) e 10 pacientes não apresentaram lesões com realce (41,7%). Dos pacientes que apresentarem realce, 10 apresentam a forma remitente-recorrente; 3 a forma progressiva secundária e 1 a forma progressiva primária. A média de lesões por paciente foi de 1,5 (10 pacientes tinham uma lesão; 1 paciente teve duas lesões e 3 pacientes tinham três lesões). O tempo médio de duração da doença nos pacientes que apresentavam realce pelo gadolinio foi de 4 anos (com variação de 1 a 10 anos) e nos pacientes sem captação o tempo médio de duração da doença foi de 8,8 anos (variando de 3 a 15 anos). Todos os pacientes que não apresentavam lesões captantes apresentavam a forma remitente-recorrente da EM.

No nosso grupo de indivíduos com EM, 15 eram do sexo feminino (62,5%) e 9 (37,5%) do sexo masculino.

A idade média de início da doença nos pacientes foi de 30,3 anos, variando de 16 a 40 anos.

O índice médio de IgG foi de 0,94 (variando de 0,4 a 1,49). O índice médio de IgG nos pacientes com atividade inflamatória foi de 1,11 (variando de 0,4 a 1,49). O índice médio de IgG nos pacientes sem lesões captantes na RM foi de 0,7 (com variação de 0,5 a 1,1).

No estudo de ERM¹H *in vitro* encontramos aumentos nos níveis de acetoacetato (singleto em 2,23 ppm), beta-hidroxi-beta-metil-butirato (dubleto em 1,18 ppm) e glutamato/glutamina nos pacientes com EM (multipletos em 2,08; 2,09; 2,14; 2,36; 2,41 ppm e do tripleto em 3,70 ppm, referente à glutamina) [Figuras 6, 7 e 8].

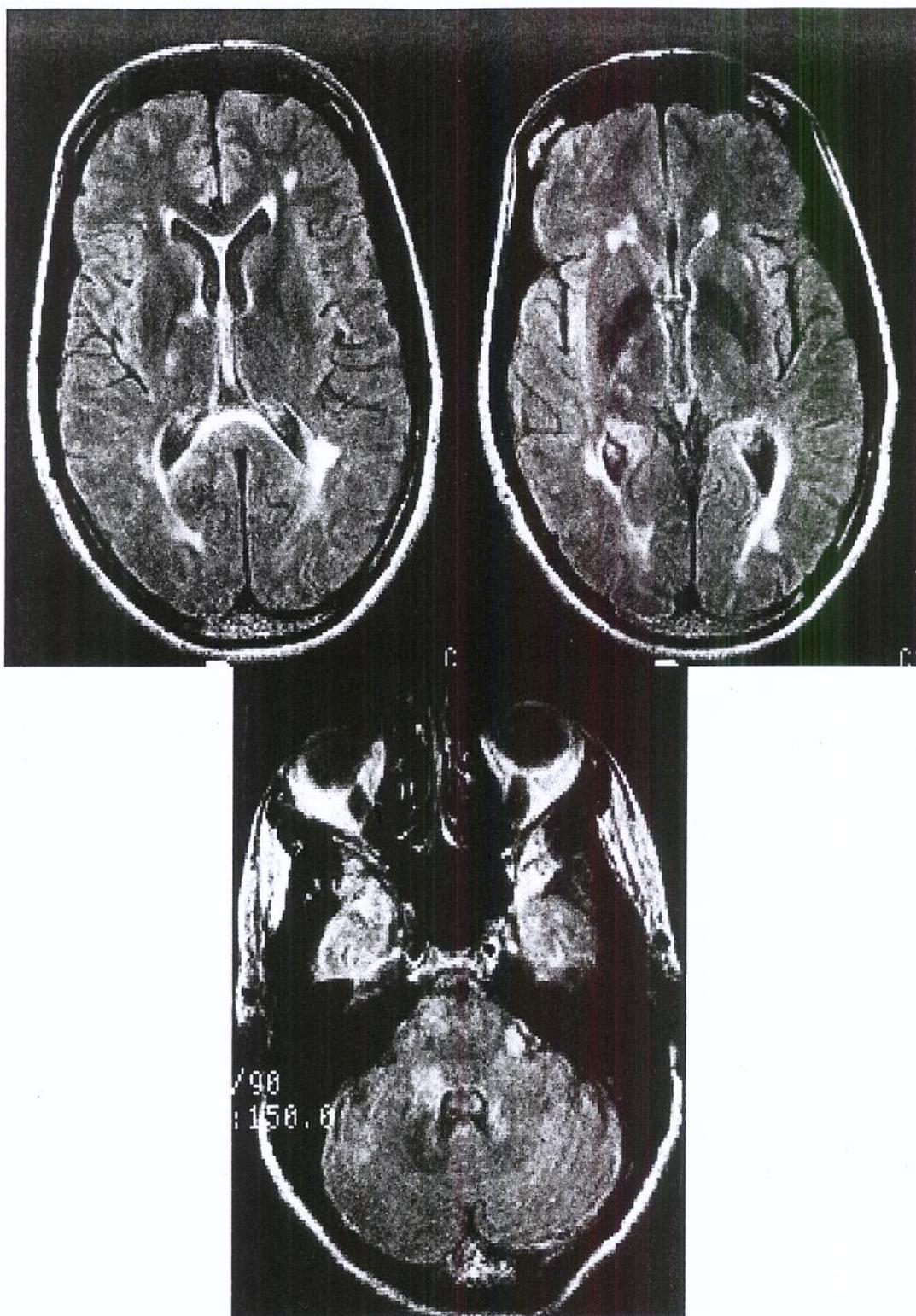


Figura 5- RM seqüência axial, ponderada em FLAIR . Paciente do grupo EM, mostrando lesões multifocais na substância branca, supra e infratentoriais, compatíveis com substrato desmielinizante.

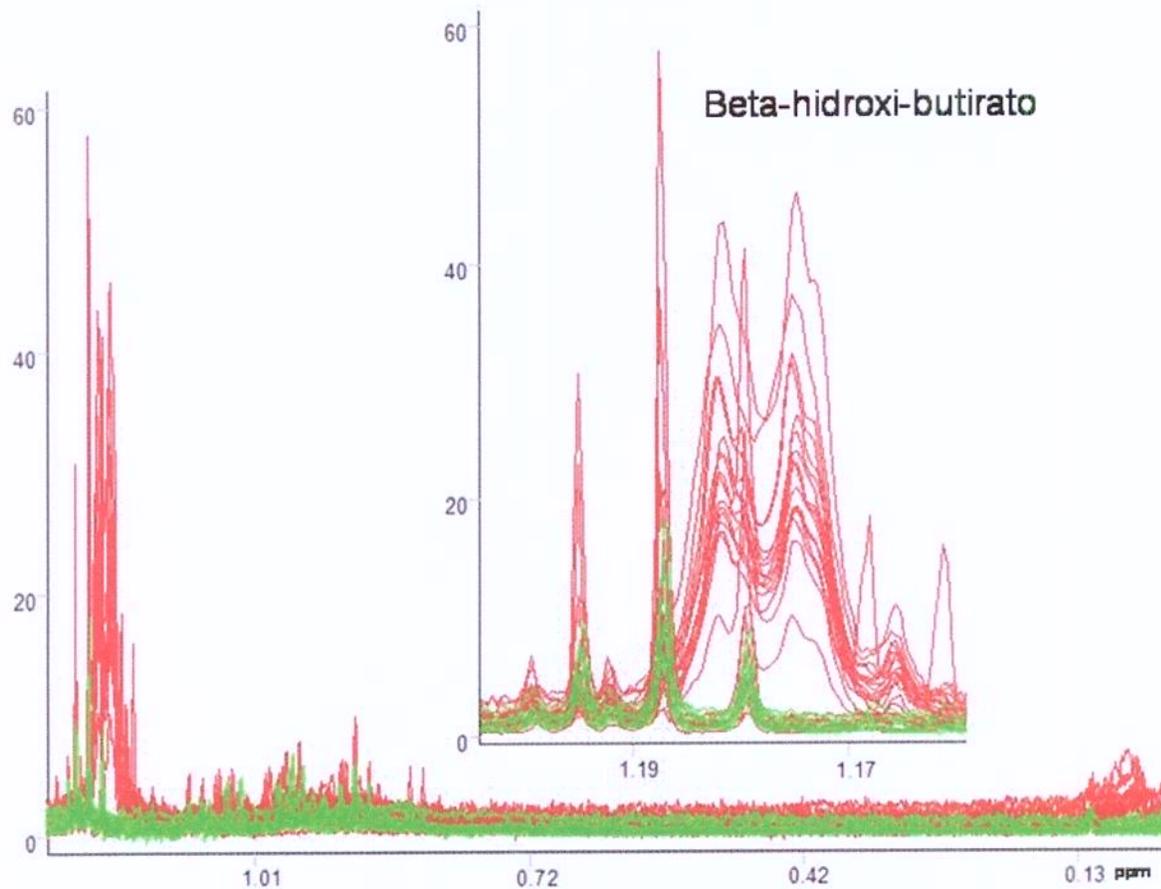


Figura 6- Ampliação da região de espectro de 0,15 a 1,25 ppm. Sobreposição dos 35 espectros. Pacientes com EM em vermelho e controles em verde. Há aumento dos níveis, nos pacientes com EM, do dubleto localizado em 1,18 ppm (beta-hidroxi-butyrate).

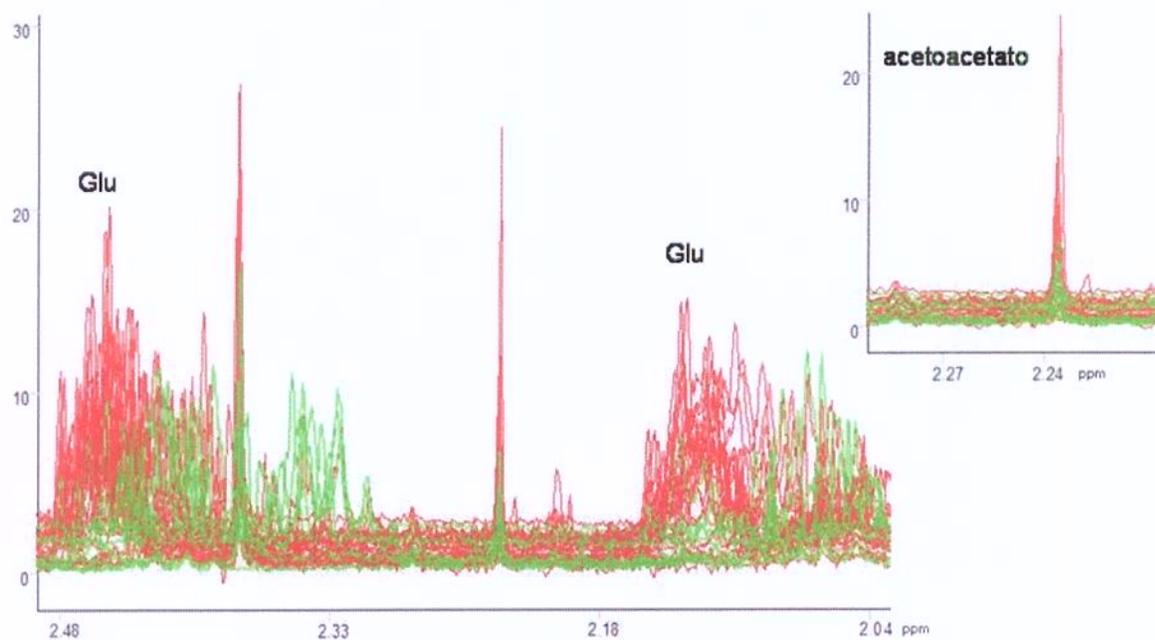


Figura 7- Ampliação da região de espectro de 2,0 a 2,5 ppm. Sobreposição dos 35 espectros. Pacientes com EM em vermelho e controles em verde. Há aumento dos níveis, nos pacientes com EM, do singlete localizado em 2,23 ppm (acetoacetato) e também de multipletos localizados em 2,08; 2,09; 2,11; 2,36; 2,41 referentes à glutamina e glutamato.

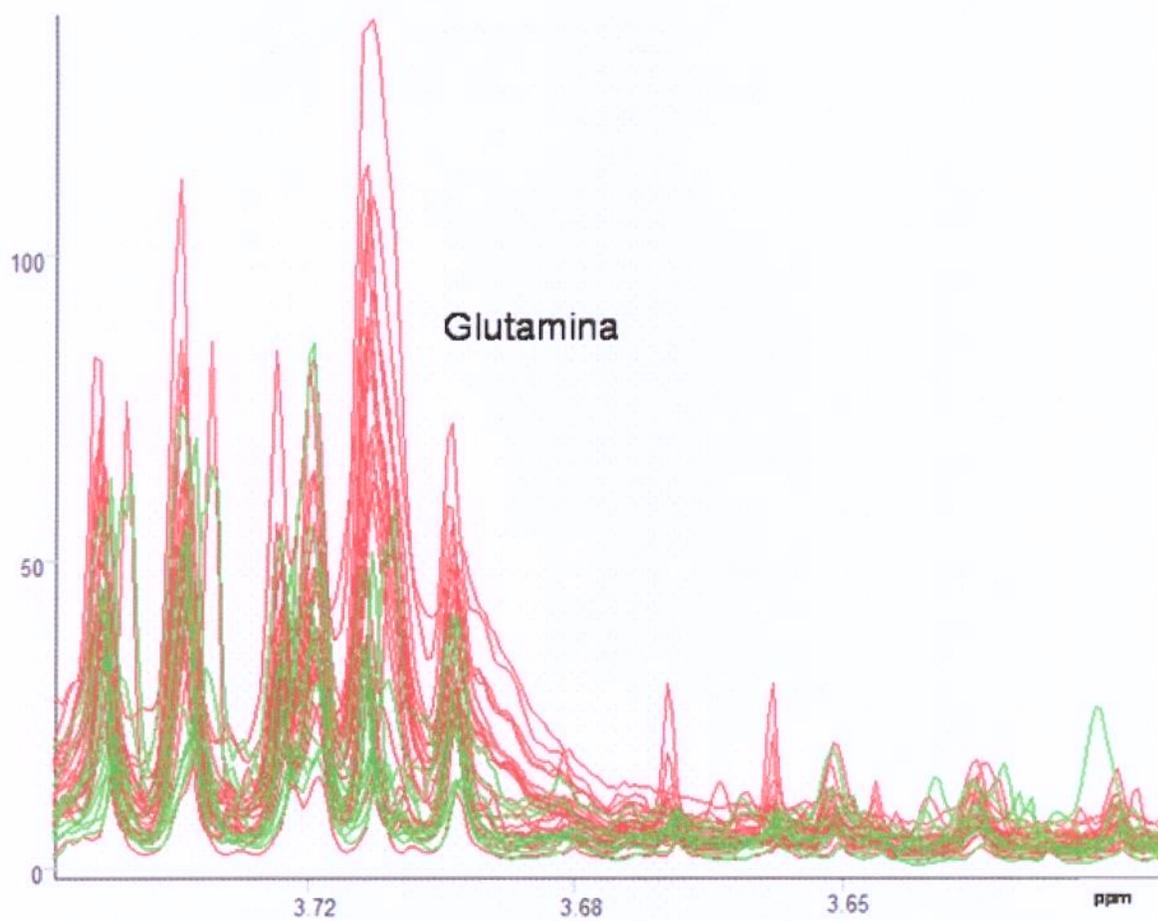


Figura 8- Ampliação da região de espectro de 3,5 a 4,0 ppm. Sobreposição dos 35 espectros. Pacientes com EM em vermelho e controles em verde. Há aumento dos níveis, nos pacientes com EM, do triplete localizado em 3,70 (glutamina).

A confiabilidade dos resultados obtidos é indicada pelo fato de se ter feito separação entre os grupos EM/Não-EM através dos picos acima mencionados, sem sobreposição dos mesmos na análise de componentes principais. Observamos, entretanto, que há uma maior dispersão dos pacientes com EM no gráfico, caracterizando, portanto, um grupo mais heterogêneo (Figura 9).

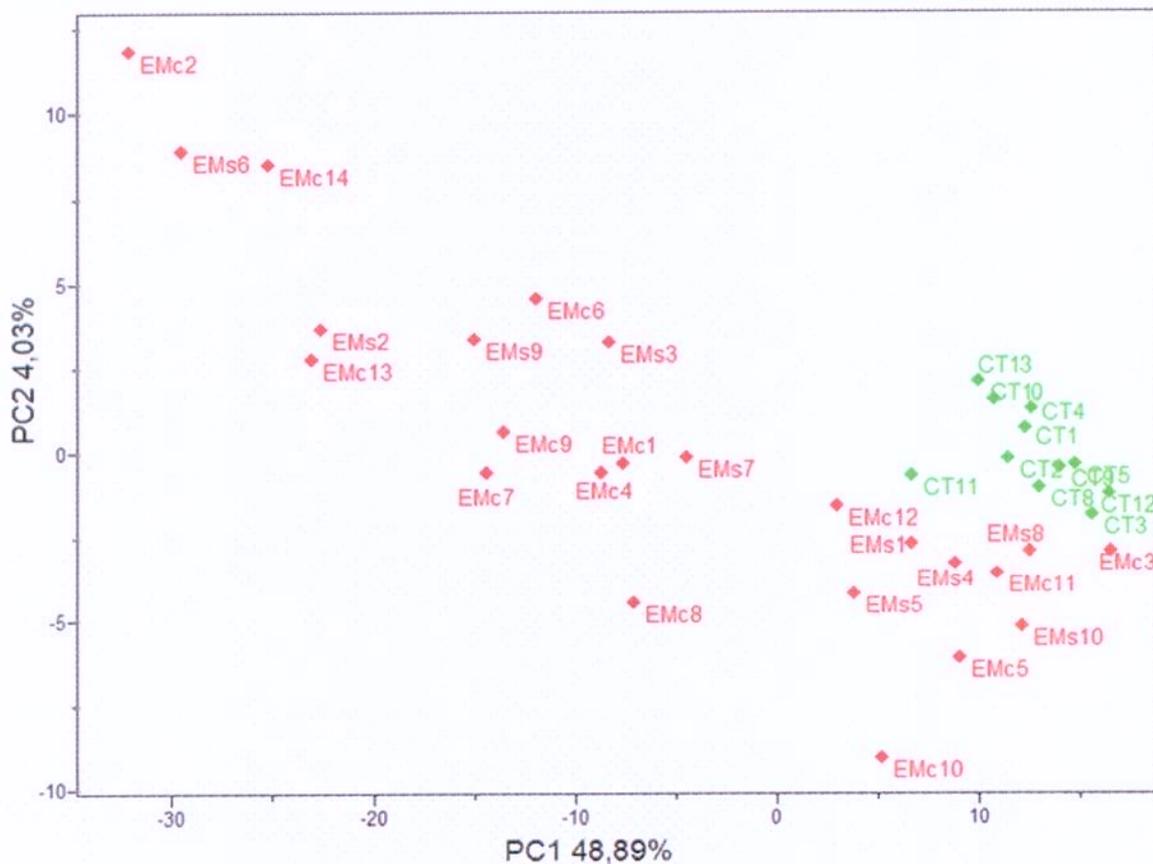


Figura 9- Análise por PLS. Pacientes com EM (24) representados em vermelho e os controles (11) em verde. Observar que há separação entre os grupos, sem sobreposição de indivíduos com EM e do grupo controle.

5- DISCUSSÃO

Com relação ao nosso grupo de estudo, houve predomínio do sexo feminino, com a forma remitente-recorrente, refletindo características epidemiológicas semelhantes às séries nacionais e internacionais. O predomínio da EM em adultos jovens também foi observado em nosso estudo. A idade média de início da doença nos nossos pacientes foi de 30,3 anos. Papais-Alvarenga *et al.* (1997) também obtiveram resultados semelhantes entre seus pacientes, entretanto, observaram idade de início mais cedo nas mulheres.

O sexo feminino nestas séries foi acometido na proporção de 3:1. A predominância feminina no nosso grupo de estudo foi de 1,7:1.

A forma clínica mais frequente no nosso estudo foi a remitente-recorrente, observada em 83,3% dos pacientes, um dado que foi semelhante aos já observados em outros relatos na literatura. As formas progressiva primária e secundária ocorreram, respectivamente, em 4,2 e 12,5% dos pacientes da nossa série.

Quanto ao estudo de RM, *in vivo*, observamos lesões captantes em 58,3% dos pacientes. Sabe-se que, como anteriormente exposto, um dos eventos mais precoces na formação das lesões da EM é um distúrbio da permeabilidade vascular intracraniana. Esta quebra de uma barreira normalmente impermeável do sistema vascular (barreira hematoencefálica) pode ser detectada nas aquisições de RM pelo extravasamento de um agente de contraste intra-venoso (como o gadolínio) no espaço perivascular que envolve o parênquima cerebral. E, na realidade, os eventos intravasculares que precedem este extravasamento não são completamente entendidos. Entretanto, algumas evidências sugerem que a migração de células T ativadas e macrófagos do compartimento intravascular no SNC é acompanhada (ou precedida) pelo aumento na secreção de metaloproteinases, que estariam associadas com a regulação deste fenômeno. A presença de lesões com realce tem particular importância na avaliação dos pacientes com EM, já que indica persistência/existência de atividade inflamatória. A redução de lesões captantes em controles seriados e periódicos pode ser associada, em algum grau, com redução de atividade inflamatória, o que poderia estar relacionado com o comprometimento a longo prazo dos pacientes. O realce é mais sensível do que o exame clínico e as seqüências ponderadas em T2 para avaliar a atividade da doença. Em séries longitudinais, uma associação significativa foi observada na ocorrência de lesões com realce e surtos da

doença. Assim, períodos de aumento da atividade inflamatória, detectada à RM, podem aumentar o risco de surgimento de novas lesões, no SNC, que se localizem em áreas que se tornem clinicamente aparentes. E, admite-se que pacientes que estejam recebendo medicações imunomoduladoras que não mostram uma redução nas lesões ativas em análises seriadas e freqüentes, podem não estar respondendo à terapia.

No nosso grupo, pacientes com maior tempo de duração da doença apresentaram menor tendência a apresentar lesões captantes. Isto também é fato conhecido, e, admite-se que, com a progressão da doença (sobretudo nas fases crônicas, nas quais há predomínio de "black holes"), há uma menor tendência à formação de lesões agudas/subagudas. Pacientes com a forma progressiva primária também apresentam menor tendência a apresentar lesões com realce (entretanto, no nosso estudo, o único paciente que apresentava a forma progressiva primária, apresentava lesão com captação).

Estudos da literatura com dose tripla de gadolínio (Filippi *et al.*, 1996) mostraram aumento na detecção de lesões captantes nas formas remitente-recorrente e na forma progressiva secundária de 50-70%. Entretanto, além dos custos, bem maiores, há também a possibilidade de alguns falso-positivos com esta metodologia: pequenos vasos, bem como artefatos de fluxo na fossa posterior, que podem simular realce. Nos nossos pacientes, utilizamos apenas a dose habitual de contraste. A aquisição de seqüências tardias, 30 e 60 minutos após a administração venosa do agente de contraste paramagnético, também pode aumentar a detecção de lesões com realce (Filippi, 1996), entretanto, obtenção de seqüências tão tardias, que determinariam aumento significativo na duração do exame, acabaria interferindo com a rotina normal dos exames de RM realizados em nosso serviço, e, assim, não foi realizada nos nossos pacientes.

Devido à complexidade das vias bioquímicas que se desenvolvem no sistema nervoso central, grande parte das interpretações para alterações nos níveis das substâncias intra ou extracelulares não são absolutas. Dependem da confirmação e descobertas de novas vias de regulação genética, enzimática e de mecanismos adaptativos que podem surgir. Portanto, muito do que discutiremos aqui sobre os resultados que observamos na espectroscopia *in vitro* são hipóteses e proposições, atualmente coerentes dentro do conhecimento do metabolismo cerebral.

Sabe-se que na vigência de processos inflamatórios linfócitos, micróglia e macrófagos liberam excessivas quantidades de glutamato. A ausência de receptores beta-2-adrenérgicos nos astrócitos de pacientes com EM pode prejudicar a recaptação do glutamato, o que está associado ao aumento dos níveis deste neurotransmissor. Isto contribui para dano excitotóxico em oligodendrócitos através da hiperestimulação de receptores de AMPA (ácido alfa amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico). A alteração neste receptor pode favorecer a liberação, pelos astrócitos, de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-alfa, que está envolvido na destruição da mielina e de oligodendrócitos, o que leva à expressão de sintase de óxido nítrico. Estudos histopatológicos de tecidos de EM mostram que há um mecanismo de injúria hipóxico-isquêmica associada. E, estudos atuais de RM, com técnicas de perfusão, corroboram esta hipótese. A elevação dos níveis de óxido nítrico nas lesões acarreta prejuízo na função mitocondrial. Supõe-se, assim, um papel da falência energética na produção de dano axonal, que, conforme já expomos, é evento bastante precoce na doença, e, cuja progressão no curso da mesma está bastante associado ao comprometimento clínico dos pacientes (Frohman, 2005).

No nosso estudo, encontramos, *in vitro*, aumento dos níveis de glutamato quanto e de glutamina. Estas duas substâncias têm seus metabolismos interligados, já que no neurônio pré-sináptico a glutamina é convertida em glutamato e amônia pela glutaminase (reação de hidrólise). E, pelo que foi exposto, o aumento dos níveis destas substâncias pode ser relacionado aos mecanismos de excitotoxicidade ligados à doença. O glutamato está sabidamente elevado em situações de dano tissular, como nos mecanismos hipóxico-isquêmicos. A glutamina, por sua localização predominantemente glial, pode ser considerada um marcador glial, e, os aumentos de seus níveis, podem, assim, em parte, ser atribuídos a astrogliose que ocorre na doença.

No desenvolvimento de lesões da EM, há proliferação e hipertrofia dos astrócitos. Nas lesões crônicas, as cicatrizes são um obstáculo ao reparo tissular. Uma disfunção primária nos astrócitos na EM pode estar envolvida na gênese da lesão e progressão dos déficits. A perda de receptores beta-2-adrenérgicos em astrócitos na EM (De Keyser, 1999), conforme a explicação anterior, pode, dessa forma, explicar muitos dos

processos patológicos envolvidos na doença e também a progressão da neurodegeneração (Frohman, 2005).

O aumento dos níveis do acetoacetato e do beta-hidroxi-beta-metil-butilato (derivado do metabolismo de degradação da alanina, treonina, valina, leucina e interleucina) também foram observados no nosso estudo e não haviam sido relatados em nenhum dos trabalhos anteriores de espectroscopia de prótons do líquido.

Estes aminoácidos compõem 40% das proteínas proteolípídicas da mielina e 20% da proteína básica de mielina (Lees, 1984), e, portanto, podem resultar da degradação e metabolismo da mielina.

Bhakoo *et al.* (2000) também encontraram alanina, valina, leucina e isoleucina em culturas de oligodendrócitos. Assim, a caracterização destes aminoácidos, bem como de compostos que resultam de sua degradação, em pacientes com EM (Mader, 2001) pode denotar patologia no oligodendrócito.

Dessa forma, as elevações que encontramos nos níveis do beta-hidroxibutilato e do acetoacetato (tanto nos pacientes com lesões ativas, quanto naqueles sem evidências de lesões em atividade), podem ser decorrentes da quebra da mielina em polipeptídeos ou proteínas menores. Além disso, beta-hidroxibutilato e acetoacetato são corpos cetônicos e podem estar com aumento dos seus níveis em decorrência das alterações hipóxico-isquêmicas que ocorrem em associação ao processo desmielinizante. Em se considerando mecanismos bioquímicos, sabemos que a acetil-coenzima A pode ser produzida pela oxidação de ácidos graxos na mitocôndria. Por um processo conhecido como cetogênese, que também ocorre primariamente na mitocôndria, a acetil-coenzima A é convertida em acetoacetato e beta-hidroxi-butilato. Estes dois compostos podem, em algumas situações, serem substratos energéticos. A formação do acetoacetato pode ocorrer em três reações: duas moléculas de acetil-coenzima A são condensadas em aceto-acetil-coenzima A por uma tiolase; a condensação de aceto-acetil-coenzima A com uma terceira acetil-coenzima A forma beta-hidroxi-beta-metil-glutaril-coenzima A (HMG-CoA); a degradação da HMG-CoA a acetoacetato e acetil-coenzima A em um éster. HMG-co A é também um precursor da biossíntese de colesterol e, assim, pode estar

relacionado à degradação e turnover das membranas. O acetoacetato pode ser reduzido a beta-hidroxi-butilato pela beta-hidroxibutilato-desidrogenase. Além disso, o acetoacetato, sendo um ceto-ácido, pode, através da descarboxilação não-enzimática, ser convertido em cetona e dióxido de carbono.

Nosso trabalho demonstrou resultados diferentes dos dois anteriores, descritos na literatura (Lynch, 1993; Simone, 1996), que tratam da espectroscopia do LCR na EM. Nenhum dos trabalhos anteriores havia demonstrado aumento dos níveis de glutamina/glutamato nos pacientes com esclerose múltipla. Também não haviam demonstrado aumento dos níveis de beta-hidroxibutilato.

A ERM¹H do LCR é importante ferramenta para monitorizar moléculas do metabolismo cerebral, já que alterações observadas no estudo do líquido podem refletir alterações que ocorrem no próprio tecido cerebral na gênese e no curso da doença.

As alterações metabólicas observadas no nosso estudo foram importantes para caracterização do grupo EM, e, pelas explicações acima supostas foram coerentes com a fisiopatogênese da doença.

Assim como a ERM¹H do tecido cerebral permite uma avaliação do tecido cerebral *in vivo*, a espectroscopia do LCR monitora algumas moléculas do metabolismo intermediário e oxidativo do cérebro (Nicolí, 1993).

Muitos investigadores mostraram alterações na ERM¹H *in vivo*, como aumento dos níveis de colina, lípidos e lactato em placas agudas e redução dos níveis de NAA em placas crônicas, achado que denota dano axonal nestas (Matthews, 1991; Davie, 1994). A observação da redução que também ocorre do NAA em placas agudas, assim como a recuperação, pelo menos parcial do NAA, que ocorre após alguns meses, mostra que a redução deste metabólito pode estar associada à disfunção axonal/edema, o que justificaria a recuperação dos seus níveis após a resolução do processo inflamatório. Nas placas agudas, também pode ser observada uma redução dos níveis de creatina, provavelmente refletindo disfunção metabólica. A substância branca aparentemente “normal”, assim como o córtex dos pacientes com EM, em estudos de espectroscopia *in vivo*, demonstram redução

das relações NAA/creatina, o que poderia estar relacionado com disfunção metabólica, astrogliose, e perda tissular. Além disso, diferentes estudos demonstram correlação importante entre as reduções do NAA, observadas no seguimento dos pacientes, com o grau de comprometimento clínico.

Observando estas diferenças, dividimos os pacientes com EM em dois grupos, para o estudo *in vitro*, aqueles que apresentavam lesões com realce (portanto, com placas agudas e/ou subagudas) e aqueles que apresentavam lesões sem realce (placas crônicas). Nos nossos resultados, *in vitro*, não encontramos diferenças significativas entre estes dois grupos. Parte disto pode ser decorrente do fato de que, mesmo nos pacientes com lesões captantes, o baixo número de lesões com realce pelo gadolínio, denotou ausência de atividade inflamatória intensa ou em grau significativo, que permitisse considerações mais precisas sobre estes dois grupos.

Provavelmente, nossos resultados refletem alterações fisiopatológicas associadas à EM. Vale ressaltar, ainda, que a ausência do NAA no líquido, devido à hidrólise deste composto (Goldstein, 1976), assim como a baixa concentração da colina no LCR (1,5 a 3,5 $\mu\text{M/L}$ por imunoensaio) (Aquilonius, 1972) está abaixo do limite (100 $\mu\text{M/L}$) para detecção pela técnica de ERM^1H , podem ter contribuído para não se detectarem diferença entre os grupos.

Em um estudo de Simone *et al.* (1996) foi encontrado na ERM^1H do líquido elevação dos níveis de lactato nos pacientes que apresentam placas agudas (lesões captantes). Entretanto, nossos dados não corroboraram este achado.

Nossos resultados de ERM^1H do líquido não podem ser interpretados isoladamente, porém, forneceram importantes informações metabólicas, coerentes com a fisiopatologia da EM.

Outro dado relevante do nosso estudo foi a possibilidade de separação completa dos grupos doentes/controles, como foi demonstrada pelos métodos de quimiometria (PLS, PCA), o que torna a espectroscopia de prótons de alta resolução do líquido uma ferramenta adicional potencialmente importante no diagnóstico da esclerose múltipla.

Vale ressaltar que, nos dados de espectroscopia *in vitro*, como já afirmamos anteriormente, não encontramos diferenças significativas entre os grupos que apresentaram lesões com captação e sem captação. Provavelmente, porque foram observadas poucas lesões captantes, não se caracterizando, assim, quebra significativa de barreira hematoencefálica e atividade inflamatória em curso em grau intenso.

Dentre as limitações do nosso estudo, podemos considerar que foram estudados poucos indivíduos doentes e, além disso, houve detecção de poucas lesões com realce, prejudicando eventuais distinções entre os dois subgrupos de pacientes.

O equipamento de RM de alto campo utilizado em nosso experimento apresenta custo operacional elevado, e, além disso, as várias etapas necessárias para obtenção e processamento dos dados, diminuem a aplicabilidade clínica do método.

6- CONCLUSÕES

A ERM¹H *in vitro* é um método eficiente para caracterização bioquímica de alterações encontradas em pacientes com EM, distinguindo-os dos indivíduos controles.

Foram encontrados aumentos dos níveis de beta-hidroxi-butirato, acetoacetato, glutamina e glutamato nos pacientes com EM.

Não se encontrou diferença nos padrões de LCR dos dois grupos estudados de pacientes com EM (com e sem atividade inflamatória), o que pode ser decorrente do baixo de lesões captantes observadas no nosso estudo.

Os resultados deste trabalho contribuem para a interpretação dos mecanismos bioquímicos da EM, e refletem particularidades diferentes das já descritas em trabalhos anteriores na literatura. É importante também ressaltar que, pelos dados obtidos, a espectroscopia de prótons de alta resolução do líquido pode ser considerada ferramenta adicional importante no estudo da EM.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSSON M, ALVARES-GERMEÑO J, BERNARDI G *et al.* Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, 57: 897-902, 1994.

AQUILONIUS SM, NYSTROM B, SCHUBERTH J, SUNDWALL A. Cerebrospinal fluid choline in extrapyramidal disorders. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, 35: 720-725, 1972.

ARNOLD DL, MATTHEWS PM. MRI in the diagnosis and management of multiple sclerosis. **Neurology**, 58: S23-S31, 2002.

ARNOLD DL, MATTHEWS PM, FRANCIS GS, O CORNNOR J, ANTEL JP. Proton Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging for Metabolic Characterization of Demyelinating Plaques. **Ann Neurol**, 31 (3): 235-41, 1992.

BALÁSSY CS, BERNERT G, WOBER-BINGOL C *et al.* Long term MRI observations of childhood-onset relapsing-remitting Multiple Sclerosis. **Neuropediatrics**, 32: 28-37, 2000.

BARKHOF F, FREQUIN STFM, HOMMES OR, LAMERS K, SCHELTENS P, VAN GEEL WJA; WALK J. A correlative triad of gadolinium-DTPA MRI, EDSS, and CSF-MBP in relapsing multiple sclerosis patients treated with high-dose intravenous methylprednisolone. **Neurology**, 42: 63-67, 1992.

BARKHOF F, FILIPPI M, MILLER DH *et al.* Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. **Brain**, 120: 2059-2069, 1997.

BARKHOF F, VAN WAESBERGHE JHTM, FILIPPI M *et al.* T1 hypointense lesions in secondary progressive multiple sclerosis: effect of interferon beta-1b treatment. **Brain**, 124: 1396-1402, 2001.

BASLOW MH. N-acetylaspartate in the vertebrate brain: metabolism and function. **Neurochem Res**, 28: 941-953, 2003.

BASTIANELLO S, POZZILLI C, BERNARDIS S. *et al.* Serial study of gadolinium-DTPA MRI enhancement in multiple sclerosis. **Neurology**, 40: 591-595, 1990.

BHAKOO KK, STYLES P. N-acetyl-aspartate: in vitro expression in oligodendrocytes; implications for proton-MRS signal in vivo. In: Proceedings of the 8th Scientific Meeting and Exhibition of the ISMRM; Denver (CO), USA. Berkeley (CA): International Society for Magnetic Resonance in Medicine, p. 567, 2000.

BENDSZUZ M, WARMUTH-METZ M, BURGER R *et al.* Diagnosing dural metastasis: the value of 1H magnetic resonance spectroscopy. **Neuroradiology**, 43: 285-289, 2001.

BERMEL RA; SRINIVAS R, RUDICK RA *et al.* Prediction of longitudinal brain atrophy in multiple sclerosis by gray matter magnetic resonance imaging T2 hypointensity. **Arch Neurol**, 62: 1371-1376, 2005.

BO L, VEDELER C A; NYLAND HI, TRAPP BD, MORK SJ. Subpial demyelination in the cerebral cortex of multiple sclerosis patients. **J Neuropathol Exp Neurol**, 62: 723- 732, 2003.

BOT JCJ, BARKHOF F, NIJEHOLT GL *et al.* Differentiation of multiple sclerosis from other inflammatory disorders and cerebrovascular disease: value of spinal MR imaging. **Radiology**, 223: 46-46, 2002.

BREX PA, JENKINS R, FOX NC *et al.* Detection of ventricular enlargement in patients at the earliest clinical stage of MS. **Neurology**, 54: 1689-1691, 2000.

BROWN WJ. The capillaries in acute and subacute multiple sclerosis plaques: a morphometric analysis. **Neurology**, 9 (2): 84-92, 1978.

BRUCK W, BITSCH A; KOLENDA H, BRUCK Y, STIEFEL M, LASSMANN H. Inflammatory central nervous system demyelination: Correlation of magnetic resonance imaging findings with lesion pathology. **Ann Neurol**, 42: 783- 793, 1997.

CALLEGARO D, GOLDBAUM M, MORAIS L, *et al.* The prevalence of multiple sclerosis in the city of São Paulo, Brazil, 1997. **Acta Neurol Scand**, 104 (4): 208-213, 2001.

CAPRA R, MARCIANO N, COTTI-COMETTI V, *et al.* Immunological and gadolinium-DTPA MRI evaluation of relapsing-remitting multiple sclerosis. **Acta Neurol Scand**, 86: 342-345, 1992.

- CARAMIA F, PANTANO P, DI LEGGE S *et al.* A longitudinal study of MR diffusion changes in normal appearing white matter of patients with early multiple sclerosis. **Mag Reson Imaging**, 20 (5): 383-388, 2002.
- CASTILLO M, KWOCK L, MUKHERJI SK. Clinical Applications of Proton MR Spectroscopy. **Am J Neuroradiol**, 17: 1-15, 1996.
- CENDES F. Proton MRS: lactate. **Adv Neurol**, 83: 247-51, 2000.
- CEODAN S, PARRILHA R, SANTORO J, RICO M. H-1 NMR detection of cerebral myo-inositol. **FEBS Lett**, 187: 167-72, 1985.
- DALGLEISH AG. Viruses and multiple sclerosis. **Acta Neurol Scand**, S 169: 8-14, 1997.
- DALTON CM, BREX PA, MISZKEIL KA *et al.* Application of the new McDonald criteria to patients with clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis. **Ann Neurol**; 52: 47-53, 2002.
- DANAMO AF, GILDES LI, YATSU FM. Acetyl transport mechanisms. Involvement of N-acetyl aspartic acid in de novo fatty acid biosynthesis in the developing rat brain. **Exp Brain Res**, 5: 267-73, 1968.
- DAVIDSON A, TAIT DM, SPAINE GS *et al.* Magnetic resonance spectroscopy in the evaluation of the neurotoxicity following cranial irradiation for childhood cancer. **Br J Radiol**, 73: 421-424, 2000.
- DAVIE CA, HAWKINS CP, BARKER GJ *et al.* Detection of myelin breakdown products by proton magnetic resonance spectroscopy. **Lancet**, 341: 630-631, 1993.
- DAVIE CA, HAWKINS CP, BARKER GJ *et al.* Serial proton magnetic resonance spectroscopy in acute multiple sclerosis lesions. **Brain**, 117: 49-58, 1994.
- DE GROOT CJA, BERGERS E, KAMPHORST W *et al.* Post-mortem MRI-guided sampling of multiple sclerosis brain lesions: Increase yield of active demyelinating and (p)reactive lesions. **Brain**, 124: 1635- 1645, 2001.
- DE KEYSER J, WILCZAK N, LETA R, STREETLAND C. Astrocytes in multiple sclerosis lack beta-2 adrenergic receptors. **Neurology**, 53: 1628-1633, 1999.

- DE STEFANO N, CARAMANOS Z, PREUL MC, FRANCIS G, ANTEL JP, ARNOLD DL. In vivo differentiation of astrocytic brain tumors and isolated demyelinating lesions of the type seen in multiple sclerosis using 1H magnetic resonance spectroscopic imaging. *Ann Neurol*, 44: 273-278, 1998.
- DEMAEREL P, JOHANNIK K, HIECKE V *et al.* Localized H NMR spectroscopy in fifty cases of new diagnosed intracranial tumors. *J Comput Assist Tomogr*, 15(1): 67-76, 1991.
- DUNNE VG, BHATTACHAYYA S, BESSER M, RAE C, GRIFFIN JL. Metabolites from cerebrospinal fluid in aneurismal subarachnoid haemorrhage correlate with vasospasm and clinical outcome: a pattern-recognition 1H NMR study. *NMR Biomed*, 18: 24-33, 2005.
- DUZEL E, KAUFMANN J, GUDERIAN S *et al.* Measures of hippocampal volumes, diffusion and 1H MRS metabolic abnormalities in temporal lobe epilepsy provide partially complementary information. *Eur J Neurol*, 11(3): 195-205, 2004.
- EVANS AC, FRANK JA, ANTEL J, MILLER DH. The Role of MRI in Clinical Trials of Multiple Sclerosis: Comparison of Image Processing Techniques. *Ann Neurol*, 41: 125-132, 1997.
- FARIA AV. Estudo da bioquímica dos tumores do sistema nervoso central através da espectroscopia de hidrogênio por ressonância magnética. Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, 2004.
- FARLOW MR, EDWARDS MK, KOLAR OJ, STEVENS JC, YU PL. Magnetic resonance imaging in multiple sclerosis: analysis of correlations to peripheral blood and spinal fluid abnormalities. *Neurology*, 37 (9): 1527-1530, 1987.
- FIGUEIREDO IM. Técnicas de RMN recentes aplicadas às interações proteína-ligante e a metabonômica. Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Química da UNICAMP, 2006.
- FILIPPI M, HORSFIELD MA, MORRISSEY SP *et al.* Quantitative brain MRI lesion load predicts the course of clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis. *Neurology*, 44: 635-41, 1994.

FILIPPI M, PATY DW, KAPPOS L *et al.* Correlations between changes in disability and T2 weighted brain MRI activity in multiple sclerosis: a follow-up study. **Neurology**, 45: 255-260, 1995.

FILIPPI M, YOUSRY T, BARATTI C *et al.* Quantitative assessment of MRI lesion load in multiple sclerosis. A comparison of conventional spin-echo with fast fluid-attenuated inversion recovery. **Brain**, 119: 1349- 1355, 1996.

FREQUIN ST, BARKHOF F, LAMERS KJ, HOMMES OR. The effects of high dose methylprednisolone on gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging and cerebrospinal fluid measurements in multiple sclerosis. **J Neuroimmunol.** 40 (2-3): 265-272, 1992.

FROHMAN EM, FILIPPI M, STUVE O *et al.* Characterizing the mechanisms of progression in multiple sclerosis. Evidences and new hypotheses for future directions. **Arch Neurol**, 62: 1345- 1356, 2005.

GADIAN GD. **NMR and applications to living systems.** New York: Oxford Science Publications, 1995, p. 6-12; 29-33.

GAY FW, DRYE TJ, DICK GW, ESIRI MM. The application of multifactorial cluster analysis in the staging of plaques in early multiple sclerosis. Identification and characterization of the primary demyelinating lesion. **Brain**, 20: 1461-1483, 1997.

GILHAM B, PAPACHRISTODOULOU DK, THOMAS JH. In: Wills. **Biochemical basis of medicine.** Third Edition. Oxford: Butterworth Heinemann, 1997. p. 57-60.

GILL SS, SMALL RK, THOMAS DG *et al.* Brain metabolites as ¹H NMR markers of neuronal and glial disorders. **NMR Biomed**, 2: 196-200, 1989.

GIOVANNONI G, BEVER CT. Patients with clinically isolated syndromes suggestive of MS: Does MRI allow earlier diagnosis? **Neurology**, 60: 6-7, 2003.

GIOVANNONI G, KIESEIER B, HARTNUNG HP. Correlating immunological and magnetic resonance imaging markers of disease activity in multiple sclerosis. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, 64 (supplement 1): S31-S36, 1998.

- GIRARD N, WANG Z J, ERBETTA A *et al.* Prognostic value of proton MR spectroscopy of cerebral hemisphere tumor in children. **Neuroradiology**, 40: 121-125, 1998.
- GOLDBAUM M, MORAES L, CALLEGARO D, *et al.* Prevalence of multiple sclerosis in the city of São Paulo, Brazil, in 1997. **Arq Neuropsiquiatria**, 43 (S 4): 220, 1998.
- GOLDSTEIN FB. Aminohydrolases of brain: enzymatic hydrolysis of N-Acetyl-L-Aspartate and other N-Acyl-L-aminoacids. **J Neurochem**, 26: 45-49, 1976.
- GUO AC, MACFALL JR, PROVENZALE J. Multiple sclerosis: diffusion tensor MR imaging for evaluation of normal-appearing white matter. **Radiology**, 222: 729-736, 2002.
- GUTOWSKI NJ, GOMEZ-ANSON B, TORPEY N, REVESZ T, MILLER DH, RUDGE P. Oligodendroglial gliomatosis cerebri: H-MRS suggest elevated glycine/inositol levels. **Neuroradiology**, 41: 650-3, 1999.
- GYNGELL ML, MICHAELIS T, HORSTERMANN D *et al.* Cerebral glucose is detected by localized proton NMR spectroscopy in normal rat brain in vivo. **Magn Res Méd**, 19: 489-95, 1991.
- HARTUNG HP, REINERS K, ARCHELOS JJ, *et al.* Circulating adhesion molecules and tumor necrosis factor receptor in multiple sclerosis: correlating with magnetic resonance imaging. **Ann Neurol**, 38: 186-193, 1995.
- HAWKINS CP, MUNRO PMG, MACKENZIE F *et al.* Duration and selectivity of blood-brain barrier breakdown in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis studied by gadolinium-DTPA and protein markers. **Brain**, 113: 365-378, 1990.
- HENRIKSEN O. MRS of brain In: CERTAINES JD, BOVEE WMNJ, PODO F. **Magnetic resonance spectroscopy in biology and medicine**. Oxford: Pergamon Press, 1992. p. 31-51.
- HONIG LS, SIDDHARTHAN R, SHEREMATA WA, SHELDON JJ, SAZANT A. Multiple sclerosis: correlation of magnetic resonance imaging with cerebrospinal fluid findings. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, 51 (2): 277-280, 1998.

- HOWE FA, BARTIN SJ, CUDLIP SA *et al.* Metabolic profiles of human brain tumors using quantitative in vivo ¹H magnetic resonance spectroscopy. **Magn Reson Med**, 49(2): 223-32, 2003.
- INDHAL UG, SAHNI NS, KIRKHUS B, NAES T. Multivariate strategies for classification based on NIR-spectra- with application to mayonnaise. **Chemom Intell Lab Sys**, 49: 19-31, 1999.
- JACOBS LD, KABA SE, MILLER CM, PRIORE RL, BROWNSCHIEDLE CM. Correlation of clinical, magnetic resonance imaging and cerebrospinal fluid findings in optic neuritis. **Ann Neurol**, 41 (3): 392-398, 1997.
- JAYASUNDAR R, RAGHNATHAN P, BANERJI AK. Proton MRS similarity between central nervous system non-Hodgkin lymphoma and intracranial tuberculoma. **Magn Reson Med**, 13: 489-493, 1995.
- JOHSTONE IM, SILVERMAN BW. Wavelet threshold estimators for data with correlated noise. **J Roy Statist Soc**, 59: 319-351, 1997.
- KAPPOS L, PFEUFFER B, STAEDT D *et al.* Quantitative magnetic resonance imaging of the multiple sclerosis brain: localization rather than total volume of lesions correlates with cerebrospinal fluid level and visual evoked response abnormalities. **Ann Neurol**, 24: 169, 1988.
- KATZ D, TAUBENBERGER JK, CANELLA B *et al.* Correlation between magnetic resonance imaging findings and lesion development in chronic, active multiple sclerosis. **Ann Neurol**, 34 (5): 661-669, 1993.
- KEALEY SM, KIM YJ, PROVENZALE JM. Redefinition of multiple sclerosis plaque size using diffusion tensor MRI, **AJR**, 183: 497-503, 2004.
- KINOSHITA Y, KAJIWARA H, YOKOTA A, KOGA Y. Proton magnetic resonance spectroscopy of brain tumors: an in vivo study. **Neurosurgery**, 5(4): 606-614, 1994.
- KINSKI L, SCHNALL MD. MR spectroscopy and the biochemical basis of neurological disease. In: ATLAS SW. *Magnetic Resonance Imaging of Brain and Spine*. Second Edition. New York: Lippincott-Raven, p. 1619-54, 1996.

KREIS R., ROSS BD, FARROW NA, ACKERMAN Z.. Metabolic disorders of the brain in chronic hepatic encephalopathy detected with H-1 MR spectroscopy. **Radiology**, 182: 19-27, 1992.

KURTZKE .F. Rating neurological impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). **Neurology**, 33: 1444-1452, 1983.

LASSMANN H, BRUCK W, LUCCHINETTI C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. **Trends Mol Med**, 7 (3): 115-121, 2001.

LEACH M, MOYEC L, PODO F. MRS of tumours: basic principles. In: CERTAINES, J.D.; BOVEE, W.M.M.J.; PODO, F. **Magnetic resonance spectroscopy in biology and medicine**. Oxford: Pergamon Press, 1992. p. 295-345.

LEE MA, SMITH S, PALACE J *et al.* Spatial mapping of T2 and gadolinium-enhancing T1 lesion volumes in multiple sclerosis: evidence for distinct mechanisms of lesion genesis? **Brain**, 122: 1261-1270, 1999.

LEES MB, BROSTOFF SW. Proteins of myelin. In: MORELL P, editor. **Myelin**. 2nd ed. New York: Plenum Press; p. 197-224, 1984.

LIEBSCH R, KORNHUBER ME, DIETL D, VON EINSIEDEL HG, CONRAD B. Blood-CSF barrier integrity in multiple sclerosis. **Acta Neurol Scand**, 94 (6): 404-410, 1996.

LOEVNER LA, GROSSMAN RI, COHEN JA *et al.* Microscopic disease in normal-appearing white matter on conventional MR images in patients with multiple sclerosis: assessment with magnetization-transfer measurements. **Radiology**, 196: 511-515, 1995.

LUCCHINETTI C, BRUCK W, PARISI J *et al.* Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. **Ann Neurol**, 47: 797-717, 2000.

LUXTON RW, MCLEAN BN, THOMPSON EJ. Isoelectric focusing versus quantitative measurements in the detection of intrathecal synthesis of IgG. **Clin Chim Acta**, 187: 297-308, 1990.

- LYNCH J, PEELING J, AUTY A, SUTHERLAND GR. Nuclear magnetic resonance study of cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis. **Can J Neurol Sci**, 20: 194-198, 1993.
- MACIEL EP. Esclerose múltipla: correlação clínica, líquido cefalorraquiano e neuroimagem. Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, 2002.
- MADER I, SEEGER U, WEISSERT R et al. Proton MR spectroscopy with metabolite-nulling reveals elevated macromolecules in acute multiple sclerosis. **Brain**. 124: 953-961, 2001.
- MACINTOSH JC, COOPER JR. Studies in the function of N-acetyl aspartic acid in the brain. **J Neurochem**, 12: 825-835, 1965.
- MAILLET S, VION-DURY J, CONFORT-GOUNY S et al. Experimental protocol for clinical analysis of cerebrospinal fluid by high resolution proton magnetic resonance spectroscopy. **Brain Research Protocols**, 3: 123-134, 1998.
- MAISTRETTI PJ. **Fundamental Neuroscience- Brain Energy Metabolism**. Second edition. New York: Elsevier Science, 2003 p. 339-360.
- MASDEU JC, QUINTO C, OLIVERA C et al. Open-ring imaging sign: Highly specific for atypical brain demyelination. **Neurology**, 54: 1427-1433; 2000.
- MATTEWS PM, FRANCIS G, ANTEL J, ARNOLD DL. Proton magnetic resonance spectroscopy for metabolic characterization of plaques in multiple sclerosis. **Neurology**, 41: 1251-1256, 1991.
- MCDONALD WI, COMPSTON A, EDAN G et al. Recommended Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: Guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis. **Ann Neurol**, 50: 121-127, 2001.
- MCLEAN BN, ZEMAN AZ, BARNES D, THOMPSON EJ. Patterns of blood-brain barrier impairment and clinical features in multiple sclerosis. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**. 56 (4) : 356-360, 1993.

MERBOLDT KD, BRUHN H, HANICKE W, MICHAELIS T, FRAHM J. Decrease of glucose in the human visual cortex during physiologic stimulation. **Magn Reson Med**, 25: 187-194, 1992.

MICHAELIS T, MERBOLDT KD, BRUHN H, HANICKE W, FRAHM J. Absolute concentration of metabolites in adult human brain in vivo: quantification of localized proton MR spectroscopy. **Radiology**, 187; 219-227, 1993.

MOLYNEUX PD, FILIPPI M, BARKHOF F *et al.* Correlations between monthly enhanced MRI lesion rate and changes in T2 lesion volume in multiple sclerosis. **Ann Neurol**, 43: 332-339, 1998.

MOSCARELLO MA, BRADY GW, FEIN DB *et al.* The role of charge microheterogeneity of basic protein in the formation and maintenance of the multilayered structure of myelin: a possible role in multiple sclerosis. **J Neurosci Res**, 15: 87-99, 1986.

MOSCARELLO MA, WOOD DD, ACKERLEY CA, BOULIAS CA. Myelin in multiple sclerosis is developmentally immature. **J Clin Invest**, 94: 146-154, 1994.

MILLER DH, ALBERT PS, BARKHOF F *et al.* Guidelines for the use of magnetic resonance techniques in monitoring the treatment of multiple sclerosis. US National MS Society Task Force. **Ann Neurol**, 39: 6-16, 1996.

NAMER IJ, YU O, MAUSS Y, DUMITRESCO BE, CHAMBRON J. An evaluation of the significance of areas of intense signal in the MR brain images of patients with multiple sclerosis. **Mag Reson Imaging**, 11: 311-317, 1993.

NEGENDANK WG, SAUTER R, BROWN TR. Proton magnetic resonance spectroscopy in patients with glial tumors: a multicentric study. **J Neurosurg**, 84: 449-58, 1996.

NICOLI F, VION-DURY J, MALOTEAUX JM, DELWAIDE C, CONFORT-GOUNY S, SCIAKY M, COZZONE PJ. CSF and serum metabolic profile of patients with Huntington's chorea: a study by high resolution proton NMR spectroscopy and HPLC. **Neurosci Lett**, 154: 47-51, 1993.

- OLIVEIRA EML, ANNES M, OLIVEIRA ASB, GABBAI A. A Esclerose múltipla: estudo clínico de 50 casos acompanhados no ambulatório de neurologia. UNIFESP-EPM. *Arq Neuropsiquiatr*. 57: 51-55, 1999.
- OTT D, HENNING J, ERNEST T. Human brain tumors: Assessment with in vivo proton MR spectroscopy. *Radiology*, 186: 745-752, 1993.
- PAPAI-ALVARENGA R, LEON AS, MIRANDA C *et al*. Characteristics of multiple sclerosis in Brazil: a multicentric study in a prevalence COHORT -South Atlantic Project Phase I. *Abstr J Neurol Sci*; 150(Suppl): S229, 1997.
- PASCUAL JM, CARCELLER F, RODA JM, CERDAN S. Glutamate, glutamine, and GABA as substrates for the neuronal and glial compartments after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 29: 1048-56, 1998.
- PEELING J, SUTHERLAND G. 1H magnetic resonance spectroscopy of extracts of human epileptic neocortex and hippocampus. *Neurology*, 43(3): 589-594, 1993.
- PERRY TL, HANSEN S, GANDHAN SS. Postmortem Changes of Amino Compounds in Human and Rat Brain. *J. Neurich*, 36(2): 406-12, 1981.
- PETROFF OAC, GRAHAM GD, BLAMIRE AM *et al*. Spectroscopic imaging of stroke in humans: Histopathology correlates of spectral changes. *Neurology*, 42: 1349-1354, 1992.
- PETROFF OAC, PLEBAN LA, SPENCER DD. Symbiosis between in vivo and in vitro NMR spectroscopy: the creatine, N-acetyl aspartate, glutamate and GABA content of the epileptic human brain. *Magn Reson Imaging*, 13(8): 1197-1211, 1993.
- PERRY TL, HANSEN S, GANDHAN SS. Postmortem changes of amino compounds in human and rat brain. *J Neurich*, 36 (2): 406-412, 1981.
- POPTANI M, GRUPTA RK, ROY R *et al*. Characterization of intracranial mass lesions with in vivo proton MR spectroscopy. *Am J Neuroradiol*, 16: 1593-1603, 1995.
- PORTAIS JC, PIANET I, ALLARD M *et al*. Magnetic resonance spectroscopy and metabolism. Applications of proton and ¹³C NMR to the study of glutamate metabolism in cultured glial cells and human brain in vivo. *Biochimie*, 73 (1): 93-7, 1991.

- POSER CM, PATY W, SCHEINBERG LC *et al.* New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. **Ann Neurol**, 13: 227-231, 1983.
- PUCCIONI-SOHLER M, LAVRADO FP, BASTOS RRG, BRANDÃO CO, PAPAIZ-ALVARENGA R. Multiple Sclerosis: clinical and laboratorial correlation. **Arq Neuropsiquiatr**. 59(1): 89-91, 2001.
- QURESHI GA & BAIG MS. Quantitation of free aminoacids in biological samples by high performance liquid chromatography. Application of the method in evaluating aminoacid levels in cerebrospinal fluid and plasma of patients with multiple sclerosis. **J Chromatogr**, 459: 237-244, 1988.
- REIBER H & FELGENHAUER K. Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantification of the humoral immune response within the central nervous system. **Clin Chim Acta**, 163: 319-328, 1987.
- REICHELTL KL, KVAMME E. Histamine dependent formation of n-acetyl aspartyl peptides in mouse brain. **J Neurochem**, 21: 849-59, 1973.
- RIECKMANN P, ALTENHOFEN B, RIEGEL A, BAUDEWIG J, FELGENHAUER K. Soluble adhesion molecules (VCAM-1 and ICAM-1) in cerebrospinal fluid and serum correlate with MRI activity in multiple sclerosis. **Ann Neurol**, 41 (3): 326-333, 1997.
- RIJPKEMA M, SCHUURING J, VAN DER MEULEN Y *et al.* Characterization of oligodendrogliomas using short echo time 1H MR spectroscopic imaging. **NMR Biomed**, 16(1): 12-18, 2003.
- ROVARIS M, BARNES D, WOODROFE N *et al.* Patterns of disease activity in multiple sclerosis patients: a study with quantitative gadolinium-enhanced brain MRI and cytokine measurement in different clinical subgroups. **J Neurol**, 243: 536-542, 1996.
- RUTKOWSKI T, TARNAWSKI R, SOKOL M, MACIEJEWSKI B. 1H-MR spectroscopy of normal brain tissue before and after postoperative radiotherapy because of primary brain tumors. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 56(5): 1381-9, 2003.
- SANDERS JA. Magnetic resonance spectroscopy. In: ORRISON WW, LEWINE JD, SANDERS JA, HARTSHORNE MF. **Functional Brain Imaging**. St Louis: Mosby, 1995, p. 419-467.

SCHURR A, MILLER JJ, PAYNE RS, RIGOR BM. An increase in lactate output by brain tissue serves to meet the energy needs of glutamate-activated neurons. **J. Neurosci**, 19: 34-35, 1999.

SENER RN. The glycine peak in brain diseases. **Comput Med Imag Graph**, 27 (4): 297-305, 2003.

SERLES W, LI LM, ANTEL SB *et al.* Time course of postoperative recovery of N-acetyl-aspartate in temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, 42(2): 190-197, 2001.

SHARIEF MK, THOMPSON EJ. The predictive value of intrathecal immunoglobulin synthesis and magnetic resonance imaging in acute isolated syndromes for subsequent development of multiple sclerosis. **Ann Neurol**, 29 (2): 147-51, 1991.

SIMMONS ML, FRONDOZA CG, COYLE JT. Immunocytochemical localization of N-acetyl-aspartate with monoclonal antibodies. **Neuroscience**, 45: 37-45.

SIMONE IL, FEDERICO F; TROJANO M *et al.* High resolution proton spectroscopy of cerebrospinal fluid in MS patients. Comparison with biochemical changes in demyelinating plaques. **J Neurol Sci**, 144: 182-90, 1996.

SMALL RT, THOMAS DG *et al.* Brain metabolites as ¹H NMR markers of neuronal and glial disorders. **NMR Biomed**, 2: 196-200, 1989.

SMITH ME, STONE LA, ALBERT PS *et al.* Clinical worsening in multiple sclerosis is associated with increased frequency and area of gadopentetate dimeglumine- enhancing magnetic resonance imaging lesions. **Ann Neurol**, 33 : 480-489, 1993.

SPISNI A. 1D spectrum analysis. In: CERTAINES, J.D.; BOVEE, W.M.M.J.; PODO, F. **Magnetic resonance spectroscopy in biology and medicine**. Oxford: Pergamon Press, 1992. p. 31-51.

STAUTGAITS SM, SHAPSHACK P, TOURTELOTTE WW, LEE MM, REIBER HO. Isoelectric focusing of unconcentrated cerebrospinal fluid: applications to ultrasensitive analysis of oligoclonal immunoglobulin G. **Electrophoresis**, 6: 287-291, 1985.

STONE LA, FRANK JA, ALBERT PS *et al.* The effect of interferon beta on blood-brain barrier disruptions demonstrated by contrast-enhanced magnetic resonance imaging in relapsing-remitting multiple sclerosis. **Ann Neurol**, 37: 611-619, 1995.

SUTTON LN, WANG Z, GUSNARDI D *et al.* Proton magnetic resonance spectroscopy of pediatric brain tumors. **Neurosurgery**, 31:195-201, 1992.

TASCH E, CENDES F, LI LM, ANDERMANN F, ARNOLD DL. Neuroimaging evidence of progressive neuronal loss and dysfunction in temporal lobe epilepsy. **Ann Neurol**, 45(5): 568-576, 1999.

THOMPSON AJ, KERMODE AG, WICKS D *et al.* Major differences in the dynamics of primary and secondary progressive multiple sclerosis. **Ann Neurol**, 29: 53-62, 1991.

THOMPSON AJ, KERMODE AG, MOSELEY IF; MAC MANUS DG, McDONALD WI. Seizures due to multiple sclerosis: seven patients with MRI correlations. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, 56: 1317- 1320, 1993.

THOMPSON EJ. Cerebrospinal fluid. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, 59: 350-357, 1995.

THORPE JW, KIDD D, MOSELEY IF *et al.* Spinal MRI in patients with suspected multiple sclerosis and negative brain MRI. **Brain**, 119: 709-714, 1996.

TINTORÉ M, ROVIRA A, RIO J *et al.* New diagnostic criteria for multiple sclerosis: application in first demyelinating episode. **Neurol**, 60: 27-30, 2003.

TOURTELLOTTE WW, STAUTGAITIS SM, WALSH MJ *et al.* The basis of intra-blood-brain-barrier IgG synthesis. **Ann Neurol**, 17: 21-27; 1985.

TRUYEN L, VAN WAESBERGHE JHTM, VAN WALDERVEEN MAA *et al.* Accumulation of hypointense lesion ("black holes") on T1 SE MRI in multiple sclerosis correlates with disease progression. **Neurol**, 47: 1469-1576, 1996.

UHLENBROCK D, SEIDEL D, GEHLEN W *et al.* MR imaging in multiple sclerosis; comparison with clinical, CSF and visual evoked potentials findings. **Am J Neuroradiol**. 9 (1): 59-67, 1988.

- URENJAK J, WILLIAMS SR, GADIAN DG, NOBLE M. Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy unambiguously identifies different neural cell types. **J Neurosci**, 13: 981-9, 1993.
- USENIUS JPR, KAUPPINEN RA, VAINIO PA *et al.* Quantitative metabolite patterns of human brain tumors: detection of ¹H NMR spectroscopy in vivo and in vitro. **J Comput Assist Tomogr**. 18 (5): 705-713, 1994.
- VAN DER KNAAP MS, ROOS B, VALK J. Uses of MR in inborn errors of metabolism. In: KUCHARCKZYK J, MOSELY M, BARKOVICH AJ. Magnetic resonance neuroimaging. Boca Raton, CRC Press, 1994 p. 245-318.
- VAN WAESBERGHE JH, KAMPHORST W, DE GROOT CJ *et al.* Axonal loss in multiple sclerosis lesions: magnetic resonance imaging insights into substrates of disability. **Ann Neurol** 46: 747- 754, 1999.
- VAN WALDERVEEN MA, BARKHOF F, HOMMES OR *et al.* Correlating MRI and clinical disease activity in multiple sclerosis: Relevance of hypointense lesions on short-TR/short-TE (T1-weighted) spin-echo images. **Neurol** 45: 1684-1690, 1995.
- VAN WALDERVEEN MA, LYCKLAMA A, NIJEHOLT GJ *et al.* Hypointense lesions on T1-weighted spin-echo magnetic resonance imaging: relation to clinical characteristics in subgroups of patients with multiple sclerosis. **Arch Neurol** 58 (1): 76-78, 2001.
- VOET D, VOET JG, In: Biochemistry. New York: John Wiley & Sons, 1989. p. 1160.
- WANG HI, MATSUI M, SAIDA T. Immunological disturbances in the central nervous system linked to MRI findings in multiple sclerosis. **J Neuroimmunol**. 125 (1-2): 49-54, 2002.
- WEINER HL. Multiple sclerosis is an inflammatory T-cell-mediated autoimmune disease. **Arch Neurol**, 61: 1613, 2004.
- ZOULA S, HERIGAULT G, ZIEGLER A *et al.* Correlation between the occurrence of ¹H-MRS lipid signal, necrosis and lipid droplets during C6 rat glioma development. **NMR Biomed**, 16(4): 199-212, 2003.

8- ANEXOS

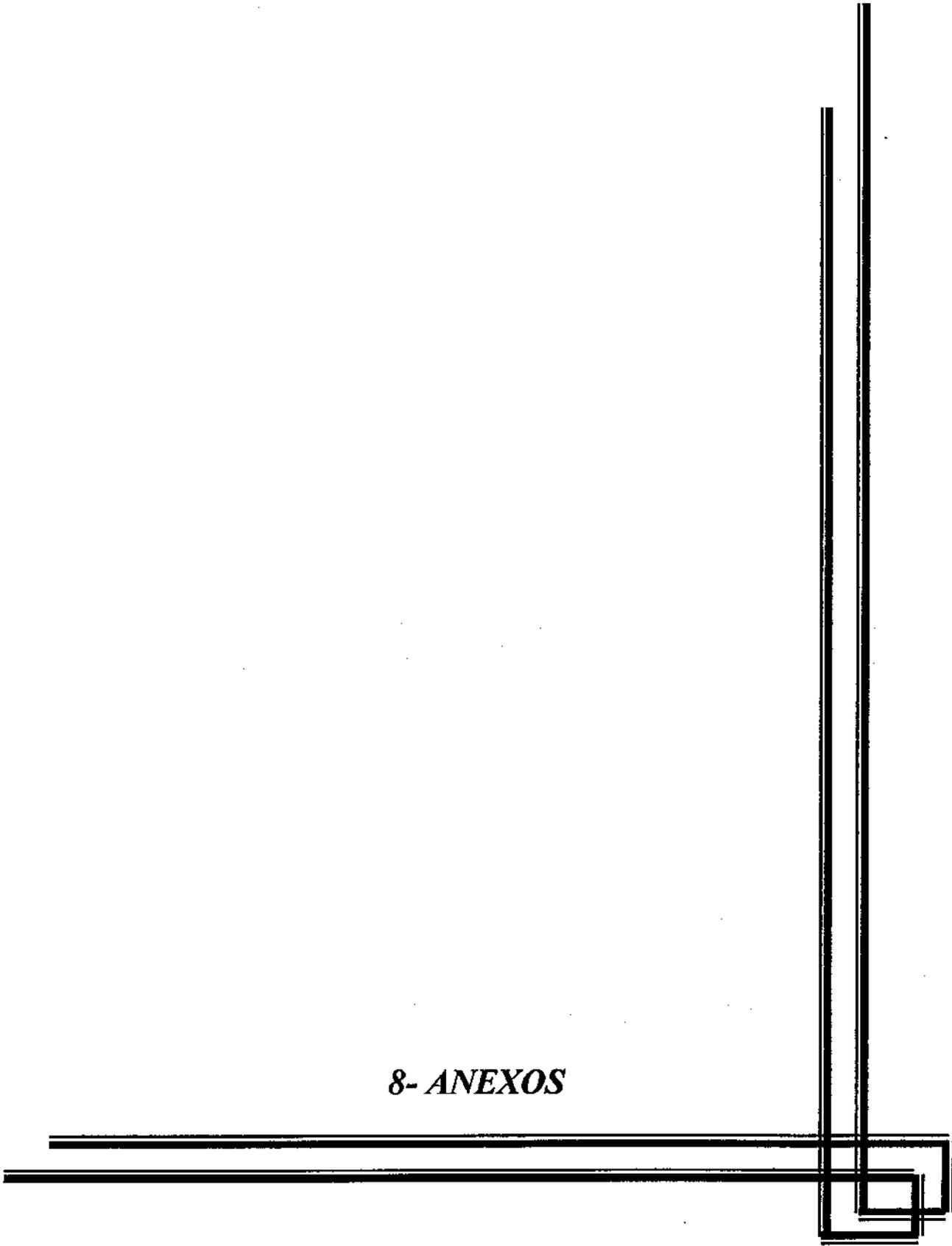


Tabela 1: Pacientes e Controles – Dados clínicos e laboratoriais

HC	SEXO	LINICIO	D.D.	I. IgG	FC	RM GD+	B.OLIGOCLO
EMC1	F	39	6	1,03	RR	sim (1)	sim
EMC2	F	23	1	0,56	RR	sim (1)	sim
EMS1	F	33	7	0,58	RR	não	sim
EMC3	F	22	2	1,2	RR	sim (1)	sim
EMS2	F	27	15	0,53	RR	não	sim
EMS3	F	37	6	0,6	RR	não	sim
EMC4	F	31	1	1,9	RR	sim (1)	sim
EMC5	M	28	7	0,9	RR	sim (3)	sim
EMS4	F	32	3	1,1	RR	não	sim
EMC6	M	40	10	1,49	PS	sim (2)	sim
EMC7	F	26	3	1,46	PP	sim (1)	sim
EMC8	F	16	7	0,89	RR	sim (1)	sim
EMC9	M	35	7	0,4	PS	sim (1)	sim
EMC10	F	32	3	1,32	RR	sim (3)	sim
EMC11	M	25	5	0,98	RR	sim (1)	sim
EMC12	M	35	2	1,05	PS	sim (1)	sim
EMC13	M	36	2	1,3	RR	sim (3)	sim
EMC14	F	22	1	1,1	RR	sim (1)	sim
EMS5	M	26	9	0,67	RR	não	sim
EMS6	F	26	6	0,82	RR	não	sim
EMS7	M	35	8	0,74	RR	não	sim
EMS8	F	39	15	0,5	RR	não	sim
EMS9	F	32	3	0,5	RR	não	sim
EMS10	M	34	15	0,97	RR	não	sim
CT1	M	32	RM NL LCR NL				
CT2	M	22	SD MENINGORRADICULAR RM NL				
CT3	F	70	POLINEUR SENS MOT LCR NL				
CT4	M	25	POLINEUR SENS MOT LCR NL				
CT5	M	40	POLINEUR SENS MOT LCR NL				
CT6	F	34	CEF 3 MESES. CT E RM NL				
CT7	F	40	CEF 5 MESES. CT E RM NL				
CT8	M	56	CEF 4 MESES, RM NL				
CT9	F	37	POLINEUR SENS MOT LCR NL				
CT10	M	35	POLINEUR SENS MOT LCR NL				
CT11	M	32	SD MEDULAR A ESCLARECER, RM E LCR NL				

LINICIO: idade de início; D.D.: duração da doença; I.IgG: índice de IgG; RM GD+: lesão com realce pelo gadolínio e pelo gadolínio; B.OLIGOCLO: bandas oligoclonais; RM: ressonância magnética; RR: forma remitente-recorrente; PS: forma progressiva secundária; PP: forma progressiva primária; LCR NL: líquido normal; CEF: cefaléia; FC: forma clínica.

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA

Título do projeto: Neuroimagem e características liquóricas (à espectroscopia “*in vitro*” do líquido) na esclerose múltipla (EM)

Investigador principal: Dr. Fabiano Reis

Eu entendo que fui convidado(a) a participar de um projeto de pesquisa envolvendo pacientes com Esclerose Múltipla (EM). O objetivo geral desse estudo é avaliar características de neuroimagem à ressonância magnética (RM) e características do líquido (LCR) à espectroscopia “*in vitro*” em aparelho de RM de alto campo. Esses estudos poderão caracterizar padrões de líquido que podem diferenciar subtipos de EM e fornecerem preditores da evolução clínica da doença da qual sou portador(a). O sigilo será mantido em todos os estudos colaborativos através de um código para identificação dos indivíduos participantes.

Procedimento:

Eu entendo que se concordar em participar deste estudo, os pesquisadores farão perguntas a respeito de meus antecedentes médicos. Serei submetido a uma coleta de líquido, se por questões de necessidade do ponto de vista clínico for necessário, e, uma amostra de 2 ml do material colhido será utilizada para espectroscopia do líquido. Além disso, serei submetido a um exame de RM. Hospitalização, para fins exclusivos desta pesquisa, não será necessária.

O procedimento de RM é semelhante a uma tomografia. Eu fui informado que eu serei colocado em uma maca e serei movido lentamente para dentro do aparelho de RM. Um alto falante dentro do campo magnético possibilita a minha constante comunicação com as pessoas responsáveis pelo exame. Durante todo o procedimento o pessoal médico e

paramédico pode me ver e ouvir, e eu posso ser removido(a) se for preciso. O procedimento pode durar entre 45 a 90 minutos. Durante a primeira parte do exame eu irei ouvir ruídos, tipo marteladas, por alguns minutos enquanto o aparelho faz as imagens do meu cérebro. O restante do exame será relativamente silencioso.

Vantagens:

Eu entendo que não obterei nenhuma vantagem direta com minha participação neste estudo e que o meu diagnóstico e o meu tratamento provavelmente não serão modificados. Contudo, os resultados desse estudo podem, a longo prazo, oferecer vantagens para os pacientes com EM. Os resultados de meu exame de RM e dos dados obtidos com o estudo da espectroscopia do LCR ficarão à disposição dos médicos responsáveis pelo meu tratamento, e poderão ser úteis no futuro.

Risco e desconforto:

O desconforto relacionado ao exame de RM é devido ao ruído intermitente durante os primeiros quinze minutos. Depois disso o ruído será muito menor. O pessoal técnico providenciará tapa-ouvidos para me deixar mais confortável.

Uma das principais vantagens da RM é que esta não utiliza raios X ou outro tipo de radiação ionizante, ao contrário de outros tipos de estudo radiológico. As imagens são obtidas devido a um campo magnético, um transmissor e receptor de ondas de rádio e um computador que é utilizado para obter as informações bioquímicas e imagens de anatomia interna. Não existem efeitos nocivos associados com a RM dentro das condições utilizadas atualmente.

A punção do LCR será feita por indicação clínica (e não para fins exclusivos para este protocolo de pesquisa). Entretanto, se for feita a coleta de LCR, sei que uma pequena parte da amostra obtida será destinada para avaliação por espectroscopia de alto campo.

Requerimentos:

É muito importante informar aos técnicos e médicos caso eu tenha um marcapasso cardíaco, um clipe de cirurgia para aneurisma cerebral ou qualquer outro objeto metálico em meu corpo, que tenha sido implantado em meu corpo durante uma cirurgia ou alojado em meu corpo durante um acidente, pois estes podem parar de funcionar ou causar acidentes devido ao forte campo magnético utilizado. Eu também devo remover todos os objetos metálicos que estiverem comigo (relógios, canetas, brincos, colares, anéis, etc.), pois estes também podem aquecer ou movimentar dentro do campo magnético.

Sigilo:

Eu entendo que todas as informações médicas decorrentes desse projeto de pesquisa farão parte de meu prontuário médico e serão submetidas aos regulamentos do HC-Unicamp referentes ao sigilo de informação médica. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado.

Fornecimento de informação adicional:

Eu entendo que posso requisitar informações adicionais relativas ao estudo a qualquer momento. O Dr. Fabiano Reis, tel (019) 97459017 e 37888217, estará disponível para responder minhas questões e preocupações. Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações, contatar a secretaria da Comissão de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, tel (019) 37888936.

Recusa ou descontinuação da participação

Eu entendo que a minha participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar ou retirar meu consentimento e interromper a minha participação no estudo a qualquer momento sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no futuro no HC-UNICAMP.

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA

Título do projeto: Neuroimagem e características líquóricas (à espectroscopia “*in vitro*” do líquido) na esclerose múltipla (EM)

Investigador principal: Dr Fabiano Reis

Eu confirmo que o(a) Dr(a) _____ me explicou o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido e os riscos, desconfortos e possíveis vantagens advindas desse projeto de pesquisa. Eu li e compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar desse estudo.

Nome do participante ou responsável

Assinatura do participante ou responsável

Data

Nome da testemunha

Assinatura da testemunha

Data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR

Eu expliquei a _____ o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Nome do pesquisador ou associado

Assinatura do pesquisador ou associado