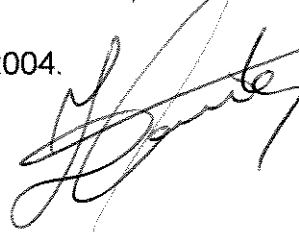


ANDRÉIA VASCONCELLOS FARIA

***ESTUDO DA BIOQUÍMICA DOS TUMORES DE SISTEMA
NERVOSO CENTRAL ATRAVÉS DA ESPECTROSCOPIA DE
HIDROGÊNIO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA***

Este exemplar corresponde à versão final
da Tese de Doutorado apresentada ao
Curso de Pós-Graduação Fisiopatologia
Médica da Faculdade de Ciências Médicas
da UNICAMP, para obtenção do título de
Doutor em Fisiopatologia Médica, Área
Neurociências
Campinas, 18 de maio de 2004.

Prof. Dr. Fernando Cendes
Orientador



CAMPINAS

2004

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

ANDRÉIA VASCONCELLOS FARIA

***ESTUDO DA BIOQUÍMICA DOS TUMORES DE SISTEMA
NERVOSO CENTRAL ATRAVÉS DA ESPECTROSCOPIA DE
HIDROGÊNIO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA***

*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 Neurociências*

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Cendes

CAMPINAS

2004

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	TUNICAMP
	F225e
V	EX
TOMBO BC/	59219
PROC.	16-117-04
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	28/07/04
Nº CPD	

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

CM00200738-8

BIB ID 317957

F225e Faria, Andréia Vasconcellos
Estudo da bioquímica dos tumores de sistema nervoso central através da espectroscopia de hidrogênio por ressonância magnética. / Andréia Vasconcellos Faria. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

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

1. Cérebro. 2. Neoplasias. 3. Radiologia. I. Fernando Cendes.
II. . Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora de Dissertação de Doutorado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a).

Fernando Cendes

Membros:

1. Fernando Cendes

2. Anita Jocelyne Marsaiolli

3. Cláudia Costa Leite

4. Guilherme Carvalho Ribas

5. Li Li Min

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 18.05.2004

DEDICATÓRIA

*A meus pais, Maria José e Rui, por seu incentivo,
por todas as suas abdições em meu favor e por
seu amor incondicional.*

Minha gratidão eterna, por tudo que sou.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fernando Cendes pelo bom senso, clareza e solidez com que conduziu este trabalho.

Ao amigo Fernando César Macedo Júnior a quem, não só agradeço, mas com quem divido este trabalho. Estou certa de que os maiores frutos deste estudo, além dos resultados que obtivemos ou o amadurecimento profissional que conquistamos juntos, foram sua amizade e estima; sinceros, profundos e duradouros.

À Profa. Dra. Anita Marssaioli, por suas imensas contribuições profissionais e pessoais. Seu exemplo de integridade e determinação e seu espírito entusiasta e inventivo marcaram não só este trabalho, mas estarão comigo daqui a diante.

Ao Dr. Marlon Martins dos Reis pelo auxílio único e imprescindível na análise dos resultados.

A toda equipe de Neurocirurgia do Hospital das Clínicas da UNICAMP, em especial aos doutores Antônio Guilherme Borges Neto, Donizeti César Honorato e Américo Marcone Cabral de Lira, assim como a todos os médicos residentes, pelo acesso às amostras durante a cirurgia, sempre com presteza e boa vontade.

Ao Prof. Dr. Luciano de Souza Queiroz pela disponibilidade e eficiência na análise histopatológica dos fragmentos.

Ao Prof. Dr. Fred Fujiwara e ao Luís Fernando Carvalho de Menezes pelas discussões técnicas, imprescindíveis na obtenção e interpretação dos resultados.

A todos os amigos da Ressonância Magnética do Hospital das Clínicas, em especial à Profa. Dra. Verônica Araújo Zanardi e à Cristina Ferrari, pelo incentivo e disponibilidade em ajudar.

A todos os colegas do laboratório de Química Orgânica da UNICAMP pelo companheirismo e solicitude.

	<i>Pág.</i>
RESUMO	<i>xix</i>
ABSTRACT	<i>xxiii</i>
INTRODUÇÃO	27
REVISÃO DA LITERATURA	31
OBJETIVOS	49
CASUÍSTICA E MÉTODOS	53
Aspectos éticos.....	55
Identificação do grupo de estudo.....	55
Estudo <i>in vitro</i>	55
Estudo <i>in vivo</i>	57
RESULTADOS	61
Estudo <i>in vitro</i>	63
Estudo <i>in vivo</i>	69
DISCUSSÃO	75
CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
ANEXOS	109
Anexo 1.....	111
Anexo 2.....	129
Anexo 3.....	137

LISTA DE ABREVIATURAS

Col	colina
Cre	creatina
ERM ¹H	Espectroscopia de Hidrogênio por Ressonância Magnética
Gl	glicina
Lac	lactato
Lip	lipídeos
MI	mio-inositol
NAA	<i>N</i> -acetil aspartato
RM	Ressonância Magnética
SNC	Sistema Nervoso Central
TE	Tempo de eco

	Pág.
Tabela 1 - Distribuição das amostras estudadas através de ERM ^1H <i>in vitro</i> segundo diagnóstico histológico e localização.....	63
Tabela 2 - Distribuição dos pacientes estudados através de ERM ^1H <i>in vivo</i> segundo diagnóstico histológico do tumor e sua localização.....	69
Tabela 3 - Resultado do teste ANOVA com múltiplas variáveis (MANOVA), incluindo os grupos tumorais (astrocitomas pilocíticos, glioblastomas, meningiomas) e controles normais, em relação às suas quantidades de glicina/mio-inositol, creatina, colina, NAA, lactato e lipídeos, normalizados pelo valor resultante da soma destes picos.....	71
Tabela 4 - Resultado da análise discriminatória de múltiplas variáveis, incluindo os grupos tumorais numericamente mais significativos e os controles normais. Os valores representam o número de casos classificados em cada um dos grupos, exceto pela última coluna, onde estão expostas as porcentagens de classificação correta: “acerto” do método.....	72

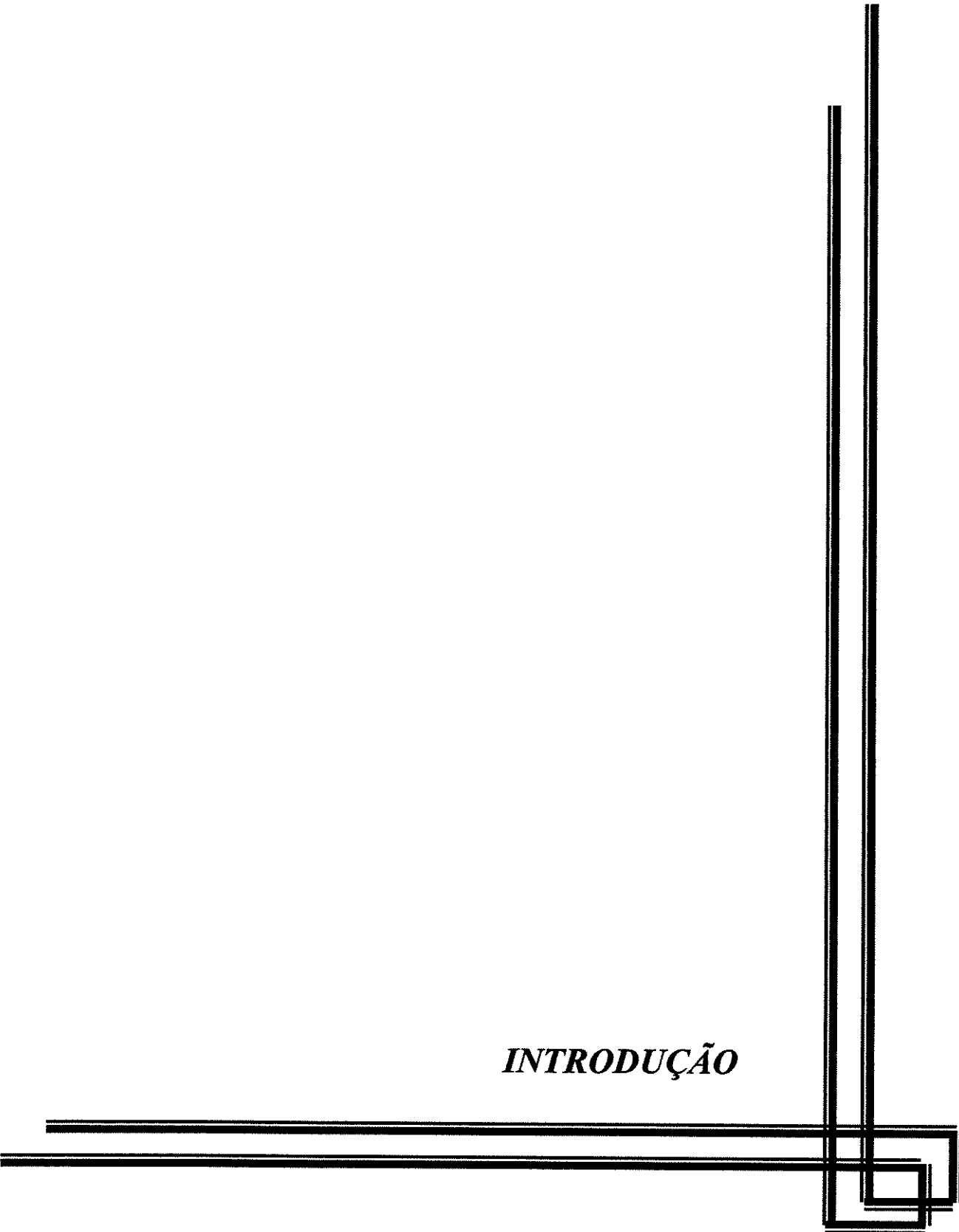
	<i>Pág.</i>
Figura 1 - ERM ^1H <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	35
Figura 2 - Modelo esquemático do metabolismo do NAA.....	39
Figura 3 - Obtenção da ERM ^1H <i>in vivo</i>	58
Figura 4 - Análise discriminatória dos espectros de tumores <i>in vitro</i>	65
Figura 5 - Comparação entre espectros <i>in vitro</i> (faixa entre 3.5 e 3.6 ppm).....	66
Figura 6 - Comparação entre espectros <i>in vitro</i> , incluindo metástases.....	67
Figura 7 - Análise discriminatória dos espectros <i>in vitro</i> , incluindo controles.....	68
Figura 8 - Resultado do teste ANOVA, comparando os espectros <i>in vivo</i>	70
Figura 9 - Exemplos de ERM ^1H <i>in vivo</i>	73

RESUMO

A espectroscopia de hidrogênio por ressonância magnética (ERM ^1H) clínica, *in vivo*, é um método não invasivo e uma eficiente ferramenta diagnóstica. A ERM ^1H *in vitro*, realizada em altos campos magnéticos, pode ser usada no estudo de cadeias metabólicas alteradas que caracterizam diferentes patologias do sistema nervoso central, como os tumores, fornecendo, em alguns casos, indícios sobre o tipo histológico específico. Analisamos amostras de tecido tumoral de pacientes portadores de neoplasias do sistema nervoso central através de ERM ^1H clínica ($B_0 = 2\text{ T}$) e em alto campo ($B_0 = 11,7\text{ T}$). A análise discriminatória parcial da ERM ^1H *in vitro* revelou que glicina e mio-inositol são os principais metabólitos responsáveis pela diferenciação de tumores neurogliais de acordo com seu grau de agressividade e que as metástases têm taxas muito baixas de mio-inositol. Na ERM ^1H *in vivo* outros compostos como creatina, *N*-acetil aspartato, colina e lactato diferenciaram os tumores dos controles normais em todos os pacientes, em concordância com os resultados *in vitro*. A classificação do tipo histológico pela análise *in vivo* da ERM ^1H ocorreu em 82% das vezes, variando de 50% de acerto (nos glioblastomas) até 100% (nos meduloblastomas). Estes resultados contribuem para a melhor compreensão da biologia dos tumores cerebrais, refletindo destruição e substituição do tecido normal e anormalidades metabólicas que podem estar relacionadas ao rápido “turnover”, indiferenciação, habilidade em sobreviver em meios adversos (hipóxia e estresse osmótico e hiper-osmolar) e resistência a apoptose da célula tumoral. A melhor caracterização pela ERM ^1H *in vitro* de substâncias específicas presentes nos diversos subtipos histológicos pode ser relevante para otimização dos protocolos de ERM ^1H *in vivo*.

ABSTRACT

Proton magnetic resonance spectroscopy (^1H MRS) *in vivo* is a noninvasive method and represents a powerful tool in tumor diagnosis. High field ^1H MRS *in vitro* can be used to study metabolic changes and pathways that characterize distinct pathologies, including brain tumors. We analyzed brain tissue samples from patients with different types of brain tumors by clinical ($B_0 = 2\text{T}$) and high field ($B_0 = 11,7\text{T}$) ^1H MRS. Partial Least Square Discriminant Analysis at high field ^1H MRS revealed glycine and mio-inositol as the main metabolites that allowed differentiation according to degree of aggressiveness in neuroglial tumors and metastasis showed very low signal intensities of mio-inositol. Other compounds, including creatine, *N*-acetyl aspartate, choline and lactate, differentiated tumor from normal tissue in all patients *in vivo*, in agreement with *in vitro* results. *In vivo* ^1H MRS allowed the classification of tumor according to the histological type in 82% of the patients. The positive correlation varied from 50% (in glioblastomas) to 100% (in medulloblastomas). These results contribute to the better understanding of the biology of brain tumors. Our findings reflect the destruction of normal tissue and metabolic abnormalities in tumor cells that can be related with their high turnover, dedifferentiation, ability to survive in adverse environments (hypoxia, osmotic and metabolic stress) and resistance for apoptosis. Further characterization of individual metabolites by ^1H -MRS *in vitro* related to specific histological subtypes of brain tumors might be relevant for optimizing *in vivo* ^1H -MRS protocols.



INTRODUÇÃO

Em 2002, cerca de 400 mil novos casos de câncer foram registrados no Brasil e quase 130 mil brasileiros morreram em razão da doença. O câncer foi a segunda causa de morte em frequência, representando 13,2% de todos os óbitos do país, perdendo apenas para as doenças cardio-vasculares. Entre 1979 e 2002, as taxas ajustadas de mortalidade dos oito principais tipos de câncer no país mantiveram-se estáveis ou aumentaram [PIVETA, 2004].

Muito deste aumento, porém, é decorrente da detecção mais eficiente da doença através de métodos diagnósticos precisos e não invasivos, como a ressonância magnética (RM). Graças a isto, as neoplasias têm sido detectadas em fases mais precoces e o aumento da sobrevida dos pacientes é um estímulo para a melhor compreensão e controle da doença.

No momento do diagnóstico da neoplasia, podemos considerar duas contribuições imprescindíveis da RM. A primeira é, sem dúvida, a maior conquista do método: a detecção da lesão e sua definição anatômica precisa. A segunda é o que, em maior ou menor grau de especificidade, buscam todos os métodos de análise diagnóstica não invasivos: a definição diagnóstica da lesão.

A utilização da espectroscopia de hidrogênio por ressonância magnética (ERM ^1H) no estudo da composição bioquímica do tecido cerebral normal e dos tumores do SNC representa um imenso campo a ser desenvolvido.

Assim, este trabalho foi realizado buscando a definição de aspectos ainda relativamente pouco explorados através da ERM ^1H , até mesmo por suas aplicações na prática médica serem relativamente recentes: os padrões bioquímicos capazes de diferenciar o tecido normal do tumoral e aqueles capazes de classificar os tumores em grupos com significado clínico e histológico. Utilizando a ERM ^1H *in vivo* buscamos a melhor aproximação possível do processo bioquímico dinâmico cerebral e com a ERM ^1H *in vitro* buscamos definir com maior precisão a composição química do tecido.

Duas perspectivas puderam ser vislumbradas: a primeira é a aplicação direta dos dados ao diagnóstico e manejo clínico dos pacientes e a segunda, mais indireta, porém talvez ainda mais promissora para o uso desta técnica, é a contribuição para o estabelecimento das vias bioquímicas que possam estar envolvidas no surgimento, crescimento e manutenção dos tumores de SNC.

*REVISÃO DA
LITERATURA*

A ERM ^1H é um método não invasivo muito promissor do estudo da bioquímica cerebral. Associada à análise da imagem, mostra-se ferramenta útil no seguimento, prognóstico e diagnóstico diferencial dos tumores do SNC.

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 radio-frequência, 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].

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 [NAFE, 2003]. Fornece, portanto, informações mais ricas que a ERM ^1H *in vivo* melhorando a resolução de picos clinicamente indistinguíveis da linha de base e evitando a sobreposição de sinais.

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 mio-inositol, o glutamato, a glutamina e a glicina [CASTILLO et al., 1996] (Figura 1). A importância das alterações dos níveis de cada uma destas substâncias pode ser compreendida através do conhecimento de seu papel no metabolismo cerebral.

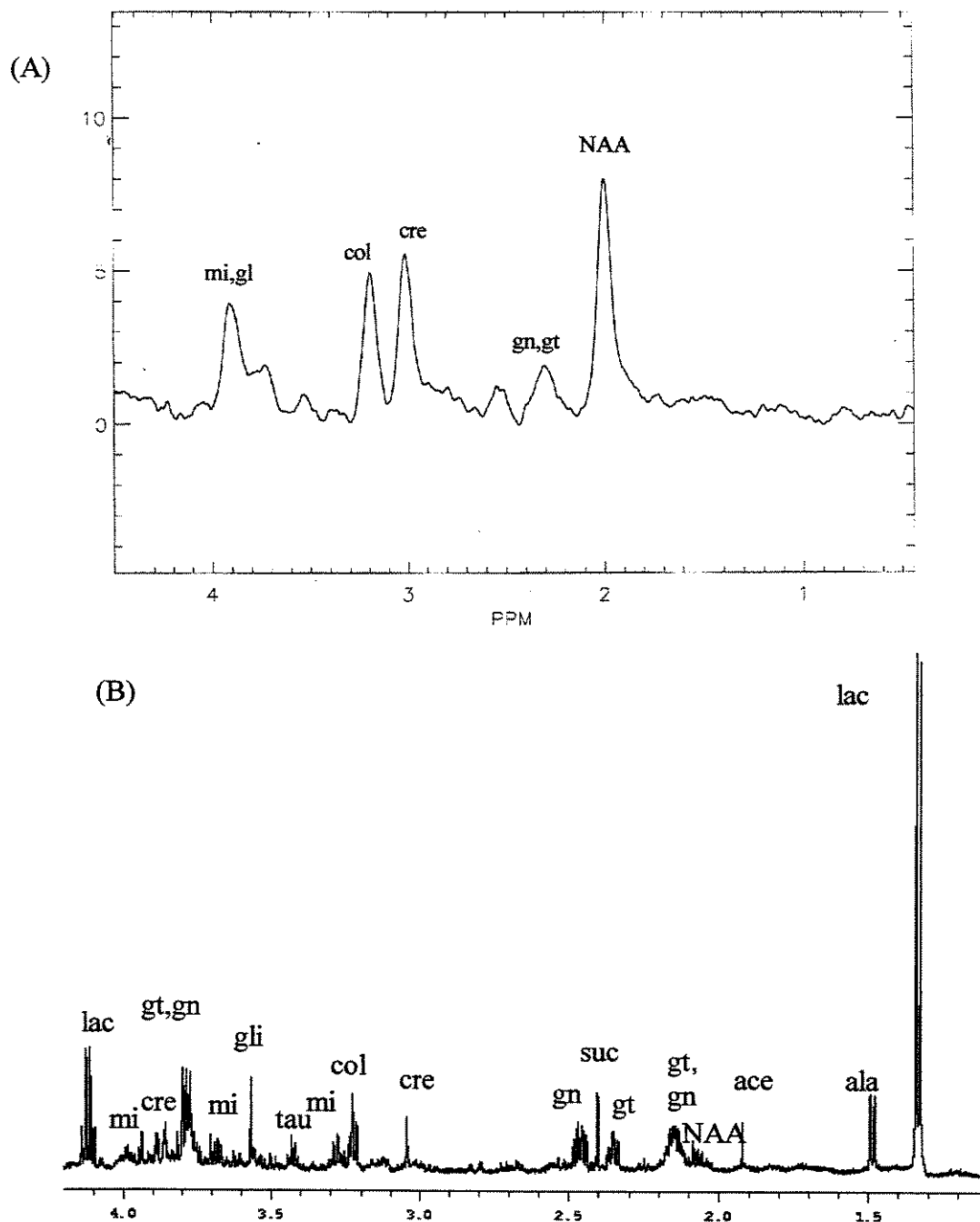


Figura 1 - (A) Padrão espectral típico de um controle normal *in vivo* (2T) e (B) de um tumor cerebral *in vitro* (11,7T). Estão identificados os picos de mio-inositol (mi), glicina (gl), colina (col), creatina (cre), glutamina (gn), glutamato (gt), *N*-acetil aspartato (NAA), taurina (tau), succinato (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, aliás, 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 [PETERS, 1991]. As células da glia e seus grandes 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.

O conhecimento do papel que cada um dos metabólitos detectados pela ERM ^1H desempenha no metabolismo celular normal e tumoral é de suma importância na análise clínica do exame e no entendimento das informações sobre o micro-ambiente em que os tumores se perpetuam.

Lactato

A taxa de utilização basal de glicose é maior nos astrócitos que nos neurônios [MAISTRETTI et al., 1999] 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, como provam estudos de culturas celulares [SCHURR et al., 1999].

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 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 invertido (abaixo da linha de base). Um segundo pico ocorre em 4.1 ppm, podendo estar muito próximo ao pico suprimido da água, e subespresso 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 mMol/L, dependendo do estágio de ativação do tecido cerebral normal [MERBOLDT, 1992].

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 freqüente 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]. Além disso, a contribuição do lactato proveniente de distúrbios isquêmicos da micro-circulação, causados pelo edema e efeito de massa dos tumores, impede relações diretas entre acúmulo de lactato e malignidade tumoral. Apesar destas limitações, o lactato é indicador indireto da agressividade tumoral já que pode refletir necrose [BENDSZUZ et al., 2001].

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 do glutamato.

As concentrações de glutamato são de 8,1mMol/Kg na substância branca, 12,5 mMol/Kg na cinzenta e 9,5 mMol/Kg no cerebelo [MICHAELIS et al., 1993]. As concentrações *in vitro* variam de 6 a 10,2 mMol/Kg [PETROFF et al., 1989], 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 e representados por um pico único, *in vivo*, entre 2,1 e 2,5 ppm.

Em situações hiper-metabólicas, como nos tumores e focos epilépticos, é observado aumento dos níveis de glutamato e diminuição do GABA [PETROFF et al., 1993].

N-acetil aspartato

O NAA é tido como marcador neuronal [SERLES et al., 2001]. 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-compartimental [BASLOW, 2003] (Figura 2). Suas funções biológicas ainda não são totalmente conhecidas. Sugere-se, entretanto, que seja doador de grupos acetil para a síntese lipídica,

particularmente durante o período de desenvolvimento da mielinização dos neurônios [DANAMO et al., 1968], que tenha papel na síntese de neuropeptídeos [REICHELT e KVAMME, 1973] ou ainda que sirva como ânion orgânico nos neurônios [MACINTOSH e COOPER, 1965].

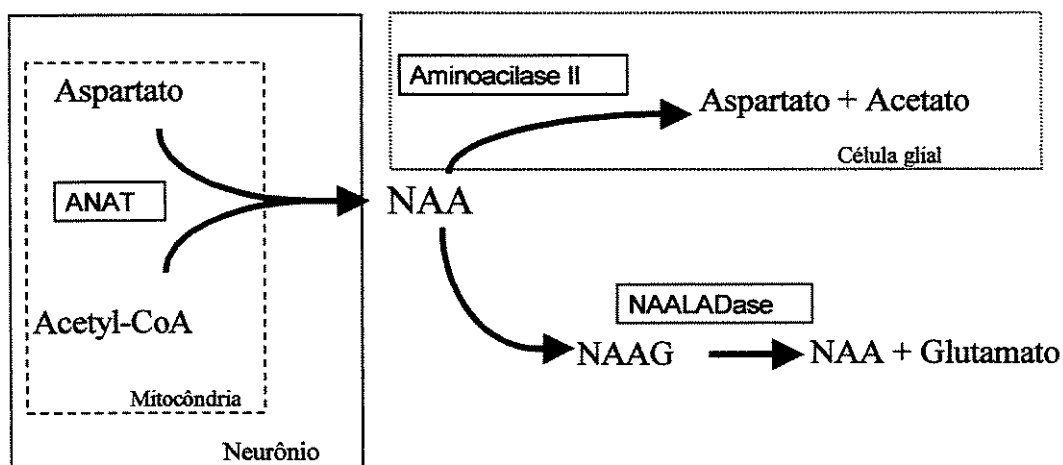


Figura 2 - Modelo esquemático do metabolismo inter-compartimental do NAA. ANAT: aspartato *N*-acetiltransferase, NAAG: *N*-acetil-aspartil-glutamato, NAALADase: dipeptidase ácida α -ligada *N*-acetilada.

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 hemato-encefálica. *In vivo*, sua concentração está por volta de 11,4 mMol/Kg, com pouca variabilidade regional [MICHAELIS et al., 1993]. *In vitro*, a concentração é relativamente menor devido ao tempo entre a coleta do material e seu congelamento e também ao fato de que alguns grupos *N*-acetil que contribuem para o pico do NAA *in vivo* não são extraídos pelo ácido perclórico [GILL et al., 1990].

Sua concentração diminui em diferentes tipos de insulto cerebral [TASCH et al., 1999; DUZEL, 2004]. Um dos aspectos mais marcantes nos tumores é a queda da amplitude do pico de NAA [USENIUS et al., 1994; HENRIKSEN, 1995; GIRARD et al., 1998; LAW et al., 2003; RIJPKEMA et al., 2003; LI et al., 2004],

refletindo a perda ou disfunção neuronal das regiões acometidas. Em estudos com modelos de tumores em ratos, a queda dos níveis de NAA é a primeira alteração que se observa após o implante tumoral (terceiro dia) [GILL et al., 1994]. Nos tumores de origem neuronal e mista (neuroglial), baixos picos de NAA podem indicar não necessariamente a perda neuronal, mas que os neurônios tumorais não são maduros o bastante para produzi-lo em quantidades normais [MOLLER-HARTMANN et al., 2002]. Nos tumores de origem não-neuroectodérmica, o NAA está ausente, provavelmente pela ausência de neurônios [HOWE et al., 2003].

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 [CENDES et al., 1997 (a); 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].

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 mMol/Kg) [PEELING e SUTHERLAND, 1989].

Aminoácidos como a alanina e o aspartato, sintetizados a partir da glicose e, menos ativamente, da glutamina (de onde derivam outros como o piruvato e intermediários do ciclo tri-carboxílico) estão aumentados em gliomas, meningiomas e adenomas [KINOSHITA et al., 1994]. Além disso, sua concentração é três vezes maior em células meníngeas que nos neurônios, o que deve ser a causa de seu aumento nos meningiomas [URENJAK et al., 1993].

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 mMol/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 mio-inositol, 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, coreia de Huntington, migrânea, Parkinson e doença de Alzheimer, possivelmente refletindo lesão excitatória [SENER, 2003].

A oligodendroglia 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 mMol/Kg *in vitro* e produz um pequeno sinal *in vivo* por ter grupos metila ligados ao nitrogênio e ao enxofre [MICHAELIS et al., 1993]. Grandes quantidades de taurina são detectadas na retina. A similaridade entre o meduloblastoma e retinoblastoma pode explicar o fato de estar aumentada nestes dois tumores [KINOSHITA et al., 1994]. Outras neoplasias mostram aumento de taurina, como tumores de rim e cólon [WILKE et al., 2001].

Creatina

A quantidade de ATP no citoplasma depende do equilíbrio químico da reação $\text{PCr (fosfocreatina)} + \text{ADP} + \text{H} = \text{ATP} + \text{Cr (creatina)}$. 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 constantes [HENRIKSEN et al., 1992]. 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 [WYSS et al., 2000], podendo haver, portanto, alterações de seus níveis nas mudanças drásticas de estado energético celular.

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 mMol/Kg na substância branca a 8,2 mMol/Kg na substância cinzenta e 9,1 mMol/Kg no cerebelo [MICHAELIS et al., 1993].

A creatina total pode ser importante preditivo da atividade tumoral [TZIKA et al., 1996] já que indica o estado de energia da célula. Na lesão por radiação, o pico de creatina cai provavelmente devido à exaustão de suas reservas por isquemia e rápida atividade celular [PREUL et al., 1998]. Portanto, a quantidade de creatina em tumores e após radioterapia é variável, não podendo ser usada como referência interna constante entre os casos.

Colina

Mais um exemplo da especialização do metabolismo celular é a produção da mielina pela oligodendroglia. 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. Como constituinte de membrana, o aumento de colina reflete sua síntese e/ou aumento do número de células [GRANATA et al., 2000]. Suas concentrações, *in vivo*, são de 1,4 mmol/Kg na substância cinzenta, 1,8 mMol/Kg na substância branca, 2,5 mMol/Kg no cerebelo e 2,9 mMol/Kg na ponte. *In vitro*, as concentrações são semelhantes, por volta de 1,8 mMol/Kg [PETROFF et al., 1989].

A colina está aumentada na maioria das neoplasias sólidas do SNC e já foi relatada diminuição de seus níveis em resposta ao tratamento, antes mesmo que houvesse modificação no padrão de imagem de RM do tumor [FULHAN et al., 1992]. Está diminuída nas lesões de radionecrose [HEESTERS et al., 1998], exceto na fase aguda, sendo elemento útil para diagnóstico diferencial com recidiva tumoral. Aumento da colina não é visto em processos que não têm remielinização como infartos antigos e situações onde não há reconstrução de membranas lesadas, como por exemplo, na doença de Canavan [GO et al., 1995].

Assim, em processos francamente necróticos, há redução ou desaparecimento deste pico (assim como de todos os outros), daí a dificuldade de alguns estudos, que incluem áreas necróticas, em separar os tumores por grau de agressividade tumoral através do pico de colina [KUGEL et al., 1992].

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 [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 em neoplasias nos casos de alta agressividade, como nas metástases e linfomas [JAYASUNDAR et al., 1995].

Mio-Inositol

Substâncias de comunicação bioquímica são importante presença no tecido cerebral, como o mio-inositol (ou *D*-inositol), metabólito envolvido em neurorecepção sensível a hormônios [CEODAN et al., 1985] e possível precursor do ácido glucurônico, composto de conjugação para depuração de substâncias xenobióticas, ou seja, aquelas a que os tecidos estão expostos, mas não têm função biológica conhecida [VAN DER KNAAP et al., 1994]. O pico de mio-inositol ocorre em 3,56 ppm e, como já foi descrito, sobrepõe-se ao pico de glicina dependendo do TE utilizado na ERM ^1H *in vivo*. Suas concentrações variam de 4,7 mMol/kg na substância branca a 6,8 mMol/Kg no cerebelo, *in vivo* e 5,8 a 7 mMol/Kg, *in vitro* [PETROFF et al., 1989].

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 mio-inositol é um importante marcador de células gliais [NICKAS et al., 1996].

Com o estudo conjunto dessas substâncias, foi possível estabelecer alguns padrões espectrais de grande valor clínico, não só para o diagnóstico dos tumores como para diferenciá-los de outras lesões do SNC que podem simulá-los clinicamente e nas imagens de RM (lesões pseudotumorais) (ANEXO 1). A ERM ^1H , apesar de, isoladamente, não definir a etiologia do processo, é capaz de traçar seu perfil metabólico, auxiliando imensamente no diagnóstico [GAJEWICZ et al., 2003] (ANEXO 2). Além disso, a comparação entre o padrão espectroscópico de neoplasias ao de outras patologias do SNC dá idéia dos aspectos em que as vias metabólicas tumorais diferem das alterações presentes em outras doenças.

Assim, relatamos o padrão mais típico de ERM ^1H em patologias que, clinicamente ou radiologicamente, mais freqüentemente simulam tumores.

ERM ^1H no diagnóstico diferencial dos tumores do SNC

Os abscessos bacterianos podem ser confundidos com glioblastomas multiformes com extensa necrose. Entretanto, os picos de acetato e succinato constituem marcadores de abscessos bacterianos, não sendo detectados em tumores. O multiplete de aminoácidos - constituído por valina, leucina e isoleucina - é indicativo de abscesso. É provável que esses aminoácidos sejam derivados da atividade extracelular de proteases secretadas por microorganismos ou que sejam produtos de enzimas proteolíticas após fagocitose e autólise mediada por polimorfonucleados [GRAND et al., 1993]. A taurina também está presente em concentrações anormalmente altas nos abscessos e, dependendo do germe causador, pode haver predomínio de lactato (como em casos de infecção por *Streptococcus* sp.) ou acetato e butionina (como nos casos de *Fusobacterium* sp.) [MARTINEZ-PEREZ et al., 1997]. Abscessos de outra natureza, como por exemplo, os tuberculosos, não demonstram essa característica [GRUPTA et al., 2001]. Além disso, no material necrótico não são evidenciados os picos característicos do tecido neural (como NAA, colina e creatina).

Também a cisticercose, em casos de lesão intraparenquimatosa e única, pode simular tumor encefálico. Porém, além dos mesmos picos de aminoácidos descritos anteriormente, os níveis de succinato estão elevados nesta doença, sendo associados ao metabolismo aeróbio do escólex [PANDIT et al., 2001].

Os pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) apresentam um amplo espectro de patologias do SNC que podem apresentar-se como pseudotumorais, como ocorre em muitos processos infecciosos e desmielinizantes. Nestes pacientes, alterações na ERM ^1H , como a queda dos níveis de NAA, podem surgir antes mesmo da doença instalada [MEYERHOFF et al., 1993]. A ERM ^1H é um eficiente método no diagnóstico de patologias comuns, como a LEMP (que exhibe os picos mais baixos de NAA e mais altos de colina, devido à rápida destruição celular, com mio-inositol normal ou discretamente elevado), os linformas (bastante agressivos, com altos picos de colina e freqüentemente de lipídeos) e a toxoplasmose (com aumento do lactato, devido à predominância do metabolismo anaeróbio nas lesões infecciosas) [CHANG et al., 1995].

O infarto subagudo, pelo efeito de massa, edema e quebra da barreira hemato-encefálica, pode ser, por vezes, confundido com neoplasias gliais infiltrativas. Porém, o padrão da ERM ^1H e sua evolução são indicadores do diagnóstico correto. O aumento do lactato pode ser detectado minutos após o evento isquêmico, antes mesmo de qualquer alteração da imagem. Não é, entretanto, processo irreversível já que sua diminuição já ocorre nas primeiras horas. As alterações da colina e creatina também são variáveis na fase aguda [WARDLAW et al., 1998]. Infartos subagudos mostram diminuição do NAA (refletindo a perda neuronal) e acúmulo de colina. Este último dado, entretanto, tem caráter variável [KINSKI e SCHNALL, 2000].

Em muitas facomatoses, como a neurofibromatose, a ERM ^1H auxilia na diferenciação entre as lesões transitórias da substância branca e os astrocitomas associados a esta doença. Apesar de ambos apresentarem diminuição da relação NAA/creatina e significativo aumento da relação colina/creatina [JONES et al., 2001], o aumento relativo de colina é menos representativo nas lesões transitórias da substância branca [WANG et al., 2000].

Em doenças desmielinizantes como a esclerose múltipla, as placas em atividade podem produzir grande efeito de massa, edema circundante e cursar com quebra da barreira hemato-encefálica e captação do contraste paramagnético, simulando tumores, sobretudo, quando únicas (chamadas, com propriedade, de formas pseudotumorais). Na espectroscopia, as lesões são caracterizadas por aumento de lactato, dependendo da reação inflamatória, e por aumento da relação colina/creatina, marcando a destruição de membrana. Em placas crônicas, há diminuição da taxa NAA/creatina, refletindo injúria axonal irreversível [SIMONE et al., 1996]. Embora no primeiro exame a ERM ^1H possa não diferenciar esta forma pseudotumoral de neoplasia, é um indicativo mais preciso que as imagens da evolução das placas e do prognóstico das lesões [ARNOLD et al., 1992].

As doenças desmielinizantes infantis, principalmente quando se manifestam como áreas infiltrativas com alargamento do TR, algumas vezes similares a edema vasogênico, ou quando apresentam quebra de barreira hemato-encefálica (como na adrenoleucodistrofia [FATEMI et al., 2003]) podem simular tumores. Apesar dos achados da ERM ^1H serem normalmente inespecíficos, em alguns casos podem auxiliar no

diagnóstico, como no caso clássico da doença de Canavan, em que o aumento do NAA, devido à deficiência da enzima aspartoacilase, responsável por sua degradação, é patognomônico da doença, ou nos casos da doença de Leigh, na distrofia neuro-axonal, na doença de Schilder ou na doença de Cockaine em que há aumento do sinal de lactato, indicando deficiência do metabolismo energético normal [GRODD et al., 1991]. Em muitas outras entidades, informações valiosas são obtidas pela ERM¹H, como em encefalopatias mitocondriais, na diferenciação de síndromes MERRF (myoclonic epilepsy and ragged red fiber), MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke like episodes) e KSS (síndrome de Kearns-Sayre) [MATTHEUS et al., 1993] e ainda na descrição de novas doenças secundárias a erros inatos do metabolismo [STOCKLER et al., 1994].

Em heterotopias, que podem manifestar-se como grandes massas, com espaços contendo líquido e vasos e, em situações muito peculiares, podem simular tumores, a ¹H ERM mostra concentração de metabólitos idêntica ou muito similar à do cérebro normal, estabelecendo seu diagnóstico [LI et al., 1998; WIDJAJA et al., 2003].

As extensas áreas glióticas da encefalite de Rasmussen com alargamento de TR podem ser confundidas com tumores infiltrativos se a atrofia hemisférica não for tão marcante. A ERM ¹H, porém, não mostra aumento tão significativo de colina como nos tumores, mas diminuição da relação NAA/creatina, indicando a perda neuronal secundária observada nesta forma de encefalite. O acúmulo de lactato é mais associado à atividade epilética neuronal repetitiva que à isquemia tecidual [MATTHEUS et al., 1991; CENDES et al., 1995].

Na epilepsia, estudos *in vivo* e *in vitro* revelam a ERM¹H como excelente método de estudo da fisiopatologia, seguimento do paciente, delimitação da área patológica e previsão prognóstica, nos casos pré-cirúrgicos [LI et al., 2000b; ANTEL et al., 2002]. Uma alteração amplamente relatada é a perda ou disfunção neuronal, refletida pela diminuição da taxa NAA/creatina [CENDES et al., 1994; CENDES et al., 1997 (b); GADIAN, 1995b, STANLEY et al., 1998; LI et al., 2000a]. Alterações nos níveis de diversos aminoácidos e neurotransmissores ou reguladores da neurotransmissão (como GABA e taurina) e de colina, que se supõe dever-se à substituição gliótica do tecido lesado, também estão presentes [CHANG et al., 2003; SAVIC et al., 2004].

Assim, ao lado da análise da imagem, a ERM ^1H pode, se não definir a etiologia de uma lesão, contribuir para sua classificação dentro de um dos grandes grupos de patologias (inflamatórias, infecciosas, desmielinizantes, isquêmicas ou neoplásicas) através da definição das alterações bioquímicas encontradas no tecido em questão.

OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o papel da ERM ^1H na avaliação dos tumores do SNC.

Os objetivos específicos foram:

- Caracterizar o padrão de ERM ^1H *in vitro* e *in vivo* dos tumores do SNC e de seus subgrupos
- Estabelecer a relação entre os resultados dos dois métodos
- Investigar a existência de substâncias (ou de relações entre elas) na ERM ^1H *in vitro* que possam ser identificadas *in vivo*, com significado clínico e histopatológico.
- Correlacionar o perfil bioquímico encontrado com as alterações em vias metabólicas que possam estar envolvidas na fisiopatologia e progressão dos tumores do SNC.

***CASUÍSTICA E
MÉTODOS***

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 este estudo, foi aprovado 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.

IDENTIFICAÇÃO DO GRUPO DE ESTUDO

Foram selecionados pacientes admitidos no Hospital das Clínicas da UNICAMP cujo diagnóstico de tumor do SNC foi indicado pelo quadro clínico e exames de imagem (tomografia computadorizada e RM) e, posteriormente, confirmado por análise histopatológica da peça cirúrgica ou fragmento obtido por biópsia aberta.

ESTUDO *IN VITRO*

Foram analisadas por ERM ^1H de alto campo 51 amostras de tecido cerebral, sendo 47 provenientes de pacientes com tumores do SNC e 4 provenientes de pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico de epilepsia parcial, que constituíram nosso grupo controle. Foram excluídos aqueles que realizaram radioterapia ou quimioterapia previamente.

As amostras foram captadas imediatamente após sua retirada cirúrgica, de área aparentemente tumoral à observação macroscópica, evitando-se regiões próximas daquelas que sofreram manuseio pelo bisturi elétrico. Aquelas provenientes dos pacientes com epilepsia foram obtidas de área aparentemente normal a macroscopia, o mais longe possível do córtex afetado naqueles com diagnóstico de esclerose mesial temporal.

Todas as amostras foram divididas em duas partes: uma delas seguiu, juntamente com os demais fragmentos cirúrgicos, para análise histopatológica rotineiramente utilizada em nosso serviço: fixação em formol, emblocamento em parafina, cortes com 6 micra de espessura, coramento com hematoxilina-eosina e a análise visual pelo anátomo-patologista, realizada segundo a classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde - World Health Organization-WHO [KLEIHUES et al., 1993]. A análise imuno-histoquímica foi realizada em alguns casos, seguindo os critérios técnicos do anátomo-patologista, para definição diagnóstica. A segunda parte da amostra foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido e estocada a -80°C até seu processamento, que ocorreu em, no máximo, dois meses.

As amostras congeladas foram maceradas sob nitrogênio líquido e extraídas em ácido perclórico (HCl , 0,3 M, 10:1 volume: peso) e posteriormente centrifugadas (3000 x g, 10 minutos, 0°C). O sobrenadante foi coletado, neutralizado, ajustando-se o pH para 7.2 com hidróxido de potássio (KOH) 1,5 M e o sobrenadante neutro foi centrifugado e liofilizado. As amostras para ERM ^1H foram preparadas dissolvendo-se 50 mg do extrato liofilizado em 0,6 ml de água deuterada (D_2O) contendo sódio d_4 -trimetilsililpropionato (0.625 mMol.L^{-1}). A solução foi submetida a ultra-som, centrifugada (3000 x g, 10 minutos, 25°C) e posta em tubo de RM de 5mm.

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. Cada experimento foi adquirido com 128 transientes a 25°C . O sinal residual da água foi suprimido usando pulso seletivo de excitação (pulso de 90°), seguido por gradiente de campo pulsado no eixo z (wet 1 d).

O espectro de RM original foi refinado por análise "Wavelet" [JOHNSTONE 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; LOWUERSE et al., 1999], onde a matriz resposta (Y) de n linhas

(correspondentes aos espectros da matriz X) e k colunas (correspondentes ao número de tipos de tumores) foi construída da seguinte maneira: na linha i de Y ($i=1,\dots,n$), 1 foi colocado na $késima$ coluna e 0 em todas as demais se o $iésimo$ 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.

ESTUDO *IN VIVO*

O exame de ERM 1H *in vivo* foi realizado em um total de 35 pacientes (em parte, os mesmos estudados *in vitro*) com hipótese diagnóstica de tumor cerebral. Foram excluídos todos os pacientes portadores de tumores com volume inferior a 8 cm^3 , submetidos à radioterapia e/ou quimioterapia prévias, os que apresentavam áreas de extensa necrose, císticas ou calcificadas, sangramento, tumores posicionados muito próximos a estruturas ósseas (como na base do crânio) e aqueles cujo gráfico da ERM 1H *in vivo* foi de qualidade técnica insatisfatória (como linha de base muito irregular ou pouca resolução de picos). O exame não foi realizado nos pacientes que apresentaram quaisquer contra-indicações para a realização de RM como, por exemplo, próteses metálicas, marca-passo cardíaco, cliques metálicos intracranianos (para aneurisma) e claustrofobia severa.

As imagens e a ERM 1H foram obtidas em um 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° , 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 (gadolínio – 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.

A aquisição da espectroscopia foi realizada com voxel único, em área de 2 x 2 x 2 cm, locado no centro da lesão, utilizando-se sequência PRESS, com TE=135 ms e TR=1500 ms, em sequência realizada sem orientação inclinada (Figura 3).

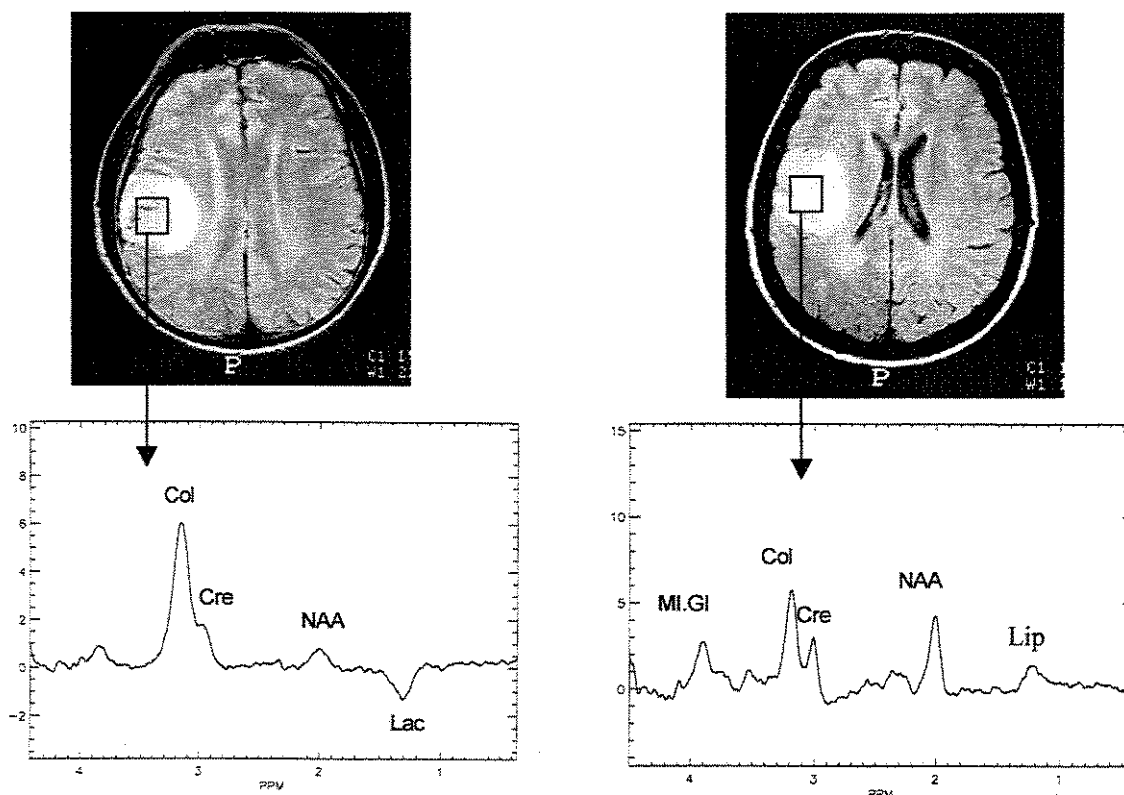


Figura 3 - Obtenção da ERM ¹H *in vivo*. Imagens de RM ponderadas em FLAIR e os respectivos gráficos da ERM ¹H em dois pacientes que apresentaram tumores semelhantes pela imagem, mas com padrão da ERM ¹H diverso. No primeiro paciente foi diagnosticado oligoastrocitoma anaplásico e no segundo, glioblastoma.

Durante o pós-processamento, determinou-se a área dos picos de mio-inositol e glicina (conjuntamente), NAA, colina, creatina, lactato e lipídeos por integração, utilizando-se o programa do fabricante (ELSCINT). Baseados em estudos prévios [GALANAUD et al., 2003] e devido a grande variação da amplitude dos picos dos diversos metabólitos nos tumores, inclusive da creatina [MAJOS et al., 2003a], a normalização dos valores foi feita pela soma total dos picos. Análise idêntica foi realizada com normalização pelos valores da colina (o único metabólito que apresentou quantidades mensuráveis em todos os casos).

A aquisição e análise da ERM ^1H foram realizadas de modo idêntico em um grupo controle de 34 voluntários normais, na região talâmica (em 10 deles), região temporal (17), região occipital (3) e substância branca profunda (4). Tais regiões e o hemisfério onde a ERM ^1H foi realizada foram escolhidos aleatoriamente.

A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA (de uma entrada e com multivariáveis - MANOVA) e análise discriminatória linear (Systat, Inc, Evanston, Illinois, 1992). Neste procedimento, cada indivíduo (o “indivíduo teste”) pertencente ao grupo de n elementos (que inclui todos os subgrupos, inclusive controles) é retirado do grupo total e classificado por semelhança em um de seus subgrupos, utilizando-se uma função discriminatória linear resultante da análise dos outro $n-1$ elementos (o “training set”). Isto se repete para cada um dos indivíduos. A resposta é dada como porcentagem de acerto da classificação. Nossos subgrupos foram as classes mais numerosas de tumores (glioblastomas, astrocitomas pilocíticos, meningiomas) e os controles. Na análise discriminatória linear foram incluídos ainda os meduloblastomas. Os demais grupos histológicos tumorais foram comparados aos controles através da média de seus valores de cada composto. Foram considerados significativos valores com 2 desvios-padrão acima ou abaixo da média dos controles normais.

RESULTADOS

ESTUDO *in vitro*

A análise histopatológica dos tumores revelou astrocitoma (graus II e IV) em 13 pacientes, meningioma em 10, metástase em 5 e outros tipos de tumores em 19 pacientes (oligoastrocitoma anaplásico em 3, oligodendroglioma em 2, xantoastrocitoma em 1, neurocitoma em 1, schwanoma em 2, adenoma em 3, meduloblastoma em 2, papiloma em 1, craniofaringeoma em 2 e tumor epidermóide em 2 pacientes). A análise histológica dos fragmentos dos pacientes operados por epilepsia de difícil controle revelou heterotopia em 1 paciente e esclerose temporal mesial em 3 deles. Nestes últimos, o fragmento utilizado para ERM ^1H *in vitro* foi obtido o mais distante possível da lesão (geralmente da região de substância branca adjacente).

Nos tumores intraparenquimatosos, a grande maioria das amostras foi proveniente de neoplasias centradas na substância branca encefálica, sendo apenas quatro provenientes de tumores corticais e cinco de tumores de fossa posterior, o que deu ao grupo satisfatória homogeneidade (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição das amostras estudadas através de ERM ^1H *in vitro* segundo diagnóstico histológico e localização.

Tipo Histológico	Substância Branca	Córtex	Fossa Posterior	Extra-axiais	Total
Glioblastoma	9		1		10
Astrocitoma (grau II)	3				3
Oligodendroglioma		2			2
Oligoastrocitoma anaplásico	2	1			3
Meningioma				10	10
Schwanoma				2	2
Adenoma				3	3
Papiloma				1	1
Xantoastrocitoma		1			1
Neurocitoma				1	1
Meduloblastoma			2		2
Craniofaringeoma				2	2
Epidermóide				2	2
Metástase			2	3	5
Total	14	4	5	24	47

Os metabólitos presentes nos extratos foram responsáveis por um ou mais sinais (picos) com deslocamentos químicos e amplitudes que foram relacionadas com sua estrutura química e concentração, respectivamente. Numa primeira análise os tumores foram divididos em três grupos: tumores não neurogliais (schwanomas, adenomas, meningeomas e papiloma), tumores neurogliais de alto grau de agressividade (glioblastomas e oligoastrocitomas anaplásicos) e neurogliais de baixo grau de agressividade (astrocitomas e oligodendrogliomas). A análise comparativa entre estes dois últimos grupos permitiu o estudo das alterações bioquímicas segundo o grau de agressividade dentro do espectro de malignidade de um mesmo grande grupo histológico.

Outra análise foi realizada com o espectro não normalizado a fim de reforçar diferenças secundárias à concentração dos compostos. Análise independente foi feita com os espectros originais utilizando os mesmos grupos acima e comparando os seguintes grupos: metástases, controles, tumores neurogliais de baixo grau e tumores neurogliais de alto grau. A análise comparativa entre as metástases e os tumores neurogliais de alto grau auxiliou na diferenciação destes grupos com aspectos clínicos por vezes semelhantes, bastante agressivos, mas de origem histológica diversa.

Tumores neurogliais de alto grau apresentaram altos níveis de acetato e altas taxas de glicina / inositol, quando comparadas aos tumores neurogliais de baixo grau (Figuras 4 e 5).

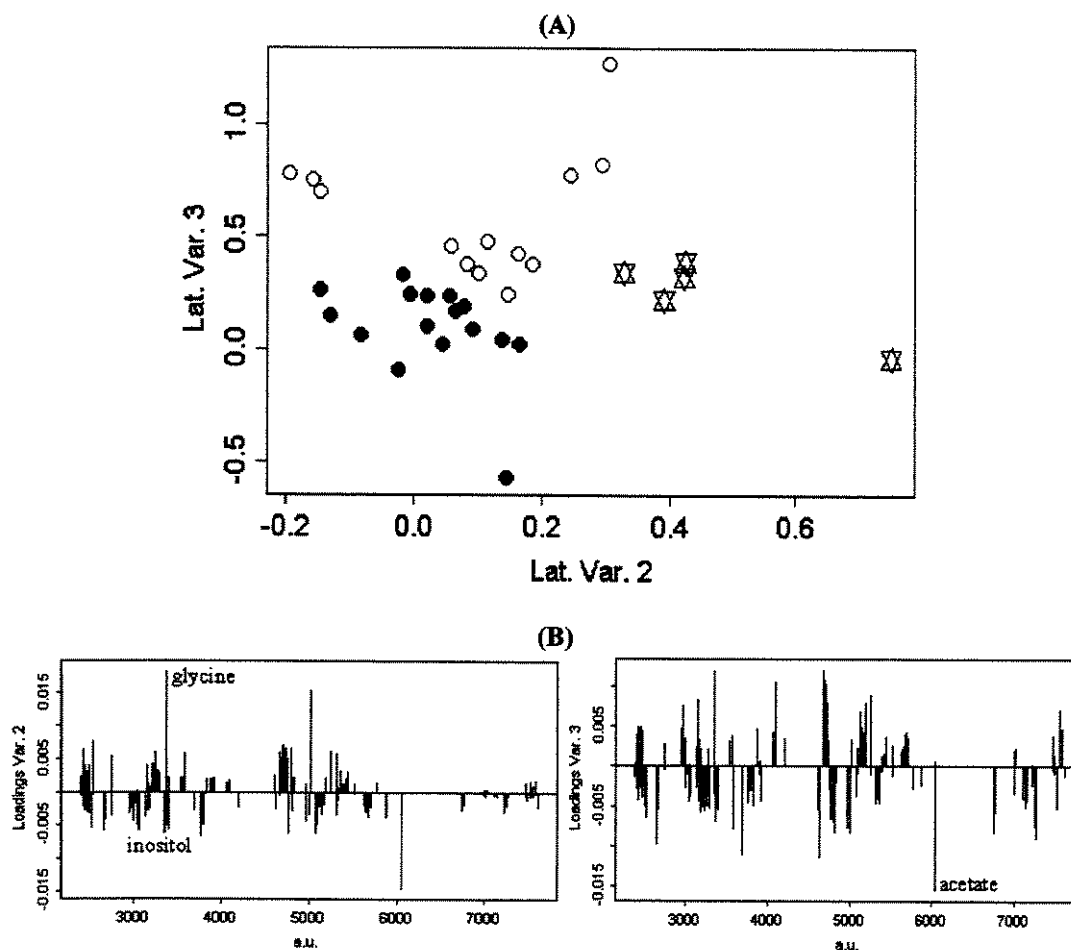


Figura 4 - (A) Gráfico representando o resultado da análise discriminatória comparando tumores neurogliais de alto grau (círculos abertos '○'); tumores não-neurogliais (círculos cheios '●') e tumores neurogliais de baixo grau (estrelas '★'). Observe a tendência ao agrupamento dos elementos das diferentes classes. **(B)** Coeficiente de regressão para análise discriminante. Cada um dos picos deste esquema representa um pico do espectro original, reconhecido por seu deslocamento químico. A amplitude com que está representado é proporcional ao seu poder em determinar o agrupamento das classes e sua posição (acima ou abaixo da linha de base e para a direita ou esquerda do centro) determina o posicionamento de cada uma das amostras em (A). Neste caso, os picos determinantes do agrupamento das classes foram os de glicina (glycine), mio-inositol (inositol) e acetato (acetate). As amostras localizadas na metade direita de (A) apresentaram as maiores concentrações de glicina e menores de mio-inositol (como os tumores neurogliais de alto grau) e as situadas abaixo da linha média, maiores quantidades de acetato (como os tumores não neurogliais).

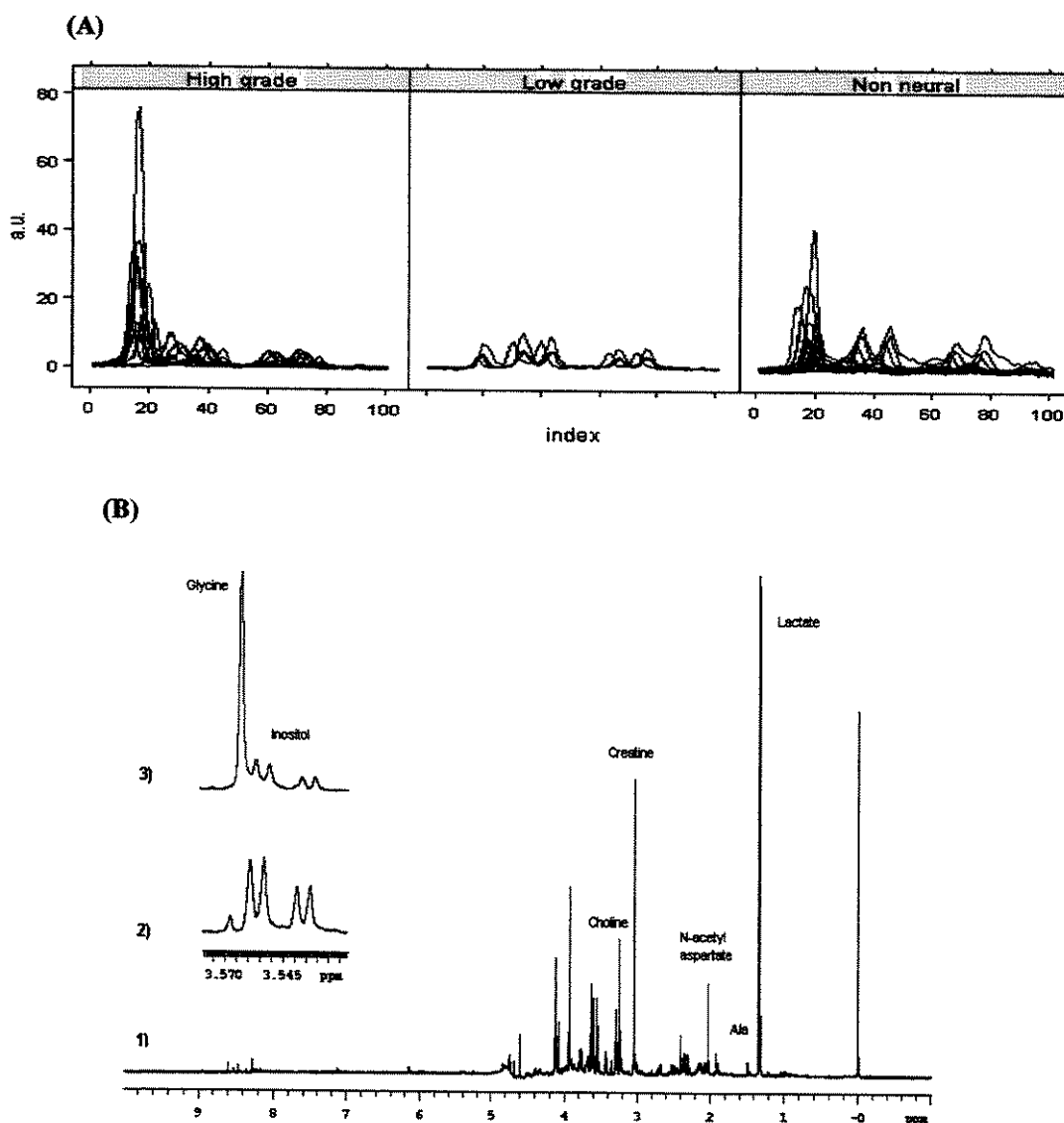


Figura 5 - (A) Amplificação da região entre 3,50 – 3,60 ppm em tumores, neurogliais de alto grau (high grade), de baixo grau (low grade) e não neurogliais (non neural). Cada uma das curvas sobrepostas é o trecho de interesse de cada um dos espectros originais, pertencente à classe. Observe o aumento da glicina nos tumores neurogliais, principalmente nos de alto grau de agressividade. **(B)** Espectro típico total (1) e amplificações da região entre 3,50 – 3,60 ppm de uma amostra de astrocitoma de baixo grau (2) e de um glioblastoma (3). Observe como é perceptível, mesmo no espectro original, sem pós-processamento, o aumento da taxa glicina / inositol nos tumores neurogliais de alto grau, principalmente decorrente do aumento da glicina.

Intensidades muito baixas de sinal de mio-inositol discriminaram metástases de tumores neurogliais de alto e de baixo grau e do grupo controle (Figura 6).

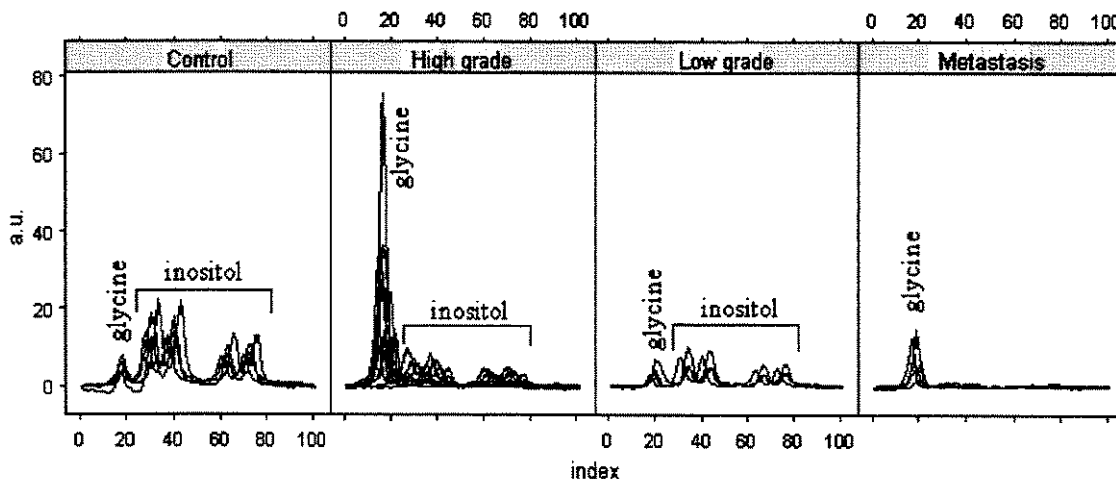


Figura 6 - Amplificação da região entre 3,50 – 3,60 ppm em controles (control), tumores neurogliais de alto grau (high grade), de baixo grau (low grade) e metástases (metastasis). Cada uma das curvas sobrepostas é o trecho de interesse de cada um dos espectros originais, pertencente à classe. Observe os baixos picos de mio-inositol nas metástases (praticamente indiferenciáveis da linha de base) em relação aos tumores neurogliais e, principalmente, aos controles.

Aumento do lactato e colina e redução da creatina e NAA permitiram a diferenciação entre controles e tumores, em concordância com estudos prévios [MOSTERT et al., 1986; LUYTEN et al., 1990; KRUMSCHNABEL et al., 2000]. Os tumores não neurogliais apresentaram as menores concentrações de creatina e lactato. Aumento de colina e glicina ocorreu de acordo com o grau de agressividade tumoral, também contribuindo para diferenciar os tumores do grupo controle e os tumores neurogliais segundo o grau de agressividade (Figura 7). As taxas de creatina e NAA dos tumores neurogliais de baixo grau aproximaram-nos dos controles e os afastaram de seus similares, de alto grau.

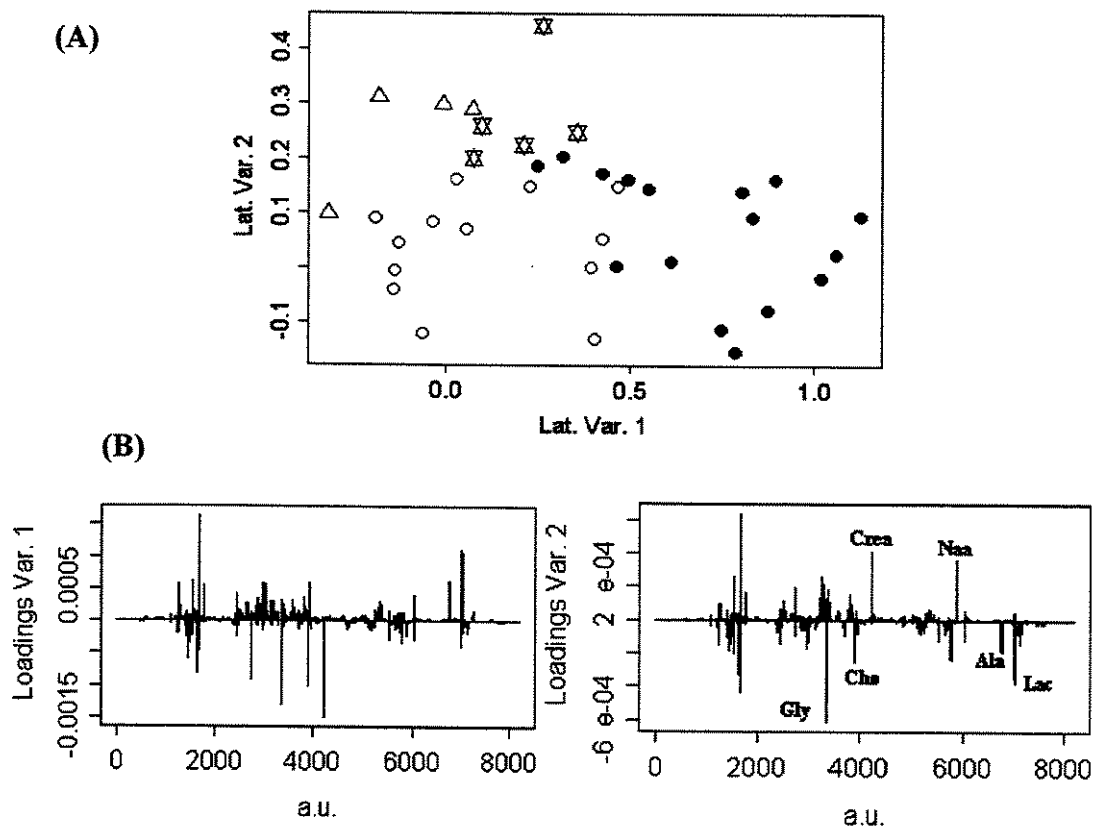


Figura 7 - (A) Gráfico representando o resultado da análise discriminatória comparando tumores neurogliais de alto grau (círculos abertos '○'), tumores não-neurogliais (círculos cheios '●'), tumores neurogliais de baixo grau (estrelas '✱') e controles (triângulos 'Δ'). Observe a tendência ao agrupamento dos elementos das diferentes classes. (B) Coeficiente de regressão para análise discriminatória. A interpretação deste gráfico é a mesma daquela descrita para a Figura 4. Neste caso, os picos determinantes do agrupamento das classes foram os de creatina (Crea), NAA (Naa), glicina (Gly), colina (Cho), alanina (Ala) e lactato (Lac). Amostras localizadas na região superior de (A) (em sua maioria, controles e tumores neurogliais de baixo grau) foram assim dispostas por apresentarem maiores concentrações de creatina e NAA e aquelas localizadas na metade inferior, apresentaram as maiores concentrações de glicina, colina, alanina e lactato.

Durante a análise dos dados foram observados pequenos deslocamentos químicos devido a mínimas variações de pH nas amostras. Porém, estes deslocamentos não prejudicaram a identificação dos metabólitos responsáveis pela discriminação entre os grupos.

ESTUDO *in vivo*

Os pacientes estudados através da ERM ^1H *in vivo* eram portadores de glioblastomas (16 pacientes), astrocitomas pilocíticos (5), meningiomas (4), meduloblastomas (2), astrocitomas de baixo grau (grau II) (2), adenoma (1), ependimoma (1), linfoma (1), metástase (1), neurocitoma central (1) e carcinoma epidermóide invasivo, originário do seio esfenoidal (1). Assim como no estudo *in vitro*, a grande maioria das neoplasias dos 35 pacientes estudados era centrada na substância branca encefálica, sendo que apenas quatro tinham centro nos núcleos da base e quatro eram de tumores de fossa posterior, fornecendo, novamente, homogeneidade ao grupo (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição dos pacientes estudados através de ERM ^1H *in vivo* segundo diagnóstico histológico do tumor e sua localização.

Tipo Histológico	Substância Branca	Núcleos da Base	Fossa Posterior	Extra-Axiais	Total
Glioblastoma	16				16
Astrocitoma pilocítico		4	1		5
Meningeoma				4	4
Astrocitoma (grau II)	2				2
Meduloblastoma			2		2
Adenoma				1	1
Metástase			1		1
Neurocitoma				1	1
Ependimoma				1	1
Linfoma	1				1
Carcinoma				1	1
Total	19	4	4	8	35

A espectroscopia nos controles foi realizada em áreas de substância branca profunda, tálamos e regiões temporais, havendo, portanto, razoável analogia com as regiões sede dos tumores estudados.

Os tumores apresentaram variações muito maiores que os controles nas medidas de todos os compostos estudados (Figura 8). Isso foi ainda mais marcante nos valores de glicina e mio-inositol, sujeitos a alterações devido a sua sobreposição (e conseqüente contabilização conjunta) e sua proximidade do pico de água livre (sujeitos aos artefatos causados durante a supressão do mesmo). Atribuiu-se à imprecisão causada por estes dois fatores o fato da glicina e do mio-inositol terem sido as únicas substâncias cujos valores não diferiram nos tumores e controles.

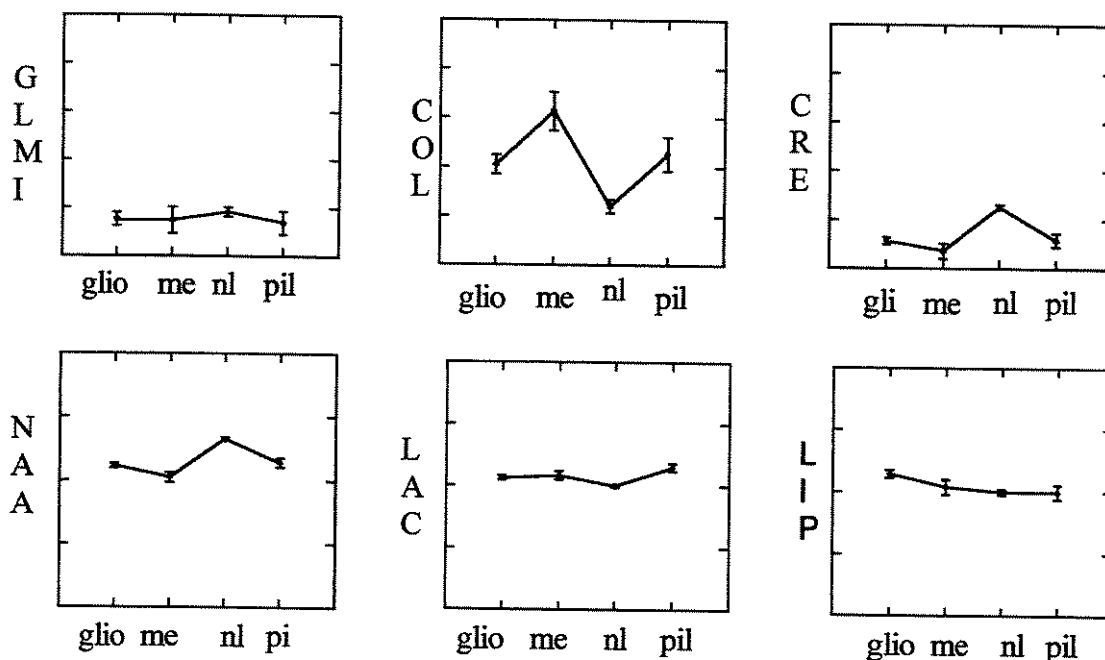


Figura 8 - Gráfico resumindo os resultados do teste ANOVA, comparando os grupos com maior número de indivíduos (glioblastomas (glio), meningiomas (me) e astrocitomas pilocíticos (pil)) e o grupo de controles (nl), em relação às suas quantidades de glicina e mio-inositol (GLMI), mensurados conjuntamente, creatina (CRE), colina (COL), NAA, lactato (LAC) e lipídeos (LIP), normalizados pelo valor resultante da soma destes picos. As linhas verticais representam dois desvios-padrão acima e abaixo do valor médio da quantidade do metabólito indicado no respectivo subgrupo. Observe como, em todos os casos, os tumores apresentam maior variação da quantidade de cada metabólito em relação aos controles.

A diferença entre os tumores e os controles normais deu-se por altas taxas de colina e lactato e baixas taxas de creatina e NAA nos tumores (Tabela 3). Além disso, os tumores (particularmente os glioblastomas) apresentaram variáveis picos de lipídeos, ausentes nos controles normais.

Tabela 3 - Resultado do teste ANOVA com múltiplas variáveis (MANOVA), incluindo os grupos tumorais (astrocitomas pilocíticos, glioblastomas, meningiomas) e controles normais, em relação às suas quantidades de glicina/mio-inositol, creatina, colina, NAA, lactato e lipídeos, normalizados pelo valor resultante da soma destes picos.

PICO	F	p
Colina	11.01149	0.00001
Creatina	27.85530	0.000001
NAA	41.28667	0.000001
Lactato	8.89488	0.00007
Lipídeo	5.35980	0.00261
Glicina/mio-inositol	0.47012	0.70434

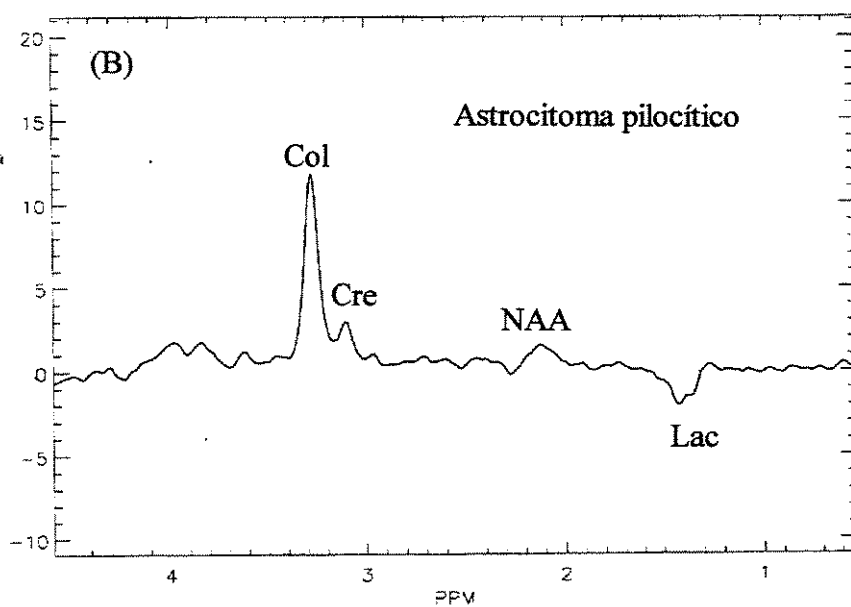
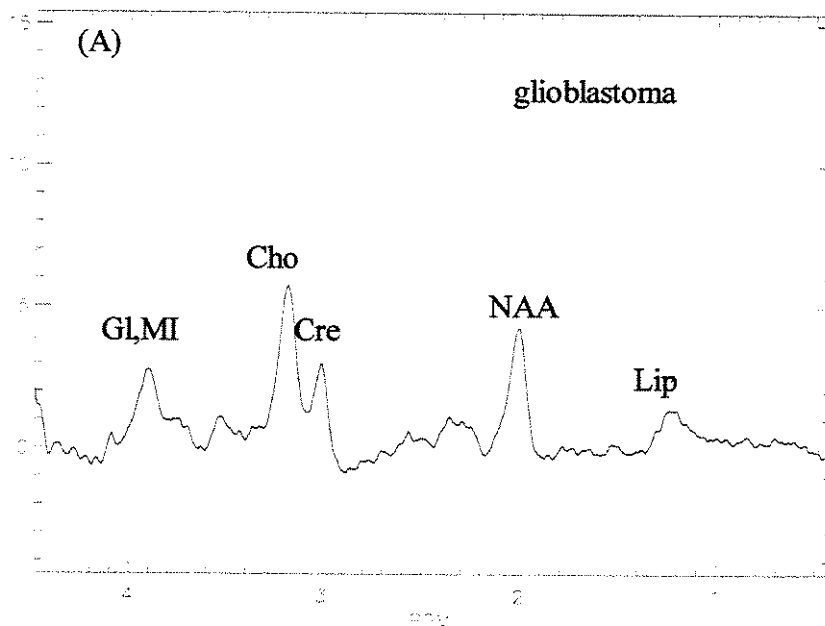
A análise discriminatória linear foi capaz de classificar corretamente 82% dos tumores. A classificação dos controles normais foi correta em 100% dos casos. Os meningiomas foram classificados corretamente em 75% das vezes, os astrocitomas pilocíticos em 60% e os glioblastomas em 50 %. Os meduloblastomas receberam diagnósticos corretos em 100% dos casos na classificação deste teste (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultado da análise discriminatória de múltiplas variáveis, incluindo os grupos tumorais numericamente mais significativos e os controles normais. Os valores representam o número de casos classificados em cada um dos grupos, exceto pela última coluna, onde estão expostas as porcentagens de classificação correta: “acerto” do método.

	Glioblastoma	Meduloblastoma	Meningeoma	Controles	Astrocitoma Pilocítico	% acerto
glioblastoma	8	3	1	0	4	50
Meduloblastoma	0	2	0	0	0	100
meningeoma	1	0	3	0	0	75
controles	0	0	0	34	0	100
Astrocitoma pilocítico	1	1	0	0	3	60
Total	10	6	4	34	7	82

A comparação entre as médias dos demais grupos (adenoma, ependimoma, astrocitomas grau II, metástase, carcinoma, linfoma e neurocitoma) revelou diferenças em relação aos controles quanto às taxas de NAA (baixa em todos os casos) e de colina (alta em um dos astrocitomas, no neurocitoma e na metástase). A creatina foi baixa em um dos astrocitomas, na metástase e no carcinoma. Exceto pela metástase (que apresentou quase que exclusivamente pico de colina), por um dos astrocitomas e pelo adenoma, os demais tumores apresentaram lactato, diferente dos controles.

Alguns exemplos de espectros obtidos, escolhidos dentre os tumores mais freqüentes nesta casuística estão representados (Figura 9).



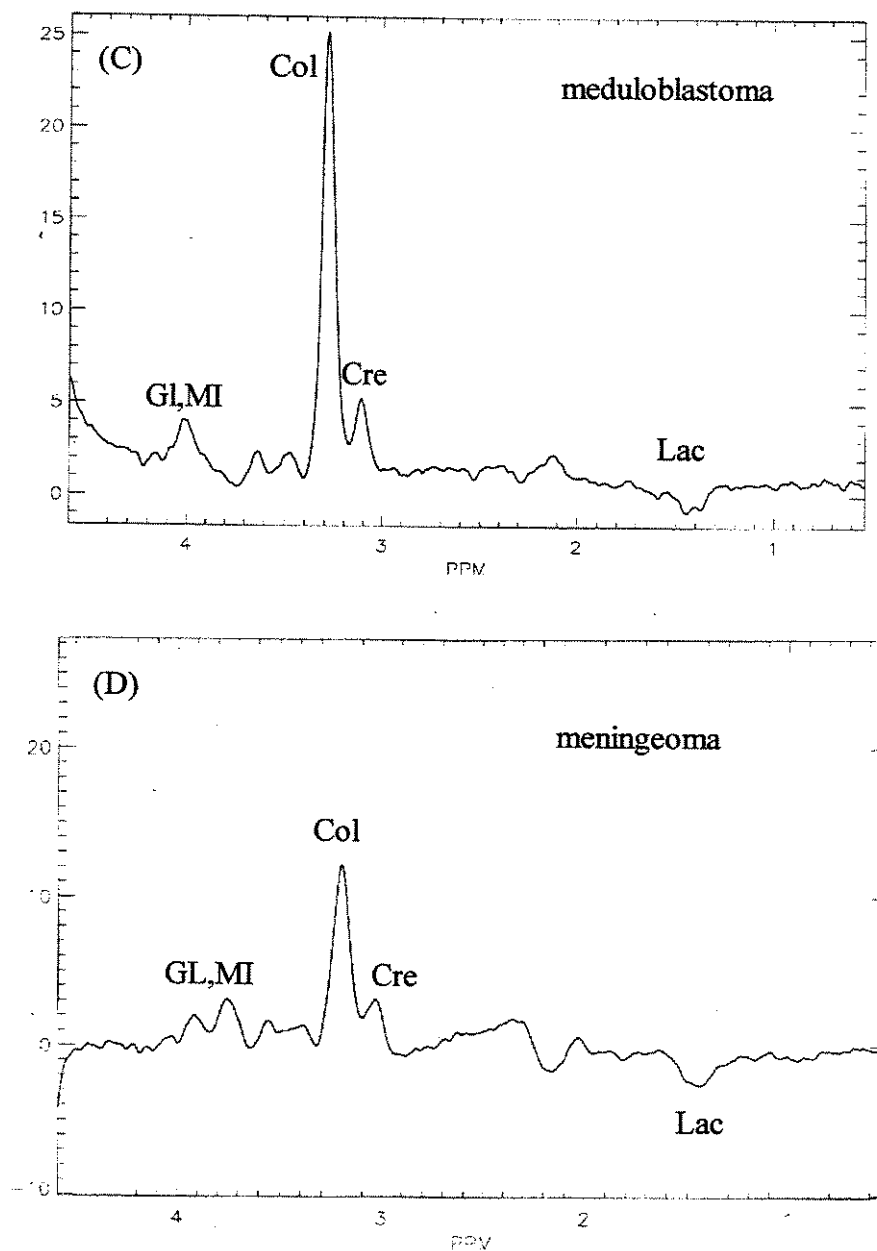


Figura 9 - Espectros obtidos *in vivo* (2T) de pacientes portadores de glioblastoma (A), astrocitoma pilocítico (B), meduloblastoma (C) e meningeoma (D). Estão identificados os picos de mio-inositol e glicina, conjuntamente (GL,MI), colina (Col), creatina (Cre), N-acetil aspartato (NAA) e lactato (Lac). Parte do pico de NAA no glioblastoma pode ser decorrente de volume parcial de tecido normal subjacente.

DISCUSSÃO

No estudo de ERM ^1H *in vitro* encontramos glicina e mio-inositol como marcadores do grau de agressividade dentro do grupo dos tumores neurogliais e as metástases diferenciaram-se por baixo mio-inositol (ANEXO 3). Em ambos os estudos, *in vitro* e *in vivo*, NAA, colina, creatina e lactato foram responsáveis pela diferenciação de tumores e controles e das neoplasias quanto ao grupo histológico.

Pela sua própria complexidade, há muito que se conhecer sobre os mecanismos envolvidos no surgimento e perpetuação dos tumores de SNC. A escassez relativa de técnicas de estudo de processos bioquímicos dinâmicos, *in vivo*, muitas vezes decorre no uso de modelos construídos fora dos sistemas naturais que podem não exprimir o funcionamento biológico com exatidão. Assim, técnicas que consigam refletir o que ocorre no cérebro, *in loco*, fornecem informações seguras para o entendimento dos processos bioquímicos que ocorrem ou predominam no tecido normal e patológico. Daí a grande importância da ERM ^1H nas diversas patologias do SNC.

Apesar de haver pequenas alterações no nível de alguns compostos durante e nos primeiros minutos após a ressecção tecidual, do uso de anestésicos durante a cirurgia e da mensuração *in vitro* de algumas substâncias que estão ligadas a macromoléculas *in vivo* e por isto não estão individualizadas no espectro (e, portanto, não são mensuráveis), há boa correlação entre os resultados obtidos pela ERM ^1H *in vivo* e *in vitro* [GILL et al., 1990; KUGEL et al., 1992; PEELING et al. 1993; KINOSHITA et al., 1994; USENIUS et al., RUTTER et al., 1995; PREUL et al., 1996], o que permite que estes dois métodos sejam complementares.

A confiabilidade dos resultados obtidos já é inicialmente indicada pelo fato de, tanto no estudo *in vivo* como no *in vitro*, não ter havido sobreposição entre os grupos dos controles e dos tumores. Além disso, os resultados *in vitro* foram capazes de distinguir grupos tumorais com sentido clínico, histológico e prognóstico e ainda identificar uma disposição de metabólitos que caracterizou grau de agressividade (diferenciando tumores de agressividade variável dentro de um mesmo grande grupo histológico: tumores neurogliais) e tipos celulares (diferenciando tipos histológicos diferentes, mas com agressividade “similar”: tumores neurogliais de alto grau e metástases).

A espectroscopia *in vivo* também demonstrou haver padrões distintos dentro dos grupos tumorais, havendo precisão de diagnóstico que variou de 50% de acerto (como nos glioblastomas) até 100% (como nos meduloblastomas). Nos glioblastomas, a menor taxa de precisão diagnóstica pode ser decorrente de sua heterogenicidade.

Procuramos unir a precisão dos dados fornecidos pela ERM ^1H *in vitro* à fidedignidade dos resultados *in vivo*. Há que se ressaltar, no entanto, algumas particularidades necessárias à interpretação dos resultados obtidos nestes dois estudos.

Em primeiro lugar, pela própria característica da ERM ^1H *in vitro* (maior resolução de sinal), foram analisadas substâncias que não puderam ser observadas *in vivo* (por serem indiferenciadas da linha de base ou por sobreposição de picos) como o acetato, a alanina, aminoácidos como valina, leucina, isoleucina, GABA e, isoladamente, picos de glutamina, glutamato, glicina e inositol. Ao contrário, os lipídeos só puderam ser observados no estudo *in vivo*, pois não são solúveis em água (ou solvente polar) e a extração das amostras com ácido perclórico causa sua decomposição.

Quanto ao grupo de estudo, a grande maioria dos pacientes estudados *in vivo* (16 de 35) apresentou glioblastomas. Apesar de não ser o tipo histológico mais freqüente, essa preponderância deveu-se ao fato de serem tumores intra-parenquimatosos, geralmente grandes (maiores de 2 cm), sólidos, permitindo, portanto, a realização da ERM ^1H com boa qualidade. Outros tumores, como meningiomas, apesar de bastante freqüentes nos pacientes atendidos em nosso serviço, não foram mais numerosos neste estudo, pois não permitiram a obtenção de espectros satisfatórios, ou por sua localização, próxima a superfícies ósseas, ou por suas dimensões reduzidas.

A localização tumoral preponderante foi encefálica, na substância branca, tanto no estudo *in vivo* como *in vitro*. Isto contribuiu para a homogeneidade do grupo já que alterações metabólicas poderiam ter sido encontradas devido à composição celular particular de outras regiões (como os maiores níveis de GABA, presentes nas células da granulosa do cerebelo) [URENJAK et al., 1993]. No entanto, isto não ocorreu nem mesmo nos casos particulares de tumores de fossa posterior, o que indica que o padrão metabólico encontrado caracteriza muito mais o tecido tumoral que o possível tecido encefálico subjacente, mesmo nos tumores infiltrativos.

Assim as diferenças de composição bioquímica encontradas entre os grupos tumorais, divididos de acordo com critérios histológicos e clínicos (similaridade de imagem e prognóstico) e entre estes e os controles normais podem ser correlacionadas com o comportamento da célula tumoral, pela própria alteração patológica que a caracteriza, e com as alterações específicas de seu subgrupo.

Devido à complexidade das vias bioquímicas que se desenvolvem no sistema nervoso central, a maioria das interpretações para as alterações de níveis de substâncias intra ou extracelulares não são absolutas, estando sujeitas a confirmação pela descoberta de novas vias de regulação genética, enzimática e mecanismos adaptativos que, inevitavelmente, surgirão. Assim, muito do que discutimos aqui são suposições e proposições, atualmente coerentes dentro do que se conhece sobre o metabolismo cerebral, podendo estar, no entanto, apenas parcialmente correto. Proposições, no entanto, são a base da pesquisa científica, que depende tanto das teorias que se mostram posteriormente verdadeiras como das falsas, afinal, a diferença entre elas pode ser apenas uma questão de tempo.

Dois atributos são particularmente importantes para a célula tumoral: sua capacidade de sobreviver em meios adversos (como evitando os estresses osmótico e hipóxico) e seus mecanismos de evitar apoptose. As variações bioquímicas encontradas podem refletir alterações em vias metabólicas que participam ou são consequência do estabelecimento e manutenção tumoral.

As taxas glicina / inositol foram responsáveis pela classificação dos tumores de acordo com o grau de agressividade. Vale lembrar que no estudo *in vivo* não houve correlação neste ponto já que estes dois picos estão sujeitos aos artefatos de supressão do pico de água livre e que, sobrepostos, foram mensurados conjuntamente. Isto ocorre ao utilizar-se TEs por volta de 136ms, o que rotineiramente ocorre nos estudos *in vivo*. Trabalhos prévios, porém, utilizando diferentes TEs, mais eficientes da distinção de tais substâncias, concordam com nossos resultados *in vitro*, atribuindo um papel importante, principalmente à glicina, como marcador de tumores agressivos como neurocitoma e oligoastrocitoma anaplásico [GUTOWSKI et al., 1999; KIM et al., 2000].

O mio-inositol, que responde por 95% do inositol livre do corpo humano, precursor do fosfatidilinositol (PI), segundo mensageiro e osmólito de membrana plasmática [MOORE et al., 1997], aumenta durante a destruição neuronal e pode estar ausente em áreas necróticas [NORFRAY et al., 1993], justamente pela escassez celular. Isto pode contribuir para suas baixas taxas em tumores altamente agressivos como metástases. Entretanto, isto ocorreu também em fragmentos ou áreas francamente sólidas à macroscopia, portanto, de tecido celular não necrótico. Conseqüentemente, o mio-inositol não pode ser considerado apenas como marcador de necrose.

Maiores quantidades de mio-inositol estão presentes em células gliais, principalmente naquelas pouco diferenciadas [NICKLAS et al., 1978], daí as maiores concentrações encontradas nos tumores de origem glial que nas metástases. Estudos *in vivo* também confirmam elevados níveis de mio-inositol nos gliomas, mas não nas metástases [GALANAUD et al., 2002].

Sua ausência nas metástases pode ainda estar relacionada com indiferenciação celular e defeito apoptótico. Uma evidência direta é a ausência de mio-inositol em células indiferenciadas de adenocarcinoma de cólon quando comparadas às células diferenciadas do mesmo tumor [GALONS et al., 1989]. Outro indício é sua capacidade em promover a reversão da inibição da diferenciação causada por antígenos carcinogênicos em células epiteliais das pequenas vias aéreas [JYONOUCHI, et al., 1999] e aumento das taxas de apoptose nas células hepáticas [LEE et al., 2001] através de sua interação com a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), enzima do ciclo inositol-fosfato [VOET e VOET, 1989] e provável fator anti apoptótico. Assim, a redução de mio-inositol nas metástases pode estar relacionada com suas baixas taxas de apoptose e indiferenciação, além, obviamente, da ausência de células gliais.

Clinicamente, altas taxas de mio-inositol são classicamente relacionadas aos schwannomas e em alguns casos, permitem sua diferenciação com os meningeomas [KINOSHITA et al., 1994]. Schwannomas, porém, não estão presentes em nossa casuística, *in vivo*, devido às limitações posicionais, geralmente próximos à superfície óssea. Carcinomas de cabeça e pescoço também apresentam altas taxas de mio-inositol [CASTILLO et al., 1996]. Isto pode ter ocorrido em nosso paciente portador de carcinoma

de seio da face invasivo (que apresentou aumento do pico conjunto de glicina e mio-inositol). Porém, como já foi discutido, este pico deve ser considerado com restrições.

Ao contrário, a glicina previne a morte celular [SHARIPO et al., 1998; FRANEK et al., 2002; MORENO-MANAZANO et al., 2002; KIM et al., 2003]. Assim como outros aminoácidos, a glicina parece proteger as células submetidas a diferentes estresses, como a privação “nutricional” e a hiperosmolaridade [DEZENGOTITA et al., 2002], situações que ocorrem em células tumorais, constantemente submetidas ao estresse osmótico [TUZ et al., 2001]. Também tem papel importante no transiente de permeabilidade mitocondrial, um mecanismo de autofagia celular [LEMASTERS et al., 2002]. Conseqüentemente, aumento dos níveis de glicina pode relacionar-se a baixas taxas de apoptose e contribuir para a sobrevivência celular em meio adverso.

A glicina é ainda substrato indireto do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), derivada do piruvato, acetil-CoA e citrato [GILHAM et al., 1997]. Analisando a glicina de acordo com suas funções energéticas, duas diferentes situações podem ser vislumbradas com respeito ao metabolismo energético tumoral: 1) o TCA é desviado para a utilização de substratos alternativos, como ocorre em situações de hipóxia, onde se detectam alterações na captação do glutamato, glutamina e GABA, substratos alternativos das células gliais e neurônios [PORTAIS et al., 1991; PASCUAL et al., 1998] e 2) está ocorrendo depressão das vias aeróbicas.

A depressão das vias aeróbicas é um fenômeno conhecido em tecidos com altas taxas de proliferação celular. Nos tumores, a hipóxia não é só conseqüência do rápido crescimento celular, mas também, causa da indiferenciação celular *in vivo* e *in vitro*, sugerindo um novo mecanismo de malignização de células com características totipotenciais [JO⁺ GI et al., 2002].

Estudos clássicos demonstraram que a grande maioria de tumores em animais apresenta altas taxas de glicólise até mesmo sob condições aeróbicas (efeito Warburg), uma observação que vem sendo repetidamente confirmada [DANG e SEMENZA, 1999], inclusive em culturas de células gliais [PORTAIS et al., 1991]. Crescente número de genes

fisiopatologicamente relevantes são hiper-regulados pela ativação do fator de transcrição induzido por hipóxia (HIF) quando cai a tensão de oxigênio [GRAY et al., 2001; HUANG et al., 2003].

Mutações câncer-induzidas aumentam a expressão do HIF. Defeitos nos genes supressores de tumores como p53 (inativo na maioria dos tipos de câncer) e PTEN (eventualmente suprimido no glioblastoma multiforme) aumentam a transcrição e, portanto, os níveis de HIF [RAVI et al., 2000], que por sua vez, influencia a apoptose, mecanismos metabólicos e angiogênicos, hiper-estimulando genes codificadores de enzimas da via glicolítica [SEAGROVES et al., 2001].

O aumento da glicina em ERM ^1H *in vivo* está relatado nos gliomas aumentando progressivamente com a malignidade tumoral [HAGBERG et al., 1995; MAJOS et al., 2003b], corroborando nossos resultados *in vitro*.

O aumento de acetato, observado na análise *in vitro* dos tumores, também pode ser uma evidência indireta deste desvio para glicólise. A utilização do acetato depende da ativação da Acetil-CoA sintetase, uma das enzimas mais importantes do TCA. Assim, depressão relativa desta via [PORTAIS et al., 1991] pode causar aumento nos níveis de seus substratos. Além disso, o acetato está aumentado em situações de alto índice de destruição e reconstituição celulares [WANIEWSKI et al., 2004], como ocorre nos tumores.

O desvio para glicólise também pode ser responsável pela presença de lactato, um produto direto da via glicolítica, aumentado em situações de hipóxia crônica. Medidas combinadas por tomografia por emissão de prótons e EMR ^1H confirmam que o aumento do lactato coincide com áreas onde há maior captação de glicose [LUYTEN et al., 1990], confirmando que o processo glicolítico está ocorrendo. Além disso, mesmo em áreas com oxigenação normal, o lactato aumenta com o número de mitoses após a incubação celular com fator de necrose tumoral (TNF) [LUTZ et al., 2003], indício direto de sua relação com o metabolismo tumoral.

Dentre os tumores do SNC, os astrocitomas apresentam as maiores taxas de lactato refletindo, além das alterações inespecíficas dos tumores, supracitadas, sua deficiência em piruvato-quinase [MOSTERT et al., 1986] (enzima que participa da metabolização do lactato), diretamente proporcional a seu grau de agressividade.

Em nosso estudo clínico, o lactato ocorreu ainda em áreas peri-tumorais e mesmo no hemisfério contralateral (em dois pacientes com astrocitoma pilocítico e em um com glioblastoma) refletindo ainda prováveis distúrbios isquêmicos da micro-circulação, causados pelo edema e efeito de massa dos tumores. É, portanto, assim como reportado nos estudos prévios, marcador inespecífico dos tumores, ocorrendo em diferentes tipos histológicos, e importante marca do tecido patológico [KUZNETSOV et al., 2003]. Precauções devem ser tomadas, entretanto, quando a sua mensuração *in vitro* devido a sua rápida acumulação durante e após procedimentos cirúrgicos [MOSTERT et al., 1986].

Alterações no processo de fosforilação oxidativa também podem ser responsáveis pelos baixos níveis de creatina, marcador seguro do metabolismo endógeno e do estado energético das células cerebrais devido a sua permeabilidade limitada na barreira hemato-encefálica [BRAISSANT et al., 2001; PETROFF et al., 2003]. Sua redução é compatível com a exaustão de reservas energéticas devido à alta proliferação celular e isquemia [WATTS et al., 2004], ambas associadas ao grau de agressividade tumoral.

A creatina está freqüentemente diminuída nos tumores, mesmo na ausência de tecido necrótico, ao contrário de inúmeras outras patologias do SNC, portanto não utilizamos os valores de seu pico para normalização dos espectros *in vivo*. Em tecidos de origem não neuroglial (como aqueles que dão origem aos meningiomas e adenomas) seus níveis são ainda menores [TZIKA et al., 1996; USENIUS et al., 1994], em concordância com nossos resultados *in vitro*, nos quais estes tumores apresentaram os menores índices de creatina.

A colina é um precursor da fosfatidilcolina, participante da formação da membrana celular. Aumento da colina provavelmente reflete aumento da síntese de membrana e/ou aumento do número de células. Além disso, enzimas que participam de sua degradação podem estar inibidas na célula tumoral [RODRIGUES-GONZALES et al., 2003]. Estudos prévios correlacionam a colina com a degeneração maligna em gliomas

[TEDESCHI et al., 1997]. Porém, em processos necróticos, a reconstituição da membrana pode não ocorrer e, desta forma, a colina pode estar ausente [GO et al., 1995], o que provavelmente reduziu a acurácia isolada deste composto como determinante da agressividade tumoral em nosso estudo *in vitro*. *In vivo*, porém, devido ao posicionamento do voxel da ERM ^1H em áreas não necróticas, foi o metabólito mais constante e, ao lado do NAA e da creatina, um dos mais importantes fatores de classificação correta dos grupos tumorais em comparação com os controles. Altas concentrações foram observadas nos tumores agressivos como glioblastomas. Meningeomas, apesar do grau de agressividade menor, também apresentam altas taxas de colina, em concordância com relatos prévios [KUGEL et al., 1992].

NAA é encontrado primordialmente em neurônios e sua redução tradicionalmente indica perda da viabilidade de elementos neuronais [MILLER et al., 1991]. Estudos com gliomas em modelo de rato indicam redução do NAA na primeira semana após a implantação tumoral [GILL et al., 1994]. Em nosso estudo as taxas mais baixas de NAA ocorreram nos tumores extra-parenquimatosos. Assim como ocorreu no caso da creatina, tal achado confirma que as alterações bioquímicas na célula tumoral estão relacionadas não apenas ao seu comportamento mitótico, mas também à composição bioquímica própria de cada tipo histológico.

Dentro dos tumores intra-parenquimatosos, porém, o NAA *in vitro*, foi inversamente proporcional ao grau de agressividade. Como está presente também nas células imaturas (nestas, não restrito somente aos neurônios, mas presentes ainda em alguns subtipos de oligodendrócitos imaturos) [URENJAK et al., 1993] o NAA pode refletir não somente indiferenciação celular direta, mas também alterações no controle osmoregulatório intercompartimental, já que seu metabolismo é dinâmico, com rápida metabolização em oligodendrócitos, apesar de sua produção neuronal [BASLOW et al., 2000].

Além disso, pela seletividade da barreira hemato-encefálica é, como a creatina, bom marcador do metabolismo endógeno. Sua produção mitocondrial está ligada à produção de ATP e o consumo de oxigênio no tecido cerebral. Conseqüentemente, redução do NAA pode refletir defeito na produção de energia dentro da mitocôndria, além de perda neuronal [BATES et al., 1996], estando relacionado, portanto, aos estados hipermetabólicos e glicolíticos, predominantes na célula tumoral.

Por fim, lipídeos estiveram presentes nas áreas sólidas, não necróticas dos glioblastomas, confirmando que este metabólito não é exclusivamente marcador de necrose. Pico de lipídeos não foi encontrado em nenhum outro tipo histológico, exceto em um único caso de meningeoma em proximidade à calota craniana, onde houve contaminação da área estudada pela gordura do subcutâneo. Em neoplasias, os lipídeos são encontrados nos casos de alta agressividade [LEHNHARDT et al., 2001], como nos gliomas (o que ocorreu em nossos pacientes) [ZOULA et al., 2003]. São marcadores e diferenciadores das metástases dos demais tumores e estão classicamente presentes nos linfomas [SMITH et al., 2003; UTRIAINEN et al., 2003; FAN et al., 2004]. Cabe lembrar que os lipídeos são derivados da destruição de membrana, da morte celular e macrofagia tecidual e que estão ligados aos mecanismos de estresse oxidativo devido à ativação do fator de necrose tumoral hipóxico-dependente [SAKAGUSHI et al., 2002].

Apesar de estarmos analisando poucas substâncias (apenas aquelas detectáveis pela ERM ^1H), em relação às milhares que estão presentes em células do SNC, normais e patológicas, e de ainda haver muitas lacunas no estabelecimento de cadeias metabólicas complexas, a boa correlação clínica e a concordância com dados prévios obtidos por diferentes métodos reforçam a relevância da ERM ^1H nos estudos da bioquímica dos tumores do SNC.

Perspectivas de futuras pesquisas surgem através da ERM ^1H de sólidos, onde é possível a utilização de tecido “in natura” (de biópsias ou de culturas celulares). Este tipo de análise elimina a fase de extração com substâncias polares, preservando as substâncias apolares e ligações inter-moleculares. Assim, possibilitando traduzir com maior acurácia a estrutura molecular do tecido cerebral. No mesmo sentido, análise de líquidos biológicos pode ser altamente promissora, não só no estudo dos tumores como de diversas doenças metabólicas. Além disso, a decomposição dos sinais de diversas substâncias pode levar a conclusões sobre o desvio de equilíbrio em reações químicas e sobre a fase de divisão celular.

CONCLUSÕES

A ERM ^1H *in vivo* é um método eficiente no diagnóstico dos tumores, classificando corretamente 82 % dos pacientes. Os resultados demonstram que aumento dos níveis de lactato e colina e diminuição de creatina e NAA diferenciam tumores e controles, *in vitro* e *in vivo*.

Os níveis de glicina, mio-inositol e acetato, *in vitro*, correlacionam-se com o grau de agressividade em tumores neurogliais.

Metástases têm menores intensidades de sinal de mio-inositol comparadas aos tumores primários do sistema nervoso central.

Melhor caracterização dos metabólitos pela ERM ^1H *in vitro* pode ser relevante para otimização dos protocolos de ERM ^1H *in vivo*, como por exemplo, o uso de menores TEs para melhor resolução dos picos de glicina e mio-inositol.

Os resultados deste trabalho contribuem para a interpretação dos mecanismos de sobrevivência tumoral, refletindo alterações relacionadas com a indiferenciação celular e sua capacidade anti-apoptótica e de perpetuação em meios adversos às células normais.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

- ANTEL, S. B.; LI, L. M.; CENDES, F. et al. Predicting surgical outcome in temporal lobe epilepsy patients using MRI and MRSI. **Neurology**, 58(10): 1505-12, 2002.
- ARNOLD, D. L.; MATTHEUS, P. M.; FRANCIS, G. S.; O’CONNOR, J.; ANTEL, J. P. Proton Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging for Metabolic Characterization of Demyelinating Plaques. **Ann Neurol**, 31(3): 235-41, 1992
- BASLOW, M. H. Functions of N-acetyl-L-aspartate and N-acetyl-L-aspartylglutamate in the vertebrate brain: role in glial cell-specific signaling. **J Neurochem**, 75: 453-9, 2000.
- BASLOW, M. H. N-acetylaspartate in the vertebrate brain: metabolism and function. **Neurochem Res**, 28: 941-53, 2003.
- BATES, T. E.; STRANGWARD, M.; KEELAN, J.; DAVEY, G. P.; MUNRO, P. M.; CLARK, J. B. Inhibition of N-acetylaspartate production: implications for 1H MRS studies in vivo. **Neuroreport**, 31: 1397-400, 1996.
- BENDSZUZ, M.; WARMUTH-METZ, M.; BURGER, R. et al. Diagnosing dural metastasis: the value of 1H magnetic resonance spectroscopy. **Neuroradiology**, 43: 285-289, 2001.
- BRAISSANT, O.; HENRY, H.; LOUP, M.; EILERS, B.; BACHMANN, C. Endogenous synthesis and transport of creatine in the rat brain: an in situ hybridization study. **Brain Res Mol Brain Res**, 86: 193-201, 2001.
- CASTILLO, M.; KWOCK, L.; MUKHERJI, S. K. Clinical Applications of Proton MR Spectroscopy. **Am J Neuroradiol**, 17: 1-15, 1996.
- CENDES, F. Proton MRS: lactate. **Adv Neurol**, 83: 247-51, 2000.
- CENDES, F.; ANDERMAN, F.; DUBEAU, F.; MATTHEWS, P.M.; ARNOLD, D.L. Normalization of neuronal metabolic dysfunction after surgery for temporal lobe epilepsy: evidence from 1H MR spectroscopic imaging. **Neurology**, 49: 125-33, 1997 (a).
- CENDES, F.; ANDERMANN, F.; PREUL, M. C.; ARNOLD, D. L. Lateralization of temporal lobe epilepsy based on regional metabolic abnormalities in proton magnetic resonance spectroscopic images. **Ann Neurol**, 35(2): 211-6, 1994.
- CENDES, F.; ANDERMANN, F.; SILVER, K.; ARNOLD, D. L. Imaging of axonal damage *in vivo* in Rasmussen’s syndrome. **Brain**, 118: 753-8, 1995

- CENDES, F.; CARAMANOS, Z.; ANDERMANN, F.; DUBEAU, F.; ARNOLD, D. L. Proton magnetic resonance spectroscopic imaging and magnetic resonance imaging volumetry in the lateralization of temporal lobe epilepsy: a series of 100 patients. **Ann Neurol**, 42(5): 737-46, 1997 (b).
- CEODAN, S.; PARRILHA, R.; SANTORO, J.; RICO, M. H-1 NMR detection of cerebral mioinositol. **FEBS Lett**, 187: 167-72, 1985.
- CHANG, L.; CLOAK, C. C.; ERNST, T. Magnetic resonance spectroscopy studies of GABA in neuropsychiatric disorders. **J Clin Psychiatry**, 64(3): 7-14, 2003.
- CHANG, L.; MILLER, B. L.; MCBRIDE, D. et al. Brain lesions in patients with AIDS: H-1 MR Spectroscopy. **Radiology**, 197: 525-31, 1995.
- DANAMO, A. F.; GILDES, L. I.; YATSU, F. M. Acetyl Transport Mecanisms. Inolvmnt of N-acetil aspartac acidin de novo fatty acid biosynthesis in the developing rat brain. **Exp Brain Res**, 5: 267-73, 1968.
- DANG, C. V.; SEMENZA, G. L. Oncogenic alterations of metabolism. **Trends Biochem Sci**. 24: 68-72, 1999.
- DAVIDSON, A.; TAIT, D.M.; SPAINE, G.S. et al. Magnetic resonance spectroscopy in the evaluation of the neurotoxicity following cranial irradiation for childhood cancer. **Br J Radiol**, 2000; 73: 421-4, 2000.
- DEMAEREL, P.; JOHANNIK, K.; HECKE, V. et al. Localized H NMR spectroscopy in fifty cases of new diagnosed intracranial tumors. **J Comput Assist Tomogr**, 15(1): 67-76, 1991.
- DEZENGTITA, V. M.; ABSTON, L. R.; SCHMELZER, A. E.; SHAW, S.; MILLER, W. M. Selected amino acids protect hybridoma and CHO cells from elevated carbon dioxide and osmolarity. **Biotechnol Bioeng**, 78: 741-52, 2002.
- 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.

- FAN, G.; SUN, B.; WU, Z.; GUO, Q.; GUO, Y. In vivo single-voxel proton MR spectroscopy in the differentiation of high-grade gliomas and solitary metastases. **Clin Radiol**, 59(1): 77-85, 2004.
- FATEMI, A.; BARKER, P. B.; ULUG, A. M. et al. MRI and proton MRSI in women heterozygous for X-linked adrenoleukodystrophy. **Neurology**, 60(8): 1301-7, 2003
- FRANEK, F.; FISMOLOVA, I.; ECKSCHLAGER, T. Antiapoptotic and proapoptotic action of various amino acids and analogs in starving MOLT-4 cells. **Arch Biochem Biophys**, 398: 141-6, 2002.
- FULHAN, M. J.; BIZZI, A.; DIETZ, M. J.; et al. Mapping of brain tumor metabolites with proton MR spectroscopic imaging: clinical relevance. **Radiology**, 185: 675-686, 1992
- GADIAN, G. D. **NMR and applications to living systems**. New York: Oxford Science Publications, 1995a. p. 6-12; 29-33
- GADIAN, D.G. N-acetyl aspartate and epilepsy. **Magn Res Imaging**, 13(8): 1193-95, 1995b.
- GAJEWICZ, W.; PAPIERZ, W.; SZUMCZAK, W.; GORAJ, B. The use of proton MRS in the differential diagnosis of brain tumors and tumor-like processes. **Med Sci Monit**, 9(9): MT97-105, 2003.
- GALANAUD, D.; CHINOT, O.; NICOLI, F. et al. Use of proton magnetic resonance spectroscopy of the brain to differentiate gliomatosis cerebri from low-grade glioma. **J Neurosurgery**, 98: 269-276, 2003.
- GALANAUD, D.; NICOLI, F.; LE FUR, Y. et al. Contribution of magnetic resonance spectrometry to the diagnosis of intracranial tumors **Ann Med Interne**, 153(8): 491-8, 2002.
- GALONS, J. P., FANTINI, J., VION-DURY, J., COZZONI, P. J., CANIONI, P. Metabolic changes in undifferentiated and differentiated human colon adenocarcinoma cells studied by multinuclear magnetic resonance spectroscopy. **Biochimie**, 71(8): 949-61, 1989.
- GILHAM, B.; PAPACHRISTODOULOU, D. K.; THOMAS, J. H. In: Wills. **Biochemical basis of medicine**. Third edition. Oxford: Butterworth Heinemann, 1997. p. 57-60

GILL, M.; MILLER, S. L.; EVANS, D. et al. Magnetic resonance imaging and spectroscopy of small ring-enhancing lesions using a rat glioma model. **Invest Radiol**, 29: 301-6, 1994.

GILL, S. S., SMALL, R. K.; THOMAS, D. G. T. et al. Brain metabolites as ¹H NMR markers of neuronal and glial disorders. **NMR Biomed**, 2:196-200, 1989.

GILL, S. S.; THOMAS, D. G. T.; VAN BRUGGEN, N. et al. Proton MR spectroscopy of intracranial tumors: in vivo and in vitro studies. **J Comput Assist Tomogr**, 14(4): 497-504, 1990.

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.

GO, K. G., KAMMAN, R. L., MOOYAART, E. L. et al. Localized proton spectroscopy and spectroscopic imaging in cerebral gliomas, with comparison to positron emission tomography. **Neuroradiology**, 37: 198-206, 1995.

GRANATA, F., IORIO, E., CARPINELLI, G., GIANNINI, M., PODO, F. Phosphocholine and phosphoethanolamine during chick embryo myogenesis: a (³¹) P-NMR study. **Biochim Biophys Acta**, 1483(3): 334-42, 2000.

GRAND, S.; PASSARO, G.; ZIEGLER, A. et al. Necrotic tumor versus brain abscess: importance of amino acids detected at ¹H MR Spectroscopy – initial results. **Radiology**, 213: 785-793, 1992.

GRAY, A. Y.; TROLL, J. V.; SOMERO, G. N. Hypoxia –induced gene expression profiling in the eukaryotic fish *Manuscrsh Gillichthys mirabilis* **PNAS**, 98: 1993-8, 2001.

GRODD, W.; KRAGELOH-MANN, I.; KLOSE, U.; SAUTER, R. Metabolic and destructive brain disorders in children: Findings with localized proton MR Spectroscopy. **Radiology**, 181: 173-81, 1991.

GRUPTA, R.K. ; VATSAL, D.K.; CHAWLA, S. et al. Differentietion of tuberculous from pyogenic brain abscess with *in vivo* proton spectroscopy and magnetization transfer MR imaging. **Am J Neuroradiol**, 22: 1503-9, 2001.

- GUTOWSKI, N. J.; GOMEZ-ANSON, B.; TORPEY, N.; REVESZ, T.; MILLER, D. H.; RUDGE, P. Oligodendroglial gliomatosis cerebri: H-MRS suggest elevated glycine/inositol levels. **Neuroradiology**, 41: 650-3, 1999.
- GYNGELL, M. L.; 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.
- HAGBERG, G.; BURLINA, A. P.; MADER, I.; ROSER, W.; RADUE, E. W.; SEELIG, J. In vivo proton MR spectroscopy of human gliomas: definition of metabolic coordinates for multi-dimensional classification. **Magn Reson Med**, 34(2): 242-52, 1995.
- HEESTERS, M. A. A., GO, K. G., KAMMAN, R. L. et al. ¹¹C-tyrosine position emission tomography and ¹H magnetic resonance spectroscopy of the response of brain glioma to radiotherapy. **Neuroradiology**, 40: 103-108, 1998.
- HENRIKSEN, O. *In vivo* quantification of metabolite concentrations in the brain by means of proton MRS. **NMR Biomed**, 8:139-148, 1995.
- HENRIKSEN, O. MRS of brain 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
- HOWE, F. A.; BARTN, S. J.; CUDLIP, S. A. et al. Metabolic profiles of human brain tumors using quantitative in vivo ¹H magnetic resonance spectroscopy. **Magn Reson Med**, 49(2): 223-32, 2003.
- HUANG, L. E.; BUNN, H. F. Hypoxia-inducible factor and its biomedical relevance **J Biol Chem**, 278(22): 19575-8, 2003.
- INDHAL, U. G.; SAHNI, N. S.; KIRKHUS, B.; NAES, T. Multivariate strategies for classification based on NIR-spectra – with application to mayonnaise. **Chemom Intell Lab Sys**, 49: 19-31, 1999.
- JAYASUNDAR, R.; RAGHNATHAN, P.; BANERJI, A. K. Proton MRS similarity between central nervous system non-Hodgkin lymphoma and intracranial tuberculoma. **Magn Reson Med**, 13: 489-493, 1995.

JO" GI, A.; ORA, I.; NLSSON, H. et al. Hypoxia alters gene expression in human neuroblastoma cells toward an immature and neural crest-like phenotype. **PNAS**, 99: 7021-6, 2002.

JOHNSTONE, I. M.; SILVERMAN, B. W. Wavelet threshold estimators for data with correlated noise. **J Roy Statist Soc**, 59: 319-51, 1997.

JONES, A. P.; GUNAWASDENA, W. J.; COUTINHO, C. M. A. HMR spectroscopy evidence for the varied nature of asymptomatic focal brain lesions in neurofibromatosis type 1. **Neuroradiology**, 43: 62-7, 2001.

JYONOUCHI, H.; SUN, S.; IJIMA, K.; WANG, M.; HECHT, S. S. Effects of anti-7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene on human small airway epithelial cells and the protective effects of myo-inositol. **Carcinogenesis**, 20: 139-45, 1999.

KINOSHITA, Y.; KAJIWARA, H.; YOKOTA, A.; KOGA, Y. Proton magnetic resonance spectroscopy of brain tumors : an *in vivo* study. **Neurosurgery**, 5(4): 606-14, 1994.

KLEIHUES, P.; BURGER, P.C.; SCHEITHAUER, B. W. The new WHO classification of brain tumours. **Brain Pathology**, 3: 255-68, 1993.

KIM, D. G.; CHOE, W. J.; CHANG, K. H. et al. In vivo proton magnetic resonance spectroscopy of central neurocytomas. **Neurosurgery**, 46: 329-333, 2000.

KIM, J. S.; QIAN, T.; LEMASTERS J. J. Mitochondrial permeability transition in the switch from necrotic to apoptotic cell death in ischemic rat hepatocytes. **Gastroenterology**, 124: 494-503, 2003.

KINSKI, L.; SCHNALL, M. D. MR spectroscopy and the biochemical basis of neurological disease. In: Atlas, S. W. Magnetic Resonance Imaging of Brain and Spine. Second Edition. New York: Lippincott-Raven, 1996. p. 1619-54

KRUMSCHNABEL, G.; SCHWARZBAUM, P. J.; LISCH, J.; BIASI, C.; WIESER, W. Oxygen-dependent energetic of anoxia-tolerant and anoxia intolerant hepatocytes 951. **J Exp Biol**, 203: 951-9, 2000.

KUGEL H.; HEINDEL W.; ERNESTUS R. I.; BUNKE J.; MESNIL R.; FRIEDMANN G. Human brain tumors: spectral patterns detected with localized H-1 MR spectroscopy. **Radiology**, 183: 701-9, 1992.

KUZNETSOV, Y. E.; CARAMANOS, Z.; ANTEL, S. B. et al. Proton magnetic resonance spectroscopic imaging can predict length of survival in patients with supratentorial gliomas. **Neurosurgery**, 53(3): 565-74; discussion 574-6, 2003.

LAW, M.; YANG, S.; WANG, H. et al. Glioma grading: sensitivity, specificity, and predictive values of perfusion MR imaging and proton MR spectroscopic imaging compared with conventional MR imaging. **Am J Neuroradiol**, 24(10): 1989-98, 2003.

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, Y. I.; KANG-PARK, S.; DO, S. I.; LEE, Y. I. The hepatitis B virus-X protein activates a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival signaling cascade. **J Biol Chem**, 276: 16969-77, 2001.

LEHNHARDT, F. G.; ROHN, G.; ERNESTUS, R. I.; GRUNE, M.; HOEHN, M. 1H- and (31) P-MR spectroscopy of primary and recurrent human brain tumors in vitro: malignancy-characteristic profiles of water soluble and lipophilic spectral components. **NMR Biomed**, 14(5): 307-17, 2001.

LEMASTERS, J. J.; QIAN, T.; HE, L. et al. Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy. **Antioxid Redox Signal**, 4: 769-81, 2002.

LI, L. M.; CENDES, F.; ANDERMANN, F.; DUBEAU, F.; ARNOLD, D. L. Spatial extent of neuronal metabolic dysfunction measured by proton MR spectroscopic imaging in patients with localization-related epilepsy. **Epilepsia**, 41(6): 666-74, 2000.

LI, L. M.; CENDES, F.; ANTEL, S. B.; ANDERAMNN, F.; SERLES, W.; DUBEAU, F.; OLIVIER, A.; ARNOLD, D.L. Prognostic value of proton magnetic resonance spectroscopic imaging for surgical outcome in patients with intractable temporal lobe epilepsy and bilateral hippocampal atrophy. **Ann Neurol**, 47(2): 195-200, 2000.

- LI, L. M.; CENDES, F.; BASTOS, A. C.; ANDERMANN, F.; DUBEAU, F.; ARNOLD, D. L. Neuronal metabolic dysfunction in patients with cortical developmental malformations: a proton magnetic resonance spectroscopic imaging study. **Neurology**, 50(3): 755-9, 1998.
- LI, X.; JIN, H.; LU, Y.; OH, J.; CHANG, S.; NELSON, S. J. Identification of MRI and ¹H MRSI parameters that may predict survival for patients with malignant gliomas. **NMR Biomed**, 17(1): 10-20, 2004.
- LOWUERSE, D. J.; TATES, A. A.; SMILDE, A. K.; KOOT, G. L. M.; BERNDT, H. PLS discriminant analysis with contribution plots to determine differences between parallel batch reactors in the process industry. **Chemom Intell Lab Sys**, 46: 197-206, 1999.
- LUTZ, N. W., TOME, M. E.; COZZONE, P. J. Early changes in glucose and phospholipid metabolism following apoptosis induction by IFN-gamma/TNF-alpha in HT-29 cells. **FEBS Lett**, 544(1-3): 123-8, 2003.
- LUYTEN, P. R.; MARIEN, A. J. H.; HEINDEL, W. Et al. Metabolic imaging of patients with intracranial tumors: H-1 MR spectroscopic imaging and PET. **Radiology**, 176: 791-799, 1990.
- MACINTOSH, J. C.; COOPER, J. R. Studies in the function of n-acetyl aspartic acid in the brain. **J Neurochem**, 12: 825-835, 1965.
- MAISTRETTI, P. J. **Fundamental Neuroscience - Brain Energy Metabolism**. Second edition. New York: Elsevier Science, 2003. p. 339-60.
- MAISTRETTI, P. J.; PELLEGRIN, L.; ROTHMAN, D. L.; SHULMAN, R. G. Energy on demand. **Science**, 283: 496-7, 1999.
- MAJOS, C.; ALONSO, J.; AGUILERA, C. et al. Utility of proton MR spectroscopy in the diagnosis of radiological atypical intracranial meningiomas **Neuroradiology**, 45(3): 129-36, 2003a.
- MAJOS, C.; ALONSO, J.; AGUILERA, C. et al. Proton magnetic resonance spectroscopy ((¹H MRS) of human brain tumours: assessment of differences between tumour types and its applicability in brain tumour categorization. **Eur Radiol**, 13(3): 582-91, 2003b.

MARTINEZ-PEREZ, I.; MORENO, A.; ALONSO, J. et al. Diagnosis of brain abscess by magnetic resonance spectroscopy. **J Neurosurg**, 86: 708-13, 1997.

MATTHEUS, P.M.; ANDERMANN, F.; ARNOLD, D.L. Proton magnetic resonance spectroscopy study of chronic encephalitis and epilepsy. In: Andermann, F. **Chronic encephalitis and epilepsy – Rasmussen’s Syndrome**. Boston: Butterworth-Heinemann, 1991. p. 73-7.

MATHEUS, P.M.; ANDERMANN, F.; SILVER, K.; KARPATI, G.; ARNOLD, D. L. Proton MR spectroscopic characterization of differences in regional brain metabolic abnormalities in mitochondrial encephalomyopathies. **Neurology**, 43: 2484-90, 1993.

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

MEYERHOFF, D. J.; MACKAY, S.; BACHMAN, L. et al. Reduced brain N-acetyl aspartate suggest neuronal loss in cognitively impaired human immunodeficiency virus-seropositive individuals: in vivo 1H magnetic resonance spectroscopy imaging. **Neurology**, 43: 509-515, 1993.

MICHAELIS T.; MERBOLDT K. D.; BRUHN H.; HANICKE W.; FRAHM J. Absolute concentration of metabolites in adult human brain *in vivo*: quantification of localized proton MR spectroscopy . **Radiology**, 187; 219-27, 1993

MILLER, B. L. A Review of chemical issues in 1H NMR spectroscopy: N-acetyl-l-aspartate, creatine and choline. **NMR Biomed**, 4: 47-52, 1991.

MOLLER-HARTMANN, W.; KRINGS, T.;BRUNN, A.; KORINTH, M.; THRON, A. Proton magnetic resonance spectroscopy of neurocytoma outside the ventricular region - case report and review of the literature. **Neuroradiology**, 44(3): 230-4, 2002.

MOORE, C. M.; BREEZE, J. L.; KUKES, T. J. et al. Effects of myo-inositol ingestion on human brain myo-inositol levels: a proton magnetic resonance spectroscopic imaging study. **Biol Psychiatry**, 45: 1197-202, 1997.

- MORENO-MANAZANO, V.; LUCIO-CAZANA, J.; KONTA, T.; NAKAYAMA, K.; KITAMURA, M. Enhancement of TNF-alpha-induced apoptosis by immobilized arginine-glycine-aspartate: involvement of a tyrosine kinase-dependent, MAP kinase-independent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, 277: 293-8, 2000.
- MOSTERT, H. W.; BOTH, N. J.; RHLINSBURGER, E. H.; MACKAY, W. M.; VAN DEN BERGE, J. H.; STEFANKO, S. Z. Pyruvate kinase inhibition in the diagnosis of gliomas with an intermediate degree of malignancy. *Acta Neuropathologica*, 70: 296-301, 1986.
- NAFE, R.; HERMINGHAUS, S.; RAAB, P. et al. Preoperative proton-MR spectroscopy of gliomas--correlation with quantitative nuclear morphology in surgical specimen. *J Neurooncol*, 63(3): 233-45, 2003.
- NEGENDANK, W. G.; SAUTER, R.; BROWN, T. R. Proton magnetic resonance spectroscopy in patients with glial tumors: a multicentric study. *J Neurosurg*, 84: 449-58, 1996.
- NICKLAS, W. J.; BROWNING, E. T. Amino acid metabolism in glial cells: homeostatic regulation of intra- and extracellular milieu by C-6 glioma cells *J Neurochem*, 30: 955-63, 1978.
- NORFRAY, J. F.; TOMITA, T.; BYRD, S. E.; ROSS, B. D.; BERGER, P. A.; MILLER, R. S. Clinical impact of MR spectroscopy when MR imaging is indeterminate for pediatric brain tumors. *Am J Roentgenol*, 173: 119-25, 1999.
- OTT, D.; HENNING, J.; ERNEST, T. Human brain tumors: Assessment with in vivo proton MR spectroscopy. *Radiology*, 186: 745-752, 1993.
- PANDIT, S.; LIN, A.; GAHBAUNER, H.; LIBERTIN, C. R., ERDOGAN, B. MR Spectroscopy in neurocysticercosis. *J Comput Assist Tomog*, 25 (6): 950-2, 2001.
- PASCUAL, J. M.; CARCELLER, F.; RODA, J. M.; 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. High resolution ^1H -nmr spectroscopy studies of stracts of human cerebral neoplasm. *Magn Reson Med*, 24: 123-136, 1989.

PEELING, J.; SUTHERLAND, G. ¹H magnetic resonance spectroscopy of extracts of human epileptic neocortex and hippocampus. **Neurology**, 43(3): 589-94, 1993.

PETERS, A. **The Fine Structure of the Nervous System: Neurons and their Supporting Cells**. Philadelphia: W.B.Saunders Co, 1991.

PETROFF, O. A. C.; ERRANTE, L. D.; KIM, J. H.; SPENCER, D. D. *N*-acetyl-aspartate, total creatine, and myo-inositol in the epileptogenic human hippocampus **Neurology**, 60: 1646-51, 2003.

PETROFF, O. A. C.; PLEBAN, L. A.; SPENCER, D. D. 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) 1197-211, 1993.

PETROFF, A. C.; SPENCER, D. D.; ALGER, J. R.; PRICHARD, J. W. High – field proton magnetic resonance spectroscopy of human cerebrum obtained during surgery for epilepsy. **Neurology**, 39: 1197-202, 1989.

PERRY, T. L.; HANSEN, S.; GANDHAN, S. S. Postmortem Changes of Amino Compounds in Human and Rat Brain. **J. Neurich**, 36(2): 406-12, 1981.

POPTANI, M.; GRUPTA, R. K.; ROY, R.; PANDEY, R.; JAIN, V. K.; CHABRA, D. K. Characterization of intracranial mass lesions with in vivo proton MR spectroscopy. **Am J Neuroradiol**, 16: 1593-603, 1995.

PORTAIS, J.C.; PLANET, 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.

PREUL, M. C.; CARMANOS, Z.; COLLINS, D. L. et al. Accurate, noninvasive diagnosis of human brain tumors by using proton magnetic resonance spectroscopy. **Nat Med**, 2: 323-325, 1996.

PREUL, M.C.; LEBLANC, R.; CARMANOS, Z. et al. Magnetic resonance spectroscopy guided brain tumor resection: differentiation between recurrent glioma and radiation change in two diagnostically difficult cases. **Can J Neurol Sci**, 25: 13-22, 1998.

RAVI, R.; MOOKERJEE, B.; BHUJWALLA, Z. M. et al. **Genes Dev**, 14: 34-44, 2000.

- REICHEL, K. L.; KVAMME, E. Histamine dependent formation of n-acetyl aspartyl peptides in mouse brain. **J Neurochem**, 21: 849-59, 1973.
- 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): 12-8, 2003.
- RODRIGUES-GONZALES, A.; MOLINA, A. R. et al. Inhibition of choline kinase as a specific cytotoxic strategy in oncogene-transformed cells. **Oncogene**, 22(55): 8803-12, 2003.
- 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.
- RUTTER, A.; HUGENHOLTZ, H.; SAUNDRES, J. K.; SMITH, I. C. Classification of brain tumor by ex-vivo by ^1H NMR spectroscopy. **J Neurochem**, 64: 1655-61, 1995.
- SAKAGUSHI, S.; IIZUKA, Y., FURUSAWA, S.; TAKAYANAGI, M.; SATHO, S. Preventive effects of a verapamil against tumor necrosis factor-alpha-induced shock symptoms: approached from lipoprotein metabolic disorders. **Int Immunopharmacol**, 2(7): 867-73, 2002.
- SANDERS, J. A. Magnetic resonance spectroscopy. In: ORRISON, W. W.; LEWINE, J. D.; SANDERS, J. A.; HARTSHORNE M. F. **Functional Brain Imaging**. St.Louis: Mosby, 1995. p. 419-467.
- SAVIC, I.; OSTERMAN, Y.; HELMS, G. MRS shows syndrome differentiated metabolite changes in human-generalized epilepsies. **Neuroimage**, 21(1): 163-72, 2004.
- SCHURR, A.; MILLER, J. J., PAYNE, R. S.; RIGOR, B. M. An increase in lactate output by brain tissue serves to meet the energy needs of glutamate-activated neurons. **J. Neurosci**, 19: 34-35, 1999
- SEAGROVES, T. N.; RYAN, H. E.; LU, H. et al. **Mol Cell Biol**, 21: 3436-44, 2001.

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

SERLES, W.; LI, L. M.; ANTEL, S. B. et al. Time course of postoperative recovery of N-acetyl-aspartate in temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, 42(2): 190-7, 2001.

SHARIPO, A.; IMREH, M.; LEONCHIKS, A.; IMREK, S.; MASUCCI, M. G. A minimal glycine-alanine repeat prevents the interaction of ubiquitinated I kappaB alpha with the proteasome: a new mechanism for selective inhibition of proteolysis. **Nat Med**; 4: 939-44, 1998.

SIMONE, I. L.; 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, R. T.; THOMAS, D. G. T. et al. Brain metabolites as ¹H NMR markers of neuronal and glial disorders. **NMR Biomed**, 2: 196-200, 1989.

SMITH, J.K.; CASTILLO, M.; KWOCK, L. MR Spectroscopy of brain tumors. **Magn Reson Imag Clin N Am**, 11(3): 415-29, 2003.

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

STANLEY, J.A.; CENDES, F.; DUBEAU, F.; ANDERMANN, F.; ARNOLD, D. L. Proton magnetic resonance spectroscopic imaging in patient with extratemporal epilepsy. **Epilepsia**, 39(3): 267-73, 1998.

STOCKLER, S.; HOLZBACH, U.; HANEFELD, F. et al. Creatine Deficiency in Brain: A new treatable inborn error of metabolism. **Pediat Res**, 36(3): 409-13, 1994.

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

TASCH, E.; CENDES, F.; LI, L. M.; ANDREMANN, F.; ARNOLD, D. L. Neuroimaging evidence of progressive neuronal loss and dysfunction in temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol*, 45(5): 568-76, 1999.

TEDESCHI, G.; LUNDBOM, N.; RAMAN, R. et al. Increased choline signal coinciding with malignant degeneration of cerebral gliomas: a serial proton magnetic resonance spectroscopy imaging study. *Neurosurg*, 87: 516-24, 1997.

THE WORLD HEALTH REPORT: CONQUERING SUFFERING, ENRICHING HUMANITY. World Health Organization, 1997, Geneva.

TUZ, K.; ORDAZ, B.; VACA, L.; QUESADA, O.; PASANTES-MORALES, H. Isovolumetric regulation mechanisms in cultured cerebellar granule neurons. *J Neurochem*, 79: 143-51, 2001.

TZIKA, A. A.; VIGNERON, D. B.; DUNN, R. S.; NELSON, S. L., BALL, W. S.. Intracranial tumors in children: small single-voxel proton MR spectroscopy using short- and long-echo sequences. *Neuroradiology*, 38:254-63, 1996.

URENJAK, J.; WILLIAMS, S. R.; GADIAN, D. G., NOBLE, M. Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy unambiguously identifies different neural cell types. *J Neurosci*, 13: 981-9, 1993.

USENIUS, J. P. R.; KAUPPINEN, R. A.; VAINIO, P. A. et al. Quantitative metabolite patterns of human brain tumors: detection of H NMR spectroscopy in vivo and in vitro. *J Comput Assist Tomogr*. 18(5): 705-713, 1994.

UTRIAINEN, M.; KOMU, M.; VUORINEN, V. et al. Evaluation of brain tumor metabolism with [11C] choline PET and 1H-MRS. *J Neurooncol*, 62(3): 329-38, 2003.

VAN DER KNAAP, M. S.; ROOS, B.; VALK, J. Uses of MR in inborn errors of metabolism. In: KUCHARCKZYK, J.; MOSELY, M.; BARKOVICH, A. J. Magnetic resonance neuroimaging. Boca Raton, CRC Press, 1994. p. 245-318

VOET, D.; VOET, J. G. In: *Biochemistry*. New York: John Wiley & Sons, 1989. p. 1160

WANG, P. Y.; KAUFFMANN, W. E.; KOHT, C. W.; DENCKLA, M. B.; BARKER, P. B. Thalamic involvement in neurofibromatosis type 1: evaluation with proton magnetic resonance spectroscopy imaging. **Ann Neurol**, 47(4): 447-84, 2000.

WANIEWSKI, R. A.; MARTIN, D. L. Astrocytes and synaptosomes transport and metabolize lactate and acetate differently **Neurochem Res**, 29(1): 209-17, 2004

WARDLAW, J. M.; MARSHALL, I.; WILD, J.; DENNIS, M. S.; CANNON, J.; LEWIS, S. C. Studies of acute ischemic stroke with proton magnetic resonance spectroscopy: relation between time from onset, neurological deficit, metabolite abnormalities in the infarct, blood flow, and clinical outcome. **Stroke**, 29(8): 1618-24, 1998.

WATTS, J. A.; KLINE, J. A.; THORNTON, L. R.; GRATTAN, R. M.; BRAR S. S. Metabolic dysfunction and depletion of mitochondria in hearts of septic rats. **J Mol Cell Cardiol**, 36(1): 141-50, 2004.

WIDJAJA, E.; GRIFFITHS, P. D.; WILKINSON, I. D. Proton MR spectroscopy of polymicrogyria and heterotopia. **Am J Neuroradiol**, 24(10): 2077-81, 2003.

WILKE, M.; EIDENSCHINK A.; MULLER-WEIHRICH, S.; AUER, D. P. MR diffusion imaging and H spectroscopy in a child with medulloblastoma. **Acta Radiol**, 42: 39-42, 2001.

WYSS, M.; KADDURAH-DAOUK, R. Creatine and creatinine metabolism. **Physiol Rev**, 80: 1107-1213, 2000.

ZOULA, S.; HERIGAULT, G.; ZIEGLER, A.; FARION, R.; DECORPS, M.; REMY, C. 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.

ANEXOS

The pattern of proton magnetic resonance spectroscopy in non-neoplastic brain lesions

Aceito para publicação nos *Arquivos de Neuro-psiquiatria*

Julho B -2004

The pattern of proton magnetic resonance spectroscopy in non-neoplastic brain lesions

Padrão da espectroscopia do hidrogênio por ressonância magnética nas lesões encefálicas não neoplásicas

Andréia V. Faria ¹, Fabiano Reis ¹, Verônica A. Zanardi ¹, José R Menezes ¹, Fernando Cendes ².

¹. Departments of Radiology and ². Neurology, State University of Campinas – UNICAMP.

Correspondence to: Fernando Cendes, MD, PhD

Dept. Neurologia,

Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP

Caixa Postal 6111

Cidade Universitária

Campinas SP, Brazil, CEP 13083-970

FAX: +55 19 3289-1818

Email: fcendes@unicamp.br

ABSTRACT

The purpose of this article is show the role of proton magnetic resonance spectroscopy (MRS), associated with magnetic resonance images (MRI), in the study of non-neoplastic disorders, helping in diagnosis and better characterization of the nature of the lesion. Herein, we analyzed single voxel proton spectroscopy in nine different non-neoplastic lesions, displayed in six categories (infectious, ischaemic, demyelinating, inflammatory, malformation of development and phacomatosis). The presence or the ratios of signal intensities brain tissue metabolites observed with this technique (*N*-acetyl aspartate, choline, creatine, lactate and lipids) helped in their differentiation with neoplastic lesions and helped in correct diagnosis. In infectious diseases, signals of acetate, succinate and aminoacids were also important. In conclusion, proton MRS is a noninvasive method, very useful as an additional technique to define the nature of non-neoplastic encephalic lesions.

KEYWORDS

spectroscopy, magnetic resonance, non-neoplastic encephalic lesions

RESUMO:

O propósito deste artigo é mostrar o valor da espectroscopia de hidrogênio associada a imagens de ressonância magnética (RM), no estudo de lesões encefálicas não neoplásicas, ajudando no diagnóstico e na melhor caracterização de grupos etiológicos. Analisamos espectroscopias de hidrogênio com voxel único em nove diferentes doenças não neoplásicas, divididas em seis categorias (infecciosas, isquêmicas, desmielinizantes, inflamatórias, malformações do desenvolvimento cortical e facomatoses). A presença e as relações entre a intensidade do sinal dos metabólitos do tecido nervoso observados com esta técnica (*N*-acetil aspartato, colina, creatina, lactato e lipídios) ajudaram na diferenciação de lesões neoplásicas e permitiram o diagnóstico correto. Nas doenças infecciosas, os sinais do acetato, succinato e aminoácidos também foram importantes. Concluímos que a espectroscopia do hidrogênio por RM é um método não invasivo muito útil como técnica adicional para definir a natureza não neoplásica de lesões encefálicas.

PALAVRAS-CHAVE:

espectroscopia, Ressonância magnética , lesões encefálicas não neoplásicas.

INTRODUCTION

Following the widespread recognition of magnetic resonance (MR) as a diagnostic method of central nervous system (CNS) pathologies, it was envisaged that it would be possible to have a differential diagnosis made solely through image analysis, considering the vast etiologic groups. However, because MR images are based on water signal and, in consequence, reflect the tissue hydration degree, MR appearance of such distinct pathologies as tumor or ischaemia can be vary similar. It is in this context that proton magnetic resonance spectroscopy (MRS) arises as an auxiliary method that may help to identify the nature of some encephalic lesions (1,2).

Proton MRS provides a non-invasive method for examining a wide variety of metabolites in the human brain, including *N*-acetylaspartate (NAA), a compound present only in neurons; choline-containing compounds (Cho), which participate in membrane synthesis and degradation; phosphocreatine and creatine (Cre), which play a major role in energy metabolism; lactate (lac), a resultant of increased anaerobic glycolysis; lipids, correlated with necrosis (3) and other such as succinate, aminoacids, glycine, glutamine and inositol. The acquisition of the spatially localized metabolic information available from proton spectra can be correlated with MR images and other imaging methods and may lead development of a set of physiological, anatomical and biochemical indices which may provide a powerful approach for investigating the underlying basis for many clinical disorders.

A list of pathological conditions that have been documented by proton MRS includes brain tumor, stroke, demyelinating diseases, metabolic disorders, dementia and partial epilepsies. Additional single voxel proton MRS for distinguishing neoplastic from non-neoplastic encephalic lesions raises accuracy up to 96% (4). The purpose of this work is to present proton MRS pattern of non-neoplastic brain lesions that may help in their differentiation from tumors and have the potential for avoiding invasive diagnostic procedures.

MATERIAL AND METHODS

We selected eight proton MRS that were helpful in the differentiation of neoplastic lesions from other etiologies. All exams were performed at our MR service in the University of Campinas - UNICAMP .

T1-weighted spin echo sagital images (6 mm slice, 180° flip angle, TR (relaxation time) / TE (echo time) = 550/10, 200x350 matrix, 25x25 cm field of vision - FOV) were used for planing the other acquisitions. The basic MRI protocol was axial T1-weighted spin echo images (TR/TE = 540 /12), T2-weighted double spin echo (TR/TE = 4800 /128-16) and fluid attenuation inversion recovery (FLAIR), (TR/TI inversion time) / TE = 10099 /2550 /90). Coronal and sagital SE T1-weighted images after gadolinium administration were performed when indicated. We also acquired diffusion weighted images (TR /TE = 500/ 107.542).

Single voxel proton MRS was acquired using PRESS sequence (TR/TE =1500/135 ms, number of excitation (NEX)=200). After scout anatomical images in axial planes for localization of the lesion, one single voxel (8 cm³) was placed over the center of the lesion. Prior to the acquisition, a localized shimming at the region of interest (ROI) was performed, followed by water suppression adjustment. Localized shimming was repeated two or three times, if necessary, to ensure a good field homogeneity and until the ¹H signal from water within the ROI became as narrow as possible.

Spectra were post-processed using software supplied by the machine manufacturer (Elscent Prestige 2T, Haifa, Israel). After zero-filling and baseline correction, we determined peak areas by integration of the corresponding signals from *N*-acetyl compounds (NAA) at 2.01 parts per million (ppm), choline-base compounds (Cho) at 3.2 ppm, Creatine and phosphocreatine contained compounds (Cre) at 3.0 ppm and lactate (lac) at 1.3 ppm. Other compounds such as lipids, succinate and aminoacids were studied in specific cases.

RESULTS

Figures 1 to 8 summarizes the imaging and proton MRS findings in the eight patients included in this report.

Patient 1 (figure 1): male, 15 years old patient, with headache and alteration in behavior that began 5 days before. He had a previous head trauma and subsequent CSF fistula that regressed spontaneously. Computerized tomography (CT) and MR showed a left hydrated frontal lesion with ring-like contrast enhancement and extensive surrounding edema. A necrotic tumor could be a differential diagnosis. MRS confirmed the hypothesis of abscess due to the presence of aminoacid peak and elevated succinate signal intensity. The lesion was surgically aspirated and culture revealed infection by *pneumococcus sp.*

Patient 2 (figure 2): male, 21 years old patient, evaluated after his first episode of generalized tonic-clonic seizure. CT and RM showed solitary lesion with ring-like contrast enhancement and extensive surrounding edema. MRS showed elevated succinate levels and relative maintenance of other metabolites corroborating the hypothesis of neurocysticercosis. CSF analysis showed pleocytosis and positive immunology for neurocysticercosis. There was total regression of the lesion after treatment with albendazol.

Patient 3 (figure 3): female, 41 years old patient with loss of consciousness and right hemiplegy. CT and MRI showed a large lesion in left hemisphere with bleeding points. MRS corroborated clinical and imaging hypothesis of subacute ischaemia due to lac peak and increased cho.

Patient 4 (figure 4): Female, 22 years old patient with paresthesia that began two weeks before. Neurological examination revealed left hemiparesis and hypoesthesia. RM showed a large expansive lesion in right hemisphere, with mass effect. Although neoplasm was the first hypothesis by imaging, relative maintenance of NAA peak was unusual if considering tumor. Stereotaxic biopsy showed gliosis and other non-specific inflammatory abnormalities. Clinical evolution, marked by relapses characterized by aphasia, ataxia and psychomotor slowing, and examination of the central system fluid confirmed the diagnosis of multiple sclerosis.

Patient 5 (figure 5): female, 5 years old patient. Macrocrany with subtle and progressive regression in neurological development since 1 year. Brother with the same features. MR images revealed a diffuse white matter disease. MRS showed total tissue destruction with absence of all metabolites, helping in diagnosis of vanishing white matter disease. Although MR imaging in this patient is characteristic of white matter disease, the MRS pattern described here could help in other patients and in the follow up.

Patient 6 (figure 6): female, 19 years old patient with medical resistant epilepsy. MR images showed a mass with the same characteristics of gray matter. Although this pattern is characteristic of subcortical heterotopia, the normal MRS pattern illustrated here could help in other patients with less conspicuous heterotopia.

Patient 7 (figure 7): male, 10 years old patient with type 1 neurofibromatosis: neurofibromas, cafe-au-lait macules and sphenoid dysplasia at CT. RM imaging for tumor screening showed bilateral thalamic lesion. MRS makes the hypothesis of neoplasm less likely because of the maintenance of NAA peak and the discrete Cho increase. The diagnosis of transitory basal nucleus lesions of neurofibromatosis was confirmed in follow up.

Patient 8 (figure 8): male, 17 years old patient. Epilepsia partial continua involving left hand and arm since 6 years old with slowly progressive left hemiplegy. Clinical data and discrete hemispheric asymmetry in CT and MR images indicated Rasmussen 's encephalitis. MRS supported this hypothesis showing distinct pattern between hemispheres with reduced NAA, discrete increase of Cho and increased lac in affected hemisphere.

DISCUSSION

Acetate, succinate and aminoacid multiplet – composed of valine, leucine and isoleucine - are markers of bacterial abscess (5) (figure 1) and they are not detected in necrotic tumors, such as metastasis and glioblastoma, which sometimes mimic brain abscess in conventional MR. Other type of abscess, such as tuberculous, do not show this pattern (6). In addition, the characteristic neural tissue peaks (NAA, Cho, Cre) are absent or decreased, confirming the brain tissue destruction in necrotic area.

Neurocysticercosis (figure 2) is the most common parasitic CNS infection across the world (7). When the acute lesion is single, parenchymatous, with reactive edema, it may simulate an encephalic tumor. However, succinate signal is elevated in neurocysticercosis and have been associated with the aerobic metabolism of scolices (8). Aminoacid peaks have also been found in neurocysticercosis lesions (8).

Subacute infarction (figure 3) associated with edema, mass effect and blood -brain barrier rupture is commonly confused with tumors. Lactate increase can be detected minutes after the ischaemia and continues increasing in the following hours. This pattern contributes to diagnosis and does not necessarily represent an irreversible process. Choline might be elevated in acute infarcts because the high cellular turn-over. Changes in Cre signal intensity are variable (9). Subacute infarctions show decreased NAA (as a response to neuronal loss and dysfunction) and increased lac, with progressive Choline reduction in the chronic phase. However, this last feature has a variable character (9).

The acute multiple sclerosis (figure 4) plaques may produce large mass effect with surrounding edema and blood-brain barrier rupture (pseudotumoral multiple sclerosis lesions), at times simulating neoplasm, in particular when there is only one lesion. In proton MRS they are characterized by lac increase, depending on the degree of inflammatory reaction, and by increased Cho/Cr ratios due to acute myelin break down, but usually not so intense as in neoplastic lesions (10). Chronic plaques present reduced NAA/Cr ratios in the center of the lesion, as consequence of irreversible axonal injury and partial or complete recover of NAA signal in the periphery of the lesion (11) . Therefore, a single MRS exam in acute multiple sclerosis lesions may show a very similar pattern as seen in brain tumors. However, follow up MRS exams will show distinct patterns of metabolic changes in there two conditions.

Demyelinating diseases in children show a non specific MR imaging pattern, particularly when there are lesions with ill defined borders with hyperintense signal in long TR sequences, or when there is a rupture of blood-brain barrier, with contrast enhancement (12). Proton MRS, although non specific within this large group of pathologies, may be helpful for the study of the disorder evolution (13). Canavan disease is an example of how

promising is proton MRS for investigation of metabolic disorders. The marked increase in NAA as a result of deficiency of the aspartocyclase enzyme, necessary for the break down of NAA, is a pathognomonic finding (9). In opposite, other demyelinating diseases, mainly in advanced phases, show low NAA levels and progressive decrease of signal intensity of all metabolite signals, as in vanishing white matter disease (figure 5).

Heterotopias (figure 6) may be clinically manifested as epilepsy and, in MR images, as large masses, sometimes simulating tumors. However, proton MRS shows normal peak areas or discrete relative NAA reduction (14).

In neurofibromatosis (figure 7), proton MRS assists in the differentiation of transitory white matter lesions from astrocytomas, both associated with this phacomatosis. Although in both situations there is a decrease in the NAA/Cr ratio and a significant increase in the Cho/Cr ratio, Cho increase is discrete and infrequent in the transitory white matter lesions (15,16).

The gliotic areas of Rasmussen's encephalitis (figure 8), with hyperintense T2 signal, may be confused with infiltrate process when hemispheric atrophy is not so pronounced. Proton MRS, however, shows a decrease in the NAA/Cr ratio, indicating the secondary neuronal loss observed in this instance. Lactate accumulation is associated with the repetitive neuronal epileptic activity in this disorder (17,18).

CONCLUSION

Proton MRS contributed to correct diagnosis in encephalic lesions of diverse etiologies, such as infectious, ischaemic, demyelinating, inflammatory, malformation of brain development and phacomatosis. In infectious disease, the presence of aminoacid multiplet and acetate, succinate supported the diagnosis. Other categories were differentiated by the pattern of ratios among NAA, Cr, Cho and lac in conjunction with other imaging findings.

In conclusion, proton MRS is a noninvasive method, very useful as an additional technique to define the nature of non-neoplastic encephalic lesions. Together with image analysis, it may be the key to etiologic diagnosis or, at least, definition of the group where the lesion is classified (inflammatory, infectious, demyelinating, ischaemic, dysplastic or gliotic).

REFERENCES

1. Petroff, O.A., Pleban L.A., Spencer D.D. Symbiosis between in vivo and in vitro NMR spectroscopy: the creatine, N-acetylaspartate, glutamate, and GABA content of the epileptic human brain. *Magnetic Resonance Imaging* 1995;13(8):1197-1211.
2. Kinski, L., Schnall, M. D. MR spectroscopy and the biochemical basis of neurological disease. In: Atlas, S. W. *Magnetic Resonance Imaging of Brain and Spine*. Second Edition. New York: Lippincott-Raven, 1996. p. 1619-54
3. Gill, S.S., Thomas, D.G.T., VanBrugen, N., Gadian, D.G., *et al.* Proton spectroscopy of intracranial tumors: in vivo and in vitro studies. *Journal of Computer Assisted Tomography* 1990;14(4):497-504.
4. Rand, S.D., Prost, R., Haughton, V., *et al.* Accuracy of single-voxel proton MR spectroscopy in distinguishing neoplastic from non-neoplastic encephalic lesion. *American Journal of Neuroradiology* 1997;18:1965-1704
5. Grand, S., Passaro, G., Ziegler, A. *et al.* Necrotic tumor versus brain abscess: importance of amino acids detected at ^1H MR spectroscopy – initial results. *Radiology* 1992;213:785-793.
6. Gupta, R.K., Vatsal, D.K., Chawla, S., *et al.* Differentiation of tuberculous from pyogenic brain abscess with *in vivo* proton spectroscopy and magnetization transfer MR imaging. *American Journal of Neuroradiology* 2001;22:1503 – 1509.

7. Garcia, H.H., Gonzalez, A.E., Evans, C.A., Gilman, R.H. *Taenia solium* cysticercosis. *Lancet* 2003;16(362):547-556
8. Pandit, S., Lin, A., Gahbauner, H., Libertain, C.R., Erdogan, B. MR spectroscopy in neurocysticercosis. *Journal of Computer Assisted Tomography* 2001;25(6):950 – 952.
9. Maheshwari, S.R., Fatterpekar, G.M., Castillo, M., Mukherji, S.K. Proton MR spectroscopy of the brain. *Seminars in ultrasound, CT and MRI* 2000;21(6):434-451.
10. De Stefano, N., Narayanan, S., Matthews, P.M., Francis, G.S., Antel, J.P., Arnold, D.L. In vivo evidence for axonal dysfunction remote from focal cerebral demyelination of the type seen in multiple sclerosis. *Brain* 1999;122(10):1933-1939.
11. Simone, I.L., Federico, F., Trojano, M., *et al.* High resolution proton spectroscopy of cerebrospinal fluid in MS patients - Comparison with biochemical changes in demyelinating plaques. *Journal of Neurological Sciences* 1996;144:182 –190.
12. Tzika, A.A., Ball, W.S., Vigneron, D.B., Dunn, R.S., Nelson, S.J., Kirks, D.R. Clinical proton MR spectroscopy of neurodegenerative disease in childhood. *American Journal of Neuroradiology* 1993;14(6):1267-1281
13. Castillo, M., Kwock, L., Mukherji, S.K. Clinical applications of proton MR spectroscopy. *American Journal of Neuroradiology* 1996;17:1-15.
14. Li, L.M., Cendes, F., Bastos, A.C., Andermann, F., Dubeau, F., Arnold, D.L. Neuronal metabolic dysfunction in patients with cortical developmental malformations: a proton magnetic resonance spectroscopic imaging study. *Neurology* 1998;50(3):755-759.
15. Jones, A.P., Gunawardena, W.J., Coutinho, C.M.A. ¹H MR spectroscopy evidence for the varied nature of asymptomatic focal brain lesions in neurofibromatosis type 1. *Neuroradiology* 2001; 43: 62 – 67.
16. Wang, P.Y., Kauffmann, W.E., Koht, C.W., Denckla, M.B., Barker, P.B. Thalamic involvement in neurofibromatosis type 1: evaluation with proton magnetic resonance spectroscopy imaging. *Annals of Neurology* 2000; 47 (4): 447 – 484.

17. Andermann, F. Chronic Encephalitis and Epilepsy – Rasmussen's Syndrome. Boston: Butterworth-Heinemann, 1991: 73-77.
18. Cendes, F., Andermann, F., Silver, K., Arnold, D.L. Imaging of axonal damage in vivo in Rasmussen's syndrome. Brain. 1995 ;118:753-758.

LEGENDS FOR FIGURES

Figure 1: Bacterial abscess. Large frontal rounded lesion, intensely hydrated, with an extensive surrounding edema with mass effect in T1 **(a)**, T2 **(b)** and FLAIR **(c)** weighted images with a ring-like gadolinium enhancement **(d)**. Proton MRS **(e)**, shows decrease of NAA, choline(Cho) and creatine (Cre) signals and presence of succinate (suc) and acetate (ac) signals (at 1.9-2.5 ppm); and alanine (ala) and lactate (lac) signals (at 1.3-1.5 ppm). The aminoacid multiplet (AA) at 0.9 ppm is inverted in acquisitions with TE of 135 ms, which makes easy to differentiate from lipids signal.

Figure 2: Neurocysticercosis. Subcortical lesion in left parietal region, surrounded by edema – hyperintense signal in T2- weighted image **(a)** – with a ring-like contrast enhancement **(b)**. MRS **(c)**, shows increased succinate signal at 2.4 ppm. NAA is present, probably because partial volume effect from surrounding tissue. Broad peaks and poor separation of choline (Cho) and creatine (Cre) peaks are due to proximity to skull.

Figure 3: Subacute infarction. In the left parietal region of a patient with subtle right hemiparesis, an extensive area, with ill delimited borders and mass effect, hypointense in T1-weighted images with hyperintense focus corresponding to meta-hemoglobin, due to subacute bleeding **(a)** and hyperintense in T2 **(b)** and FLAIR **(c)** weighted images. There is a pronounced gadolinium enhancement **(d)**. At MRS **(e)**, decreased NAA and creatine (Cre) signals and increased choline (Cho) and presence of lactate (lac).

Figure 4: Multiple Sclerosis. Centered in *corona radiata*, an extensive, infiltrate lesion, with large mass effect, hypointense in T1 weighted images **(a)** and hyperintense in T2 **(b)** and FLAIR **(c)**, with slight and sparse areas of contrast enhancement. Decreased NAA signal and increase in lactate (lac) are observed **(d)**.

Figure 5: Vanishing white matter disease. Obvious abnormal MR signal in white matter, hypointense in T1 (a) and hyperintense in T2 weighted images (b) which corresponds to demyelination. In FLAIR images (c), hypointense signal areas correspond to lacunes. Marked decrease or absence of all brain metabolites in MRS (d).

Figure 6: Heterotopia. Heterogeneous mass with the same signal of gray matter in T1 (a, b) and FLAIR (c) weighted images, in the right parietal regions, with an apparent mass effect deriving from deformation of the posterior horn of the right lateral ventricle. The proton MRS pattern is similar to that of the normal brain tissue (d).

Figure 7: Type 1 neurofibromatosis and typical hypoplastic sphenoid wing (a). Basal nucleus described in this disease presents hypointense signal in T1 weighted images (without contrast) with a thin hyperintense peripheral ring (b), and hyperintense signal in T2 (c) and FLAIR weighted images (d). At proton MRS (e) increased Cho/NAA ratio because a relative increase of choline (Cho) and a moderate decrease in NAA.

Figure 8: Rasmussen's encephalitis. Right insular hyperintense signal in FLAIR (a) and T2 (b) weighted images with parenchyma retraction, noted by cortical sulci asymmetry. Decreased NAA signal and increased choline (Cho) and lactate (lac) are observed relative to contralateral homologous area (c).

Figure 1

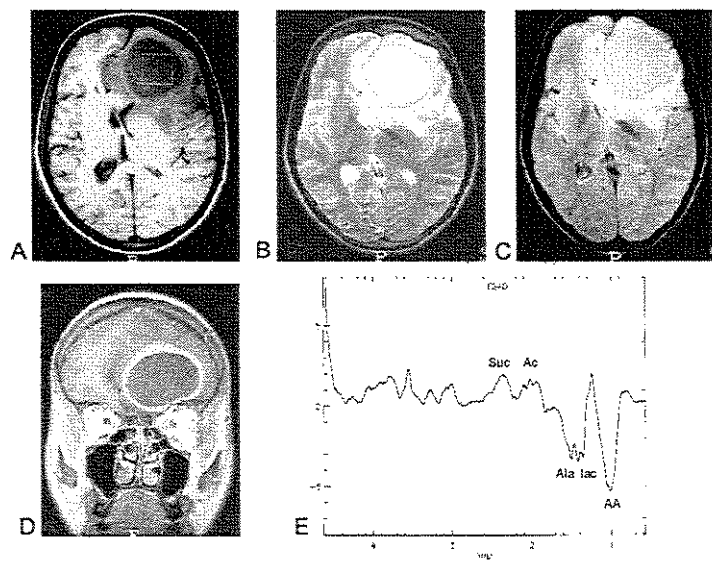


Figure 2

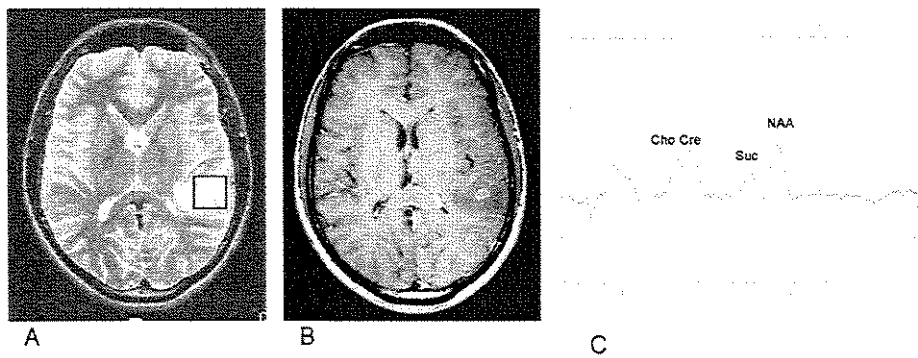


Figure 3

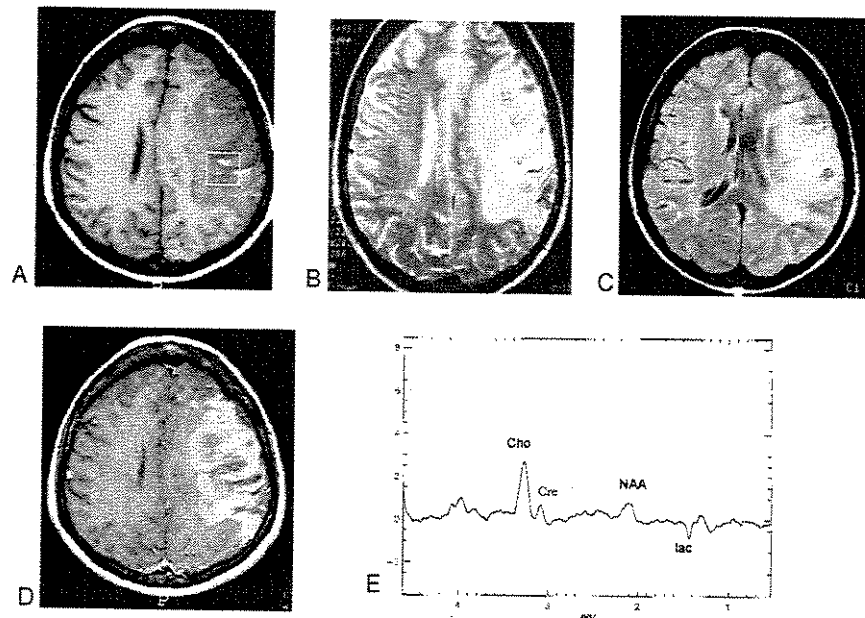


Figure 4

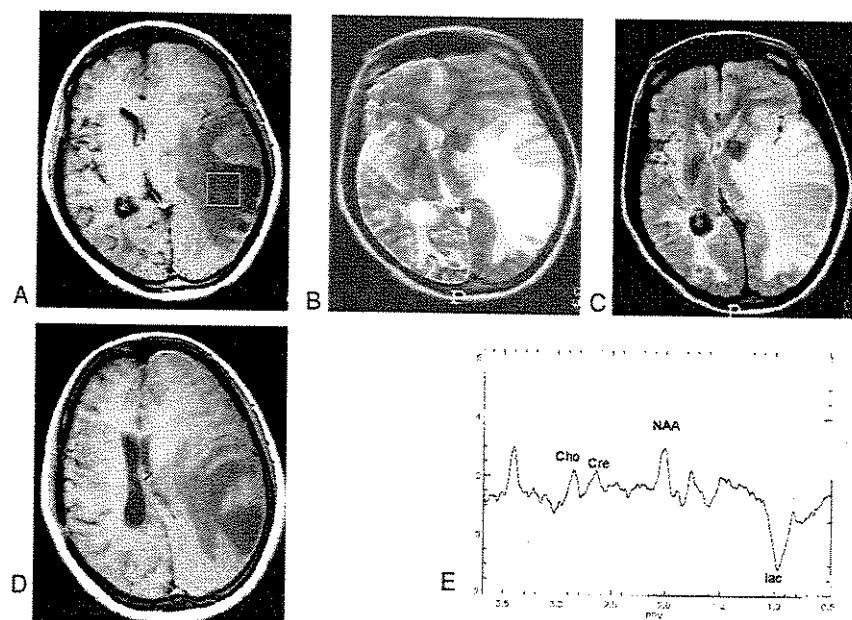


Figure 5

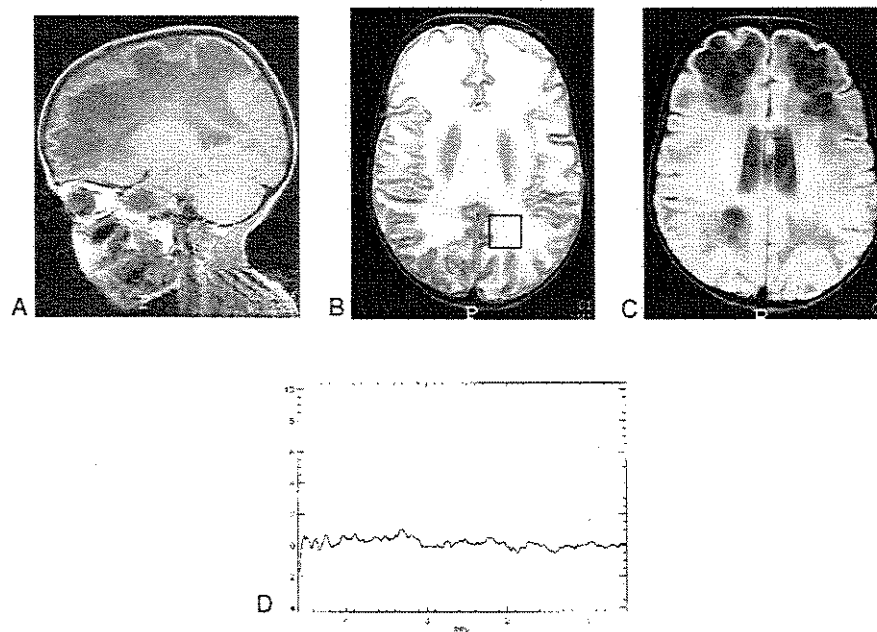


Figure 6

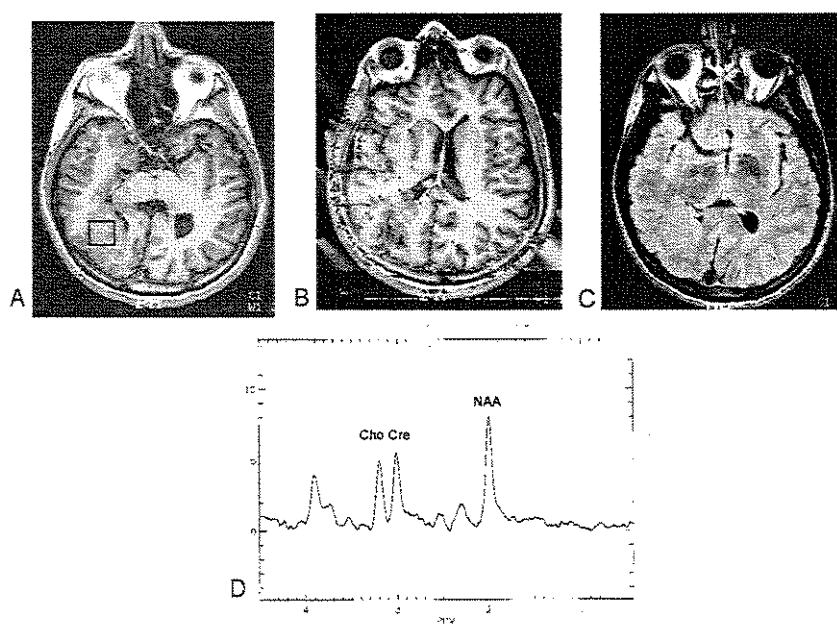


Figure 7

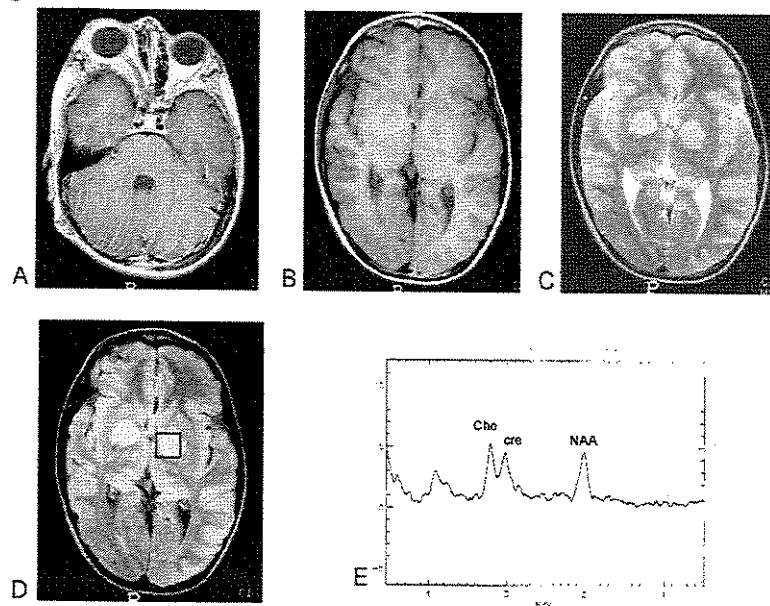
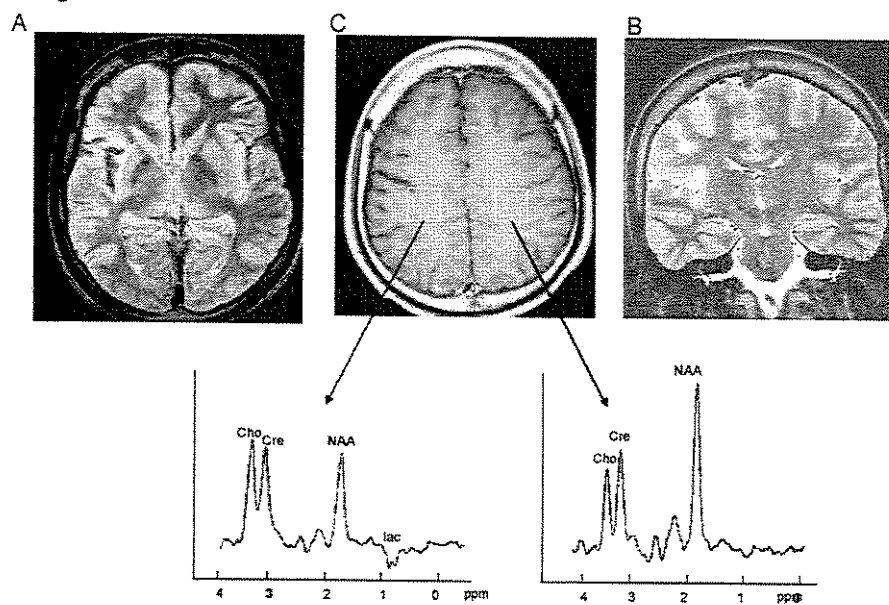


Figure 8



Proton MRS and MRI findings in a patient with CNS Paracoccidioidomycosis

Aceito para publicação no *Journal of Neuroimaging*

2004

Proton MRS and MRI findings in a patient with CNS Paracoccidioidomycosis

Andréia V. Faria, MD ¹; Guilherme C. Dabus, MD¹; Verônica A. Zanardi, MD, PhD¹;
Fernando Cendes, MD, PhD²

1. Department of Radiology and 2. Neurology, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

Running title: MRI and MRS in paracoccidioidomycosis

Word count: 981

Correspondence to: Fernando Cendes, MD, PhD

Dept. Neurologia,

Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP

Caixa Postal 6111

Cidade Universitária

Campinas SP, Brazil, CEP 13083-970

FAX: +55 19 3289-1818

Email: fcendes@unicamp.br

ABSTRACT

A patient with brain paracoccidioidomycosis whose MRI showed multiple hypo-intense T2-weighted lesions with peripheral ring gadolinium enhancement. Single voxel proton magnetic resonance spectroscopy (^1H -MRS) of one of the lesions showed two peaks at 0.9 and 1.32 ppm, corresponding to lipid signals indicating intense necrosis. The other characteristic peaks of ^1H -MRS were undifferentiated from the baseline. These findings, if repeat in other patients, although not specific, may help to differentiate these lesions from tumors and other types of abscess.

INTRODUCTION:

Paracoccidioidomycosis is the most prevalent systemic mycosis in Latin Americaⁱ. The disease usually begins in the oropharynx or lungs and may spread to the lymph nodes, liver, spleen, adrenal, lungs and central nervous system (CNS)^{ii,3}. CNS infection of paracoccidioidomycosis is usually associated with the systemic form of the illness but predominant involvement of CNS with only neurological symptoms, although rare, may occur¹⁻³. The heterogeneity of manifestations makes the diagnosis of this condition difficult and it is often misdiagnosed as other granulomatous or tumoral lesions. Invasive diagnostic procedures that are often necessary, would be prevented if more specific imaging characteristics were attributed to paracoccidioidomycosis lesions in CNS¹.

Proton magnetic resonance spectroscopy (^1H -MRS), associated with images, is a non-invasive method that may help to define the nature of different types of encephalic lesions. In some cases it can corroborate the non-tumoral etiology of a lesion and may help to differentiate between infectious and tumoral lesions when conventional MR images are indistinct.

We present herein the first description of ^1H -MRS findings in a patient with CNS paracoccidioidomycosis granulomata. In addition to help in the diagnosis of this condition, ^1H -MRS proved to be a useful method in the biochemical characterization of this type of lesion.

PATIENT AND METHOD:

A 39-year-old man complaining of dizziness that started one year before, became worse in the last five months and associated with loss of equilibrium, productive cough and a non-quantified weight loss. At this time, sputum culture showed the presence of *Paracoccidioides brasiliensis*, confirming the diagnosis of paracoccidioidomycosis.

MR images were acquired in a 2 Tesla scanner (Elscent Prestige, Haifa, Israel), in the three orthogonal planes, with T1-weighted spin echo, before and after gadolinium administration, T2-weighted fast spin echo (FSE), fluid attenuation inversion recovery (FLAIR) and diffusion weighted images.

Single voxel ^1H -MRS was acquired using PRESS sequence (TR/TE =1500/135 ms, number of excitation (NEX)=200) with one single voxel (8 cm^3) placed over the center of one of the lesions. Prior to the acquisition, a localized shimming at the ROI was performed, followed by water suppression adjustment. Localized shimming was repeated to ensure a good field homogeneity and until the ^1H signal from water within the ROI became as narrow as possible. The spectra were post-processed using software supplied by the machine manufacturer.

MRI (**Figure 1**) showed expansive encephalic lesions with hypo-intense signal in long TR-weighted images and discrete hyper-intense T1 signal, particular characteristics that differs them of the most part of tumor and infectious brain lesions, which usually presents hypointense signal in T1-weighted images and hyperintense signal in T2 weighted images. One of them in the cerebellum presented a central area of hyper-intense T2 signal, that probably corresponds to acute necrosis. All lesions showed a peripheral ring contrast enhancement.

Single voxel ^1H MRS of one of the lesions (**Figure 2**) was characterized by a high signal at 1.3 parts per million (ppm) and another at 0.9 ppm. This is the location of the methyl and methylene group signals, probably resultant of lipid cellular membrane degradation. The other characteristic cerebral metabolites studied in vivo (NAA, Cho, Cre, Lac) were absent or undifferentiated from the baseline.

DISCUSSION

Paracoccidioidomycosis is a chronic granulomatous disease caused by *Paracoccidioides brasiliensis*, compromising most frequently the lungs, reticuloendothelial system and skin. It is acquired after inhalation of the fungal spores, affecting first the superior airways and lungs. After hematogenic dissemination, other organs may be affected. The central nervous system (CNS) is affected in about 10% of the cases; however, this is likely underestimated because lesions are frequently silent and also due to difficulties in diagnosing CNS paracoccidioidomycosisⁱⁱⁱ. Clinical and laboratorial findings of neuroparacoccidioidomycosis are nonspecific and the symptoms of cranial hypertension and localized deficits predominate ⁴.

There are two forms of brain presentation: granulomatous (or pseudotumoral) and meningeal. The meningeal form is characterized by small cortical nodules and subarachnoid exudation. On CT and MRI there is a focal contrast enhancement of the gyri, characteristic of meningoencephalitis². The pseudotumoral form is composed of single or multiple parenchymal lesions, preferentially located above the tentorium but that can be situated in any region, justifying its clinical polymorphism.

The pseudotumoral lesion can be necrotic or with a granulomatous compact pattern, with limited exudation, completely solid or composed of a central necrotic area. The lesion is usually surrounded by a capsule, with a cellular infiltrate, which includes epithelioid cells, giant cells (Langhans cells), eosinophils, lymphocytes and plasma cells. This capsule presents contrast enhancement in CT and MRI. The lesion is circumscribed and does not infiltrate or disseminate through surrounding tissue ¹. Because these characteristics, necrotic lesions can be very similar to bacterial abscesses. Other differential diagnosis are granulomatous and infectious pseudotumors and necrotic expansive tumors. However, the hypointense signal on T2-weighted images occupying most of the lesion ^{iv}, due to hemoglobin degradation products and free radicals accumulation, is characteristic of paracoccidioidomycosis, and differs from the classical thin peripheral ring of hypointense T2 signal in the bacterial abscess ^v. In addition, the pattern of proton MRS spectra contributes to the diagnosis of paracoccidioidomycosis. The presence of lipid signal in proton MRS indicates necrosis and cellular membrane degradation^{vi}. The absence of all other peaks usually observed in long echo proton MRS indicates intense necrosis ^{vii}. In

particular, the absence of the neuronal marker NAA, reflects the absence of neuronal elements inside the lesion ^{6,7}. Interestingly, lactate peaks, were absent in our patient with paracoccidioidomycosis. Previous reports of cryptococcosis, toxoplasmosis and tuberculous abscesses demonstrated high peaks of lactate (which are inverted in MRS acquisitions with TE of 135 ms) and lipids^{viii;ix}. The presence of lactate peaks in association with acetate, aminoacids and succinate peaks are the usual finding in MRS of bacterial abscesses ^x.

If the proton MRS findings described here, in association with hypointense T2 signal lesions in MRI, are confirmed in other patients with paracoccidioidomycosis, it may become an important non invasive tool for differential diagnosis with other types of abscess.

FIGURES

Figure 1

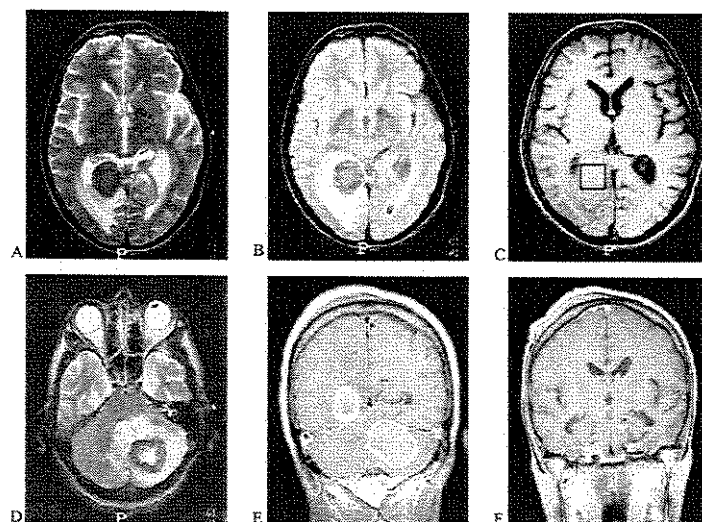
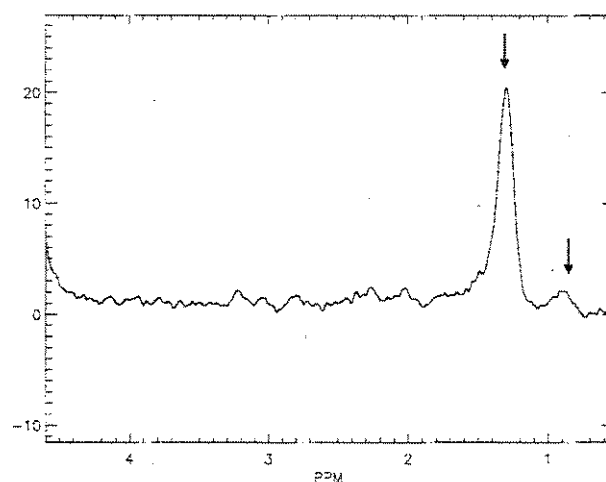


Figure 2



REFERENCES

- ⁱ Gasparetto EL, Liu CB, de Carvalho Neto A, Rogacheski E. Central nervous system in paracoccidioidomycosis: findings in 17 cases. *J Comput Assist Tomogr* 2003; 27: 12-17
- ⁱⁱ M.A. Rodacki, G. De Toni, L.A. Borba and G.G. Oliveira, Paracoccidioidomycosis of the central nervous system: CT findings. *Neuroradiology* 1995; 37: 636-641

-
- ⁱⁱⁱ Franco M, Peracoli MT, Soares A, Montenegro R, Mendes RP, Meira DA. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Top Med Mycol* 1993; 5:115-49.
 - ^{iv} Magalhaes AC, Caramelli P, Silva ED, Bacheschi LA, Lo LS, Menezes JR, Shikanai-Yasuda MA, Magalhaes A, Polachini I Jr. Magnetic resonance imaging in intracranial paracoccidioidomycosis. *J Neuroimaging* 1993; 3(4):216-9.
 - ^v Lenkinski RE, Schmal MD: MR spectroscopy and the biochemical basis of neurological disease, in Atlas SW (ed): *Magnetic resonance imaging of the brain and spine*. New York, Raven 1991, 1099-1121
 - ^{vi} Castillo M, Kwock L, Mukherji SK. Clinical applications of proton MR spectroscopy. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1996; 17:1-15.
 - ^{vii} Ott, D; Hennig, J; Ernest, T. Human brain tumors: Assessment with in vivo proton MR spectroscopy. *Radiology* 1993; 186:745-752.
 - ^{viii} Chang L., Miller BL., McBride D., Cornford M., Oropilla G., Buchthal S., Chiang F., Aronow H., Ernst T., Brain lesions in patients with AIDS: H-1 MR Spectroscopy, *Radiology* 1995;197: 525-531.
 - ^{ix} Gupta RK, Vatsal DK, Chawla S, Prasad KN, Roy R, Kumar R, Jha D, Husain M. Differentiation of tuberculous from pyogenic brain abscess with *in vivo* proton spectroscopy and magnetization transfer MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 2001; 22: 1503-1509.
 - ^x Grand S, Passaro G, Ziegler A, *et al*. Necrotic tumor versus brain abscess: importance of amino acids detected at 1H MR spectroscopy - initial results. *Radiology* 1992; 213:785-793.

Legends for figures:

Figure 1: MRI showed expansive brain lesions with hypo-intense signal in T2-weighted images (A) and FLAIR (B) with intense edema and mass effect and discrete hyper-intense T1 signal (before gadolinium injection) (C) (the box in panel C indicate the VOI for 1H-MRS acquisition shown in figure 2). One of the lesions, located in the cerebellum, presents a central area of hyper-intense T2 signal indicating intense necrosis (D). These lesions show a peripheral ring contrast (gadolinium) enhancement (E). Punctiform encephalic and brain stem lesions are also observed after gadolinium injection (F).

Figure 2: Single voxel ¹H MRS showed high signal at 1.3 parts per million (ppm) and 0.9 ppm (arrows) corresponding to lipid signals. The other characteristic cerebral metabolites studied in vivo were undifferentiated from the baseline. The VOI for 1H-MRS acquisition is shown in figure 1-C.

Biochemical patterns of brain tumors at high field ^1H NMR spectroscopy

Submetido

2004

Title: Biochemical patterns of brain tumors at high field ^1H NMR spectroscopy.

Authors: Andréia Vasconcellos Faria ¹, Fernando Macedo Junior ³, Marlon Martins dos Reis ⁴, Anita Jocelyne Marsaioli ³, Fernando Cendes ².

¹ Department of Radiology and ² Neurology, State University of Campinas, Brazil

³ Chemistry Institute, State University of Campinas, Brazil

⁴ Department of Chemical Engineer, Politechnical School, State University of São Paulo, Brazil.

Corresponding author: Fernando Cendes, MD, PhD

Dept. Neurologia,

Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP

Caixa Postal 6111, Cidade Universitária

Campinas SP, Brazil, CEP 13083-970

Phone number: +55 19 3788-7292

FAX number: +55 19 3289-1818

email: fcendes@unicamp.br

SUMMARY

Hydrogen nuclear magnetic resonance (^1H NMR) spectroscopy is a non invasive method and represents a powerful tool in tumor diagnosis. High field ^1H NMR spectroscopy can be used to study metabolic changes and pathways that characterize distinct pathologies or different degrees of aggressiveness in the same histological tumor type. We analyzed brain tissue samples from patients with different types of brain tumors by high field ($B_0 = 11,7$ T) ^1H NMR spectroscopy. The Partial Least Square Discriminant Analysis revealed glycine, inositol and acetate as the principal metabolites responsible by differentiation according degree of aggressiveness in neuroglial tumors. Metastasis showed very low signal intensities of inositol. Other compounds, including creatine, *N*-acetyl aspartate, choline and lactate, differentiated tumoral from controls samples. These results reflect destruction of normal tissue and metabolic abnormalities in tumor cells that can be related with their high turn-over, dedifferentiation, ability to survive in adverse environments (hypoxia, osmotic and metabolic stress) and resistance for apoptosis. Furthermore characterization of individual metabolites by ^1H -NMR *in vitro* related to specific histological subtypes of brain tumors may be relevant for optimizing *in vivo* MR proton spectroscopy protocols.

INTRODUCTION

Over the last ten years, primary brain tumors have been responsible for 2.4% of all cancer deaths. After leukemia, brain tumors are the most frequent neoplasm in children, accounting for about 18% of all cancers¹. Rising incidence of brain tumors can be in part attributed to more accurate diagnosis, especially with magnetic resonance imaging and more recently with clinical applications of ^1H NMR* spectroscopy.

^1H NMR spectroscopy performed in low magnetic fields provides a noninvasive method of examining a wide variety of metabolites in the human brain *in vivo*^{2,3,4,5}. The interpretation of obtained spectra can be greatly facilitated by parallel high field nuclear magnetic resonance spectral analysis of tissue extracts from biopsy specimens^{6,7,8,9,10}. The use of high magnetic field, in these later studies, results in much better resolved spectra than those obtained *in vivo* and is particularly useful for the identification and measurements of metabolites. In addition, the accuracy of high field ^1H NMR spectroscopy allows a better determination of biochemical patterns of brain tumor specimens and direct correlation with histology.

The purpose of this research was to investigate surgically resected brain tumor samples by high resolution ^1H NMR spectroscopy. We wanted to correlate the metabolite abnormalities with the different types of tumors defined by histology, and to investigate possible surrogate markers of pathological pathways for different types of brain tumors.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

We analyzed by high field ^1H NMR spectroscopy, 48 brain tissue samples from 45 patients who underwent surgical treatment of brain tumors and 3 patients operated for medical resistant partial epilepsy. Patients, ranging from 10 months to 66 years, were submitted to imaging investigation and surgery following current standards for diagnosis and treatment of brain tumors and epilepsy. A contrast enhanced computerized tomography scan and magnetic resonance imaging were consisted with the presence of a brain tumor and they underwent open biopsy or tumor resection.

All surgical specimens were processed for routine histopathology and the classification of the tumor type was performed following guidelines of World Health Organization (WHO)¹¹. Histopathological analyses were also performed in fragments of the samples used for ¹H NMR spectroscopy to control for the exact histological type of the samples. This procedure is particularly relevant in astrocytomas due to the variation in the histological composition in different areas of the tumor.

Tissue histology revealed astrocytomas (grades I to IV) in 14 patients, meningiomas in 8 patients, metastasis in 5 patients and other types of tumors in 18 patients (4 oligodendroglioma, 1 xantastrocytoma, 1 neurocytoma, 2 schwannomas, 3 adenomas, 2 medulloblastomas, 1 papilomas, 2 craniopharyngeomas, and 2 epidermoides). The histology of surgical specimens provided by patients with partial epilepsy revealed heterotopia in one and gliosis in two (with mesial temporal sclerosis) and the samples used to ¹H RMN were taken from macroscopic normal areas, as far as possible from the focal lesion. We included two samples of each patient with mesial temporal sclerosis.

The samples were frozen in liquid nitrogen immediately after surgical removal to minimize early changes resulting from ischemia¹², and then stored at -80 °C. Frozen tissues were weighted, crushed under liquid nitrogen and then extracted with cold aqueous perchloric acid (0,3 M, 10:1 volume:weight). The homogenate were centrifuged (3000 x g, 10 minutes, 0°C). The supernatant were collected, neutralized with 1,5 M KOH (pH adjusted to 7.2) and the neutral supernatants were lyophilized. The NMR samples were prepared by dissolving 50 mg of lyophilized brain tumor extract in 0.6 ml of D₂O containing sodium *d*₄-trimethylsilylpropionate (0.625 mMolL⁻¹). This solution was sonicated, centrifuged (3000 x g, 10 minutes, 25°C) and then, put in a 5 mm NMR** tube^{13,14}.

The ¹H NMR spectra were acquired with a Varian INOVA-500 spectrometer (*B*₀ = 11,7 T), operating at 499,886 MHz for ¹H using a 5mm triple resonance (H,C,N) inverse probe with z-gradient. Each experiment was acquired with 128 transient at 25 °C. The intense residual water signal was suppressed using selective excitation (90° pulse) followed by pulsed field gradient on z axis (wet1d).

The original NMR spectra were smoothed by Wavelet analysis¹⁵ followed by a baseline correction. The resulting spectra were arranged in a two way matrix (X), where each row corresponds to the spectrum signal amplitudes, and the columns correspond to the chemical shifts in Hertz. The metabolites present in extracts are responsible for one or more signals with chemical shifts and amplitudes that are related to their chemical structures and concentration, respectively. The NMR data set aimed at detecting the sample differences and similarities due to composition variations.

The exploratory data analysis was performed by Partial Least Square Discriminant Analysis^{16,17}, where a response matrix Y of n rows (corresponding to the spectra in matrix X) and k columns (corresponding to the number of tumors types) was built as follow: in the row i of Y ($i = 1, \dots, n$), 1 was placed at the k th column and 0 in all remaining columns if the corresponding i th spectra of X belongs to class k . Consequently, B is evaluated fitting $Y=XB$. This data analysis indicates those frequencies in B , which are important to discriminate the classes in Y . In a first approach, the samples were divided in three groups: high grade neuroglial tumors (containing high grade astrocytomas and anaplastic oligodendrogliomas), low grade neuroglial tumors (containing low grade astrocytomas and oligodendrogliomas) and non-neuroglial tumors (containing meningiomas, adenomas and schwannomas). The last data analyses were performed with non-normalized spectra to enhance the results depending on the compound concentrations. Independent analyses with the original spectra were performed using the same groups above and comparing metastasis with high grade, low grade neuroglial tumors and control group. All computation was performed in the program 'R' (www.r-project.org), and package Wavetresh for R to perform the wavelet analysis.

RESULTS

During the data analysis we observed small chemical shift deviations due to pH variations of the samples, but these drifts did not prevent the identification of the metabolites responsible for discrimination among the groups of samples presented below.

High grade neuroglial tumors have higher acetate (ace) levels and larger glycine / inositol ratios when compared to low grade tumors (Figures 1 and 2). Very low signal intensities of inositol discriminated metastasis from neuroglial high grade, low grade tumors and control group (Figure 3).

Increased lactate and decreased creatine signals allowed to differentiate normal controls from tumors, in agreement with previous studies^{18,19,20,21,22}. *N*-acetyl aspartate levels decreased in all types of tumor and acetate and choline levels increased according aggressiveness degree in neuroglial tumors, also contributing to differentiate tumors from control samples and neuroglial tumors according aggressiveness (Figure 4).

DISCUSSION

The different biochemical patterns detected in these ¹H RMN experiments, further related with normal tissue destruction and high cellular turn-over of tumor cells, may reflect some of the mechanisms of tumor survival, such as their resistance to adverse ambient conditions and their mechanisms to avoid apoptosis.

Inositol, an osmolyte of plasma membranes²³, increases during cell death, particularly in astrocytic tumors²⁴, but is missing in necrotic areas²⁵. However, our findings indicate that there is a decreased signal intensity of inositol in aggressive tumors, also in areas without necrosis. In addition, there are recent evidences that inositol may have protective effect against carcinogenic dedifferentiation and an anti-apoptotic action^{26,27}. Thus, the absence or very low signal intensities of inositol in metastasis and in aggressive neuroglial tumors, rather than indicating only necrosis, may also be related to the dedifferentiation and apoptotic defect.

On the other hand, glycine prevents cell death²⁸ through anti-apoptotic activity^{29,30,31}. Increased levels of glycine are related with increasing malignance in extracts of astrocytomas⁹. Glycine, and other amino acids, has been shown to protect cells exposed to nutrient starvation and hyperosmolarity³², a situation that occurs in tumor cells³³. Glycine also plays a role in mitochondrial permeability transition, a mechanism involved in the control of cell autophagy³⁴. Consequently, increased glycine could be related with inhibition of apoptosis, and may contribute to cell survival in adverse environment.

Increased glycine and acetate levels may also be a consequence of their under-utilization in the tricarboxylic acid (TCA) cycle in tumor cells^{35,36,37}. The depression of aerobic pathway is a known phenomenon in tissues with high cellular mitotic ratios. Classical biochemical studies have demonstrated that the vast majority of human and animal tumors display a high rate of glycolysis under aerobic conditions (Warburg effect), an observation that has repeatedly been confirmed^{38,39,40,41,42}. Additionally, there are evidences that hypoxia is not only a consequence of fast tumor growth but also may contribute to cell dedifferentiation⁴³.

The predominant glycolysis in tumors lead to high lactate levels. However, caution should be taken for *in vitro* considerations due to lactate fast accumulation during and after the surgical processes¹².

Alterations in oxidative phosphorylation may be also responsible by low creatine levels in tumors. Creatine is a secure marker of endogenous metabolism and energetic state of brain cells because its permeability of the blood-brain barrier is limited^{44,45}. Creatine reduction in aggressive neuroglial tumors could be related to exhaustion of the energy reserves from rapid cell proliferation and ischemia⁴⁶. However, this assumption does not explain low creatine levels in non neuroglial tumors⁴⁷, which is probable consequence of low levels that normal nonneuroglial cells present.

Decreased *N*-acetyl aspartate levels in all types of tumors, in addition to indicate absence of mature neurons^{48,49}, may also reflect an impaired energy production discussed above since *N*-acetyl aspartate is synthesized in mitochondria⁵⁰. Furthermore, it has a fast turnover and an important role in the intercompartment osmoregulatory system^{51,52} and may be involved in osmotic resistance mechanisms of tumor cell.

Increased acetate⁵³ and choline⁵⁴ levels may also be related to the high cellular turn-over in tumoral cells. Our results showed a correlation between degree of aggressiveness in neuroglial tumors and choline levels (figure 4). These observations are supported by *in vivo* progressive increase of choline levels in malignant degeneration of gliomas⁵⁵.

Our results demonstrate, for the first time, that glycine, inositol and acetate levels *in vitro* correlate with degree of aggressiveness of neuroglial tumors and that metastasis have low signal intensities of inositol. We also confirmed previous *in vivo* and *in vitro* observations^{56,57} that creatine, choline, NAA and lactate levels differentiate tumoral from control samples.

Further characterization of individual metabolites *in vitro* related to specific histological subtypes of brain tumors may be relevant for optimizing *in vivo* proton MR spectroscopy protocols. Furthermore, these data provide an additional insight about tumor survival mechanisms, reflecting alterations related with cell dedifferentiation and their skills in avoiding apoptosis and surviving in adverse environment; which are, in summary, the abilities that characterize tumor cells.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the staff of neurosurgery at University of Campinas for allowing us to have access of samples of brain tumors. We thank Dr. Fred Yukio Fujiwara and Dr. Luciano Queiroz for valuable discussions and Dr. Antonio Gilberto Ferreira for skilful technical assistance. Fernando Macedo received a scholarship from FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

REFERENCES

- 1 The world health report (1997) Conquering suffering, enriching humanity. Geneva. World Health Organization
- 2 Henriksen, O. (1995) *NMR Biomedicine* **8**,139-148
- 3 Hanstock, C. C., Rothman, D. L., Prichard, J. W., Jue, T., Shulman, R. G. (1988) *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **85**,1821-1825
- 4 Gill SS, Small RK, Thomas DG, Patel P, Porteous R, Van Bruggen N, Gadian DG, Kauppinen RA, Williams SR (1989) *NMR Biomed.* **2**,196-200
- 5 Segebarth, C. M., Balereaux, D. F., Luvten, P. R., den Hollander, J. A. (1990) *Magn. Reson. Med.* **13**,62-76
- 6 Lehnhardt, F. G., Rohn, G., Ernestus, R. I., Grune, M., Hoehn, M. (2001) *NMR Biomed.* **14**, 307-17
- 7 Roda, J. M., Pascual, J. M., Carceller, F., Gonzalez-Llanos, F., Perez-Higueras, A., Solivera, J., Barrios, L., Cerdan, S. (2000) *Clin Cancer Res.* **6**, 3983-93

- 8 Tosi, M. R., Fini, G., Tinti, A., Reggiani, A., Tugnoli, V. (2002) *Int J Mol Med.* **9**, 299-310
- 9 Peeling J, Sutherland G (1992) *Magn. Reson. Med.* **24**,123-136
- 10 Certaines, J. D., Boveé, W. M. M. J., Podo, F. (1992) *Magnetic Resonance Spectroscopy in Biology and Medicine*, Pergamon Press Ltda, Oxford
- 11 Kleihues, P., Burger, P. C., Scheithauer, B. W. (1993) *Brain Pathol.* **3**, 255-68.
- 12 Petroff, O. A., Ogino, T., Alger, J.R. (1988) *J Neurochem.* **51**, 163-71
- 13 Peeling, J., Sutherland, G. (1993) *Neurology* **43**,589-594
- 14 Petroff, O. A., Errante, L. D., Rothman, D. L., Kim, J. H., Spencer, D. D. (2002) *Epilepsia* **43**, 703–710
- 15 Johnstone, I. M., and Silverman, B. W. (1997) *J. Roy. Statist. Soc.* **59**, 319-351.
- 16 Indahl, U. G., Sahni, N. S., Kirkhus, B., Naes, T. (1999) *Chemom. Intell. Lab. Sys.* **49**, 19-31.
- 17 Louwerse, D.J., Tates, A. A., Smilde, A. K., Koot, G. L. M., Berndt, H. (1999) *Chemom. Intell. Lab. Sys.* **46**, 197-206.
- 18 Ott, D., Hennig, J., Ernst, T. (1993) *Radiology* **186**, 745-752
- 19 Demaerel, P., Johannik, K., Van Hecke, P., Van Ongeval, C., Verellen, S., Marchal, G., Wilms, G., Plets, C., Goffin, J., Van Calenbergh, F., Lammens, M., Baert, A. L. (1991) *J. Comput. Assist. Tomogr.* **15**, 67-76
- 20 Krumschnabel G., Schwarzbaum, P. J., Lisch, J., Biasi, C., Wieser, W. (2000) *J. Exper. Biol.* **203**, 951–959
- 21 Luyten, P.R., Marien, A.J., Heindel, W., van Gerwen, P.H., Herhols, K., Hollander, J.A., Friedmann, G., Heiss, W.D. (1990) *Radiology* **176**, 791-799
- 22 Mostert, H. W., de Both, N. J., Rhijnsburger, E. H., Mackay, W. M., van den Berge, J. H., Stefanko, S. Z. (1986) *Acta Neuropathol.* **70**, 296-301
- 23 Moore, C. M., Breeze, J. L., Kukes, T. J., Rose, S. L., Dager, S. R., Cohen, B. M., Renshaw, P. F. (1999) *Biol. Psychiatry.* **45**, 1197-202.
- 24 Gutowski, N. K., Gómez-Ansón, B., Torpey, N., Revesz, T., Miller, D. H., Rudge, P. (1999) *Neuroradiol.* **41**, 650-653
- 25 Norfray, J. F., Tomita, T., Byrd, S. E., Ross, B. D., Berger, P. A., Miller, R. S. (1999) *Am J Roentgenol.* **173**, 119-25.
- 26 Jyonouchi, H., Sun, S., Iijima, K., Wang, M., Hecht, S. S. (1999) *Carcinogenesis* **20**, 139-45
- 27 Lee, Y. I., Kang-Park, S., Do, S. I., Lee, Y. I. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 16969-77
- 28 Kim, J. S., Qian, T., Lemasters, J. J. (2003) *Gastroenterol.* **124**, 494-503
- 29 Franek, F., Fismolova, I., Eckschlager, T. (2002) *Arch. Biochem. Biophys.* **398**, 141-6
- 30 Moreno-Manzano, V., Lucio-Cazana, J., Konta, T., Nakayama, K., Kitamura, M. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **277**, 293-8
- 31 Sharipo, A., Imreh, M., Leonchiks, A., Imreh, S., Masucci, M. G. (1998) *Nat. Med.* **4**, 939-44
- 32 deZengotita, V. M., Abston, L. R., Schmelzer, A. E., Shaw, S., Miller, W. M. (2002) *Biotech Bioen* **78**, 741-52
- 33 Tuz, K., Ordaz, B., Vaca, L., Quesada, O., Pasantes-Morales, H. (2001) *J. Neuroch.* **79**, 143-51

-
- ³⁴ Lemasters, J. J., Qian, T., He, L., Kim, J. S., Elmore, S. P., Cascio, W. E., Brenner, D. A. (2002) *Antiox Redox Signal* **4**, 769-81
- ³⁵ Gillham, B., Papachristodoulou, D. K., Thomas, J. H. (1997) *Wills' Biochemical Basis of Medicine*, third edition, Butterworth Heinemann eds., Oxford, pp. 60
- ³⁶ Lebon, V., Petersen, K. F., Cline, G. W., Shen, J., Mason, G. F., Dufour, S., Behar, K. L., Shulman, G. I., Rothman, D. L. (2002) *J. Neurosci.* **22**, 1523-31.
- ³⁷ Pascual, J. M., Carceller, F., Roda, J. M., Cerdan, S. (1998) *Stroke* **29**, 1048-56
- ³⁸ Dang, C. V., Semenza, G. L. (1999) *Trends Biochem Sci* **24**, 68-72
- ³⁹ Ravi, R., Mookerjee, B., Bhujwalla, Z. M., Sutter, C. H., Artemov, D., Zeng, Q., Dillehay, L. E., Madan, A., Semenza, G. L., Bedi, A. (2000) *Genes Develop.* **14**, 34-44.
- ⁴⁰ Huang, L. E., Bunn, H. F. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 19575-8
- ⁴¹ Gray, A. Y., Troll, J. V., Somero, G. N. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 1993-1998
- ⁴² Seagroves, T. N., Ryan, H. E., Lu, H., Wouters, B. G., Knapp, M., Thibault, P., Laderoute, K., Johnson, R. S. (2001) *Mol. Cel. Biol.* **21**, 3436-3444.
- ⁴³ Jogi, A., Ora, I., Nilsson, H., Lindeheim, A., Makino, Y., Poellinger, L., Axelson, H., Pahlman, S. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 7021-7026
- ⁴⁴ Braissant, O., Henry, H., Loup, M., Eilers, B., Bachmann, C. (2001) *Brain Res Mol Brain Res* **86**, 193-201.
- ⁴⁵ Petroff, O. A. C., Errante, L. D., Kim, J. H., Spencer, D. D. (2003) *Neurology* **60**, 1646-1651
- ⁴⁶ Tzika, A. A., Vigneron, D. B., Dunn, R. S., Nelson, S. L., Ball, W. S. (1996) *Neuroradiol.* **38**, 254-263
- ⁴⁷ Tzika, A. A., Zurakowski, D., Young, C., Poussaint, T., Goumnerova, L., Astrakas, L. G., Barnes, P. D., Anthony, D. C., Billet, A. L., Tarbell, N. J., Scott, R. M., Black, P. M. (2001) *Neuroradiol.* **43**, 169-177
- ⁴⁸ Miller, B. L. (1991) *NMR Biomedicine* **4**, 47-52
- ⁴⁹ Gill, M., Miller, S. L., Evans, D., Scatliff, J. H., Meyerand, M. E., Powers, S. K., Kwoock, L (1994) *Invest. Radiol.* **29**, 301-306.
- ⁵⁰ Bates, T. E., Strangward, M., Keelan, J., Davey, G. P., Munro, P. M., Clark, J. B. (1996) *NeuroReport* **31**, 1397-400.
- ⁵¹ Baslow, M. H. (2000) *J. Neurochem.* **75**, 453-9.
- ⁵² Baslow, M. H. (2003) *Neurochem. Res.* **28**, 941-53.
- ⁵³ Waniewski, R. A., Martin, D. L. (1998) *J. Neurosci.* **18**, 5225-33
- ⁵⁴ Castillo, M., Kwock, L., Mukherji, S. K. (1996) *Am. J. Neuroradiol.* **17**, 1-15
- ⁵⁵ Tedeschi, G., Lundbom, N., Raman, R., Bonavita, S., Duyn, J. H., Alger, J. R., Chiro, G. D. (1997) *J. Neurosurg.* **87**, 516-524
- ⁵⁶ Preul, M. C., Carmanos, Z., Collins, D. L., Villemure, J. G., Leblanc, R., Olivier, A., Pokrupa, R., Arnold, D. L. (1996) *Nat. Med.* **2**, 323-325
- ⁵⁷ Rutter, A., Hugenholtz, H., Saunders, J. K., Smith, I. C. (1995) *J. Neurochem.* **64**, 1655-61
-

FOOTNOTES:

The abbreviators used were: ^1H NMR: hydrogen nuclear magnetic resonance

** NMR: nuclear magnetic resonance

FIGURE LEGENDS:

Figure 1: Partial Least Square Discriminant Analysis (columns of Y) (A) open circles '○' high grade neuroglial tumors, full circles '●' non-neural tumors and stars '✱' low grade neuroglial tumors, and regression coefficient (Loadings- columns of the matrix B) for the Partial Least Square Discriminant Analysis (B).

Figure 2: Composition of the regions of glycine and inositol neuroglial tumors samples (A) and a full typical sample spectrum (B-1); Amplification of the 3.50 – 3.60 region (B-2) of a low grade astrocytoma sample and (B-3) of a high grade astrocytoma sample.

Figure 3: Amplification of the 3.50 – 3.60 spectral region of controls, metastasis, high and low grade astrocytoma tumors.

Figure 4: Partial Least Square Discriminant Analysis (columns of Y) (A) open circles '○' high grade neuroglial tumors, full circles '●' non-neuroglial tumors, stars '✱' low grade neuroglial tumors, triangles 'Δ' control samples, and regression coefficient (Loadings- columns of B) for the Partial Least Square Discriminant Analysis (B).

Figure 1

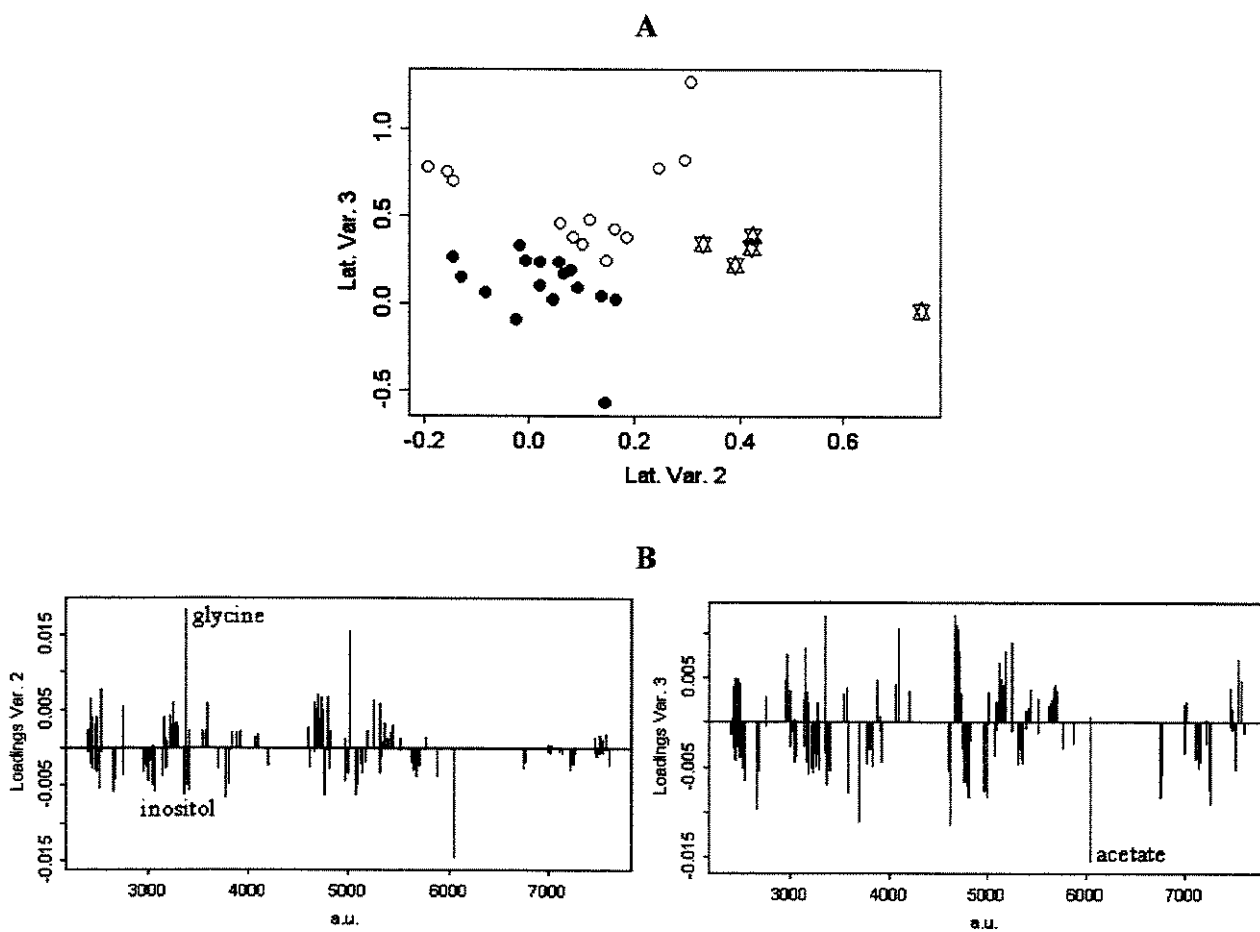


Figure 2

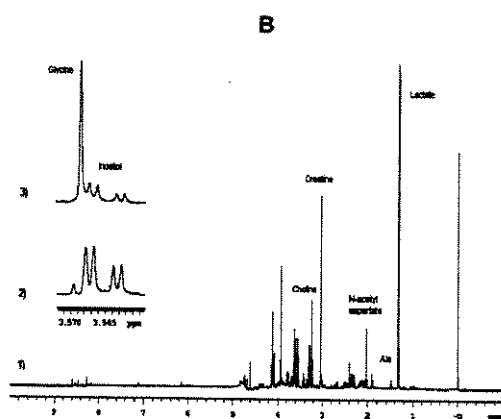
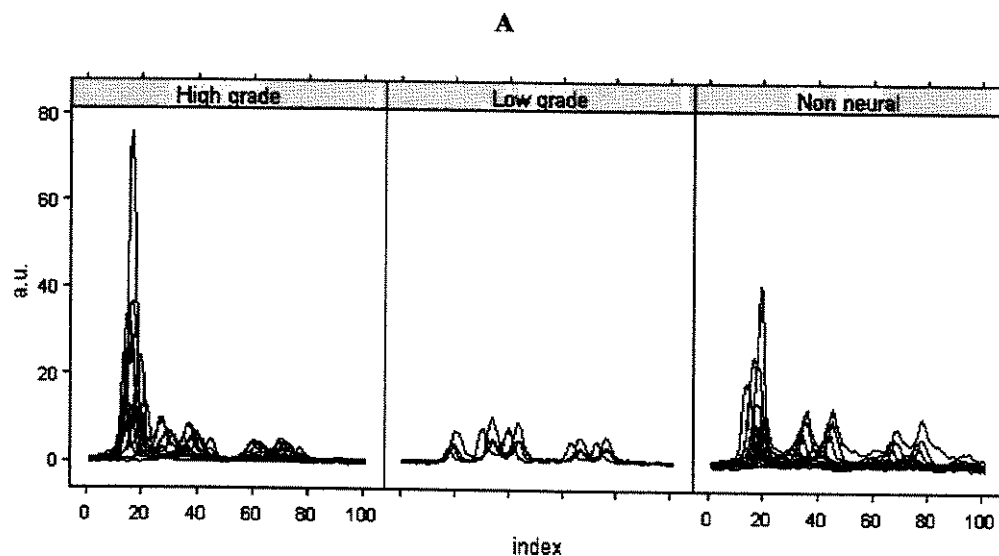


Figure3

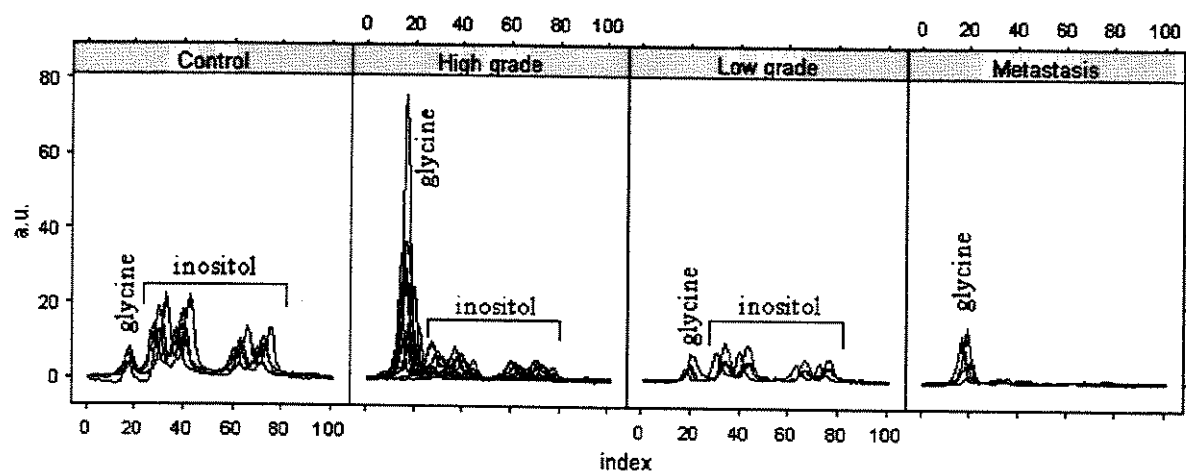


Figure 4

