HAE WON LEE

Avaliação da doença de Alzheimer através da
espectroscopia de prótons por ressonância magnética:
comparação entre os achados
no cíngulo posterior e nos hipocampos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Radiologia

Orientadora: Profa. Dra. Claudia da Costa Leite

São Paulo

2005

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lee, Hae Won

Avaliação da doença de Alzheimer através da espectroscopia de prótons por ressonância magnética : comparação entre os achados no cíngulo posterior e nos hipocampos / Hae Won Lee. -- São Paulo, 2005.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Radiologia.

Área de concentração: Radiologia.

Orientadora: Claudia da Costa Leite.

Descritores: 1.ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA
2.DOENÇA DE ALZHEIMER 3.GIRO DO CÍNGULO 4.HIPOCAMPO

USP/FM/SBD-280/05

Dedicatória

Ao meu marido Fábio, pelo amor, carinho, apoio e compreensão
em todos os momentos de nossas vidas.

Aos meus pais, por construírem a base de tudo o
que hoje sou e conquistei.

À minha mãe, de modo especial, pelo amor e
apoio incondicionais.

Aos meus irmãos, pelo amor e apoio constantes.

Agradecimentos

À minha orientadora, **Profa. Dra. Claudia da Costa Leite**, pela orientação, apoio e estímulo para a realização desta pesquisa, pelos ensinamentos e início da minha carreira na neurorradiologia. Agradeço, especialmente, a amizade e o incentivo constantes. Sempre um exemplo como profissional e como pessoa, seus ensinamentos não se restringem à neurorradiologia.

Ao meu co-orientador, **Dr. Paulo Caramelli**, pelo auxílio constante na elaboração deste estudo nas diversas etapas. Sua ativa contribuição no encaminhamento dos pacientes, o tempo dispensado para avaliação clínica dos mesmos e a prontidão para ajudar em todas as ocasiões solicitadas foram de um valor inestimável. Por meio desta pesquisa, pude conhecer melhor este admirável profissional.

À **Dra. Maria Concepción Garcia Otaduy**, pela amizade, auxílio e ensinamentos fundamentais na elaboração deste estudo.

Ao **Dr. Leandro Tavares Lucato**, pelas importantes contribuições para o enriquecimento deste trabalho, pela agradável companhia, bom humor, amizade e incentivo constantes.

Aos **Professores Doutores Ricardo Nitrini e Geraldo Bussato** e à **Dra. Maria Cristina Chammas**, pelas valiosíssimas contribuições no enriquecimento deste estudo.

Aos **colegas neurologistas do ambulatório de Neurologia Cognitiva e do Comportamento e do CEREDIC** (Centro de Referência em Distúrbios Cognitivos), pelo encaminhamento de pacientes e confiança no potencial deste trabalho.

À senhora **Meire** (voluntária), do ambulatório de Neurologia Cognitiva e do Comportamento, e à **Simone** (secretária do CEREDIC), pelo auxílio prestativo nas consultas de prontuários.

Aos **técnicos, biomédicos, equipe da enfermagem e equipe administrativa do Setor de Ressonância Magnética do HCFMUSP**, pela ajuda na execução dos exames deste estudo.

À Senhora **Sandra**, secretária da pós-graduação do INRAD, pelo auxílio solícito.

Aos **colegas do Fleury e Digimagem**, pela colaboração e compreensão que tanto contribuíram para a realização deste estudo.

Aos **voluntários**, pelo tempo e paciência dispensados de maneira sempre generosa.

Aos **pacientes com doença de Alzheimer e aos seus familiares**, pela colaboração na realização deste estudo. O contato com eles foi muito enriquecedor e constituiu um forte estímulo para esta pesquisa.

Agradecimentos especiais à minha sogra e aos meus cunhados, pelos bons momentos compartilhados e pela compreensão nas ausências relativas causadas pela realização deste trabalho.

Esta tese está de acordo com:

Referências: *adaptada de International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Index Medicus*.

Sumário

	página
Lista de abreviaturas	xiii
Lista de símbolos	xv
Lista de tabelas	xvi
Lista de gráficos	xviii
Lista de figuras	xx
Resumo	xxi
<i>Summary</i>	xxiii
1 Introdução	1
2 Objetivos	6
3 Revisão da literatura	8
3.1 Definição	9
3.2 Histórico da doença de Alzheimer	9
3.3 Prevalência e incidência da doença de Alzheimer	11
3.4 Genética da doença de Alzheimer	12
3.5 Neuropatologia e patogenia da doença de Alzheimer	12
3.6 Quadro clínico da doença de Alzheimer	21
3.7 Tratamento da doença de Alzheimer	24
3.8 Diagnóstico da doença de Alzheimer	25
3.9 Papel dos exames de imagem na doença de Alzheimer	30
3.10 Espectroscopia de prótons por RM na doença de Alzheimer	32
4 Casuística e métodos	48
4.1 Casuística	49
4.2 Métodos	55
4.2.1 Localizações e dimensões dos volumes de interesse ..	57
4.2.2 Escolha dos metabólitos analisados	61
4.2.3 Processamento	61
4.2.4 Análise estatística	64

5 Resultados	66
5.1 Descrição dos grupos	67
5.2 Descrição dos achados de espectroscopia	72
5.2.1 Coeficientes de variação dos metabólitos	73
5.2.2 Análise regional da largura média dos picos entre metabólitos	74
5.2.3 Análise das relações entre metabólitos no cíngulo posterior	77
5.2.4 Análise das relações entre metabólitos nos hipocampos	78
5.2.5 Análise da sensibilidade e especificidade das relações entre metabólitos	80
5.2.6 Diferenças regionais do padrão metabólico entre o cíngulo e os hipocampos	84
5.2.7 Análise da correlação entre as relações entre metabólitos e o MEEM	87
6 Discussão	92
6.1 Descrição dos grupos	93
6.2 Coeficientes de variação dos metabólitos	95
6.3 Análise regional da largura média entre os picos dos metabólitos	95
6.4 Comparação das relações entre metabólitos na discriminação entre o grupo de pacientes e controles MEEM	96
6.5 Análise da associação das relações dos metabólitos com o MEEM	105
6.6 Diferenças regionais do padrão metabólico entre o cíngulo e os hipocampos	106
7 Conclusões	108
8 Anexos	110
9 Referências	134

Listas

Lista de abreviaturas

AMARES	<i>advanced method for accurate, robust and efficient spectral fitting</i>
ASC	área sob a curva
β A	β amilóide
CA	corno de Amon
CERAD	consórcio para estabelecimento de registro da doença de Alzheimer
CCL	comprometimento cognitivo leve
Co	colina
Cr	creatina
CV	coeficiente de variação
DA	doença de Alzheimer
DSM III R	manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais - 3ª ed. revisada (<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – third edition revised</i>)
DWI	imagem de difusão (<i>diffusion weighted image</i>)
ENF	emaranhado neurofibrilar
EEG	eletroencefalograma
EPI	imagem ecoplanar (<i>echo planar imaging</i>)
ERM	espectroscopia de prótons por ressonância magnética
ES	eco de <i>spins</i>
ESR	eco de <i>spins</i> rápido
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FID	<i>free induction decay</i>
FLAIR	<i>fluid attenuated inversion recovery</i>
FTP	<i>file transfer protocol</i>
FWHM	<i>frequency width at half maximum</i>
Glx	complexo glutamato glutamina
HLSVD	<i>Hankel-Lanczos singular value decomposition</i>
IC	intervalo de confiança
Lac	lactato

LM	largura média
ml	mioinositol
MEEM	Miniexame do Estado Mental
MRUI	<i>magnetic resonance user interface</i>
Naa	N-acetil aspartato
NEX	número de excitações por ciclo
NIA	<i>National Institute of Aging</i>
NINCDS-ADRDA	<i>National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke/Alzheimer's disease and Related Disorders Association</i>
PET	tomografia por emissão de pósitrons (<i>positron emission tomography</i>)
PPA	proteína precursora do amilóide
ppm	partes por milhão
PRESS	espectroscopia com resolução pontual (<i>point resolved spectroscopy</i>)
PROBE	<i>proton brain examination</i>
PS	placa senil
RM	ressonância magnética
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
SPGR	aquisição de ecos de gradientes refocalizados num estado de equilíbrio com dissipação de coerência transversa (<i>spoiled gradient recalled acquisition in steady-state</i>)
SNC	sistema nervoso central
SPECT	tomografia computadorizada por emissão de fóton único (<i>single photon emission computed tomography</i>)
STEAM	modo de aquisição através de ecos estimulados (<i>stimulated echo acquisition mode</i>)
TC	tomografia computadorizada
TE	tempo de eco
TI	tempo de inversão
TR	tempo de repetição
VOI	volume de interesse

Lista de símbolos

α	alfa
β	beta
cm	centímetro
δ	delta
ϵ	epsilon
γ	gama
Hz	Hertz
M	molar (mol/litro)
μg	micrograma
mL	mililitro
min	minuto
mM	milimolar (milimol/litro)
mm	milímetro
ms	milissegundo
mT	militesla
s	segundo
T	Tesla

Lista de tabelas

	página
Tabela 1 Critérios para o diagnóstico neuropatológico da doença de Alzheimer	26
Tabela 2 Tabela de publicações sobre ERM na região temporal medial com TE curto	46
Tabela 3 Notas de corte do MEEM para voluntários sadios corrigidos pela escolaridade (Brucki <i>et al.</i> , 2003).....	54
Tabela 4 Notas de corte do teste de fluência verbal para voluntários sadios corrigidos pela escolaridade (Caramelli <i>et al.</i> , 2003).....	55
Tabela 5 Parâmetros técnicos das seqüências de RM	56
Tabela 6 Medidas das idades dos pacientes e controles	67
Tabela 7 Distribuição de pacientes e controles quanto ao sexo.....	68
Tabela 8 Medidas de escolaridade dos pacientes e controles	69
Tabela 9 Resumo dos dados demográficos do grupo de pacientes e controles	71
Tabela 10 Resumo dos dados demográficos do grupo de pacientes e controles	72
Tabela 11 Coeficientes de variação para as medidas	74
Tabela 12 Largura média dos picos no grupo de pacientes	74
Tabela 13 Largura média dos picos no grupo de controles.....	75
Tabela 14 Resultados da análise dos volumes de interesse no cíngulo posterior do grupo de controles.....	77
Tabela 15 Resultados da análise dos volumes de interesse no cíngulo posterior do subgrupo dos pacientes com DA leve	78
Tabela 16 Resultados da análise dos volumes de interesse no cíngulo posterior do grupo de pacientes com DA	78

Tabela 17	Resultados da análise dos volumes de interesse nos hipocampos do grupo de controles.....	79
Tabela 18	Resultados da análise dos volumes de interesse nos hipocampos no subgrupo dos pacientes com DA leve	79
Tabela 18	Resultados da análise dos volumes de interesse nos hipocampos dos pacientes com DA	80
Tabela 20	Valores da área sob a curva (ASC), níveis descritivos e intervalos de confiança para as ASC	81
Tabela 21	Valores de sensibilidade/especificidade, valor preditivo positivo/negativo (VPP/VPN) e acurácia do método das relações entre os metabólitos na comparação entre os pacientes e controles	83
Tabela 22	Valores de sensibilidade/especificidade, valor preditivo positivo/negativo (VPP/VPN) e acurácia do método das relações entre os metabólitos na comparação entre o subgrupo de pacientes com DA leve e grupo de controles.....	85
Tabela 23	Comparação entre a média das relações entre os metabólitos no cíngulo e nos hipocampos, no grupo de controles, grupo de pacientes e no subgrupo de pacientes com DA leve	85
Tabela 24	Correlação entre MEEM e as relações entre os metabólitos	88

Lista de gráficos

	página
Gráfico 1 Distribuição dos pacientes segundo a idade	51
Gráfico 2 Distribuição dos pacientes segundo o sexo.....	52
Gráfico 3 Distribuição dos controles segundo o sexo.....	53
Gráfico 4 Distribuição dos controles segundo a idade	53
Gráfico 5 Média $\pm$ 1 desvio padrão para a idade dos pacientes e controles	68
Gráfico 6 Distribuição porcentual dos pacientes e controles quanto ao sexo	69
Gráfico 7 Média $\pm$ 1 desvio padrão para a escolaridade	70
Gráfico 8 Média $\pm$ 1 desvio padrão para o MEEM	71
Gráfico 9 Médias $\pm$ 1 desvio padrão para a largura média (LM) em Hz, dos picos no grupo de pacientes.....	75
Gráfico 10 Médias $\pm$ 1 desvio-padrão para largura média (LM) em Hz, dos picos no grupo de controles.....	76
Gráfico 11 Curva ROC para Naa/Cr	81
Gráfico 12 Curva ROC para ml/Cr	82
Gráfico 13 Curva ROC para ml/Naa	82
Gráfico 14 Comparação entre as relações entre os metabólitos no cíngulo e nos hipocampus do grupo de controles	86
Gráfico 15 Comparação entre as relações entre os metabólitos no cíngulo e nos hipocampus do grupo de pacientes com DA	86
Gráfico 16 Comparação entre as relações entre os metabólitos no cíngulo e nos hipocampus do subgrupo de pacientes com DA leve	87
Gráfico 17 Diagrama de dispersão para MEEM e Naa/Cr no cíngulo	89
Gráfico 18 Diagrama de dispersão para MEEM e ml/Cr no cíngulo	89

Gráfico 19	Diagrama de dispersão para MEEM e ml/Naa no cíngulo	90
Gráfico 20	Diagrama de dispersão para MEEM e Naa/Cr nos hipocampos	90
Gráfico 21	Diagrama de dispersão para MEEM e ml/Cr nos hipocampos	91
Gráfico 22	Diagrama de dispersão para MEEM e ml/Naa nos hipocampos	91

Lista de figuras

	página
Figura 1 Imagem sagital ES ponderada em T1 (TR=450ms, TE=8ms), com representação do VOI no cíngulo posterior	58
Figura 2 Representação do VOI no cíngulo nos planos axial e coronal, através de reformatações da seqüência volumétrica SPGR ponderada em T1	59
Figura 3 Imagens axiais ESR ponderadas em T2 (TR=3475ms e TE=102ms), com representação do VOI nos hipocampos	59
Figura 4 Representação do VOI nos hipocampos nos planos coronal e sagital, através de reformatações da seqüência volumétrica SPGR ponderada em T1	60

Resumo

Lee HW. *Avaliação da doença de Alzheimer através da espectroscopia de prótons por ressonância magnética: comparação entre os achados no cíngulo posterior e nos hipocampos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 154p.

A doença de Alzheimer é a forma mais comum de demência e sua frequência relativa aumenta à medida que a faixa etária é maior. Nas imagens convencionais por ressonância magnética, as alterações dessa doença geralmente não são detectadas até fases moderadas e avançadas. Técnicas de imagem mais avançadas, como a espectroscopia por ressonância magnética (ERM) que permite uma análise dos metabólitos *in vivo*, podem ser usadas para diagnosticar mais precocemente a doença. Este estudo tem como objetivo descrever os achados de ERM no cíngulo posterior e nos hipocampos em pacientes com doença de Alzheimer e grupo de controles, e comparar, se houver, a correlação entre as relações de metabólitos N-acetil aspartato/creatina (Naa/Cr), mioinositol/creatina (ml/Cr) e mioinositol/N-acetil aspartato (ml/Naa) nos hipocampos e no cíngulo posterior entre os dois grupos. Também visa a verificar se existe associação entre as relações de metabólitos estudadas com o Miniexame do Estado Mental (MEEM). Foram estudados 29 pacientes (sendo 23 com DA leve e seis com DA moderada) e 15 controles com ERM no cíngulo posterior e hipocampos, através da técnica de espectroscopia por resolução pontual (PRESS) com tempo de eco curto (35ms) e tempo de repetição de 1500ms, utilizando-se um magneto de 1,5T. As relações entre metabólitos: Naa/Cr, ml/Cr e ml/Naa foram calculadas após processamento com o MRUI (*magnetic resonance user interface*). Observou-se redução significativa da relação Naa/Cr no cíngulo posterior e aumento da relação ml/Cr nos hipocampos e da relação ml/Naa tanto no cíngulo posterior como nos hipocampos no grupo de pacientes em relação ao grupo de controles. Na diferenciação entre os grupos de pacientes e de controles, foram obtidos valores de sensibilidade e especificidade semelhantes em ambos os locais de estudo, quando considerado o subgrupo com DA leve, e discretamente superior no cíngulo posterior, quando considerado o grupo completo de pacientes. As relações entre os metabólitos com melhor sensibilidade e especificidade em diferenciar os grupos foram, em ordem decrescente: Naa/Cr no cíngulo, ml/Naa no cíngulo, ml/Naa nos hipocampos e ml/Cr nos hipocampos. Não houve vantagem na realização da ERM nos hipocampos em relação ao cíngulo posterior para a diferenciação entre os grupos de pacientes e de controles. Além disso, os hipocampos representam um local em que a obtenção da ERM é mais difícil, necessitando de um tempo maior de exame, o qual deve ser o mais curto possível em pacientes demenciados. Foi detectado um padrão metabólico diferente entre o cíngulo posterior e hipocampos, tanto no grupo de controles como no de pacientes: os hipocampos apresentaram a relação Naa/Cr reduzida e as relações ml/Cr e ml/Naa aumentadas em relação ao cíngulo posterior. A diferença do padrão metabólico encontrada entre os hipocampos e o cíngulo posterior reforça a posição de que as relações nesses dois locais não são comparáveis, podendo tal diferença estar relacionada com um discreto acúmulo regional de emaranhados neurofibrilares nos hipocampos, encontrado em praticamente todos os indivíduos com mais de 60 anos. Observou-se associação significativa com o MEEM das relações Naa/Cr e ml/Naa, sendo uma correlação positiva para a relação Naa/Cr e negativa para a relação ml/Naa, apenas quando avaliado o cíngulo posterior.

Palavras-chave: espectroscopia de prótons por ressonância magnética, doença de Alzheimer, cíngulo posterior, hipocampos.

Summary

Lee HW. *Evaluation of Alzheimer's disease using magnetic resonance spectroscopy: comparison between findings in the posterior cingulate and hippocampi* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2005. 154p.

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia and its relative frequency increases in higher ages. Conventional magnetic resonance imaging may not detect abnormalities until late in the course of the disease. Newer techniques, like magnetic resonance spectroscopy (MRS), that allows noninvasive assessment of some metabolites in vivo, can be used to detect this disease earlier. This work has the purpose of describe findings using MRS in the posterior cingulate and hippocampi of patients with Alzheimer's disease and controls; compare, if present, the alterations of the metabolic ratios N-acetyl aspartate/creatine (Naa/Cr), myoinositol/creatine (ml/Cr) and myoinositol/N-acetyl aspartate (ml/Naa) in patients with Alzheimer's disease between the hippocampi and posterior cingulate; and make correlation between the metabolic ratios and mini-mental state exam (MMSE). We evaluated 29 patients with mild or moderate Alzheimer's disease and 15 controls by MRS in the posterior cingulate and hippocampi using PRESS (point resolved spectroscopy) technique with short TE (35ms) and TR=1500ms. The examinations were performed on a 1.5T scanner. The metabolic ratios: Naa/Cr, ml/Cr and ml/Naa were calculated after post-processing with MRUI (magnetic resonance user interface). It was observed reduction in the Naa/Cr ratio in the posterior cingulate, increasing in the ml/Cr ratio in the hippocampi, and increasing in the ml/Naa ratio in both posterior cingulate and hippocampi. In the differentiation between patients and controls, both places had similar sensibility and specificity when considered only mild AD patients and slightly better results in the posterior cingulate when considered all the patients (mild and moderate AD). The ratios with higher sensitivity and specificity were (in a decreasing order): posterior cingulate Naa/Cr, posterior cingulate ml/Naa, hippocampi ml/Naa and hippocampi ml/Cr. There was no advantage in performing MRS in the hippocampi instead of posterior cingulate, a technically challenging location, usually leading to a longer examination time, specially if taken into account the demential state of the patients, being desirable the shortest time of examination possible. We found a different metabolic pattern between the posterior cingulate and hippocampi, in both groups (patients and controls): the Naa/Cr ratio was decreased and ml/Cr and ml/Naa ratios were increased in the hippocampi. This different metabolical pattern regarding posterior cingulate and hippocampi in both groups (controls and patients) can be explained by the neurofibrillary tangles usually found in the hippocampi of almost all individuals with 60 years or more. This finding reinforce the fact that the metabolic ratios of this two regions are not comparable. We observed correlation between Naa/Cr and ml/Naa ratios in the posterior cingulate with the MMSE, being a positive correlation with Naa/Cr and negative correlation with ml/Naa.

Key words: Magnetic resonance spectroscopy, Alzheimer's disease, posterior cingulate, hippocampi.

1 Introdução

A prevalência de demência dobra a cada cinco anos, sendo de 0,7% entre 60 e 64 anos e aumentando para 38,6 % entre 90 e 95 anos (Jorm e Jolley, 1998). Em um estudo realizado na cidade de Catanduva – SP, em 1997, encontrou-se prevalência de demência de 1,3% na faixa dos 65-69 anos e de 37,8% acima dos 85 anos (Herrera *et al.*, 2002). A doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência e sua frequência relativa torna-se maior à medida que a idade aumenta (Ebly *et al.*, 1994). Atualmente, no mundo, existem mais de 30 milhões de pessoas acometidas por tal doença (Petrella *et al.*, 2003), e a tendência ao envelhecimento populacional torna esses dados ainda mais preocupantes.

A recente chegada de agentes farmacológicos, possivelmente efetivos no tratamento dos sintomas da DA, criou uma nova perspectiva para os pacientes por ela afetados, direcionando as pesquisas para a obtenção do diagnóstico da doença em fase inicial, com o objetivo da instituição precoce do tratamento e retardo das perdas funcionais e cognitivas (Petrella *et al.*, 2003).

As imagens convencionais por ressonância magnética (RM) e por tomografia computadorizada (TC) são recomendadas na avaliação rotineira da DA; porém, em geral, as alterações da doença não são detectadas nesses exames até suas fases moderadas e avançadas.

Técnicas de imagem mais avançadas visam a chegar a esse diagnóstico mais precocemente e podem ser divididas em imagens

estruturais (volumetria seriada, técnicas de compressão e subtração de volumes de interesse) e funcionais [tomografia por emissão de pósitrons (PET), tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT), ressonância magnética funcional e espectroscopia por ressonância magnética].

A espectroscopia por ressonância magnética (ERM) é uma aplicação da ressonância magnética que permite a avaliação dos metabólitos *in vivo*, de maneira não invasiva (Miller, 1991; Castillo *et al.*, 1996).

A ERM de prótons é uma técnica utilizada na avaliação da DA com comprovada relevância clínica (Doraiswamy *et al.*, 2000); os estudos a seu respeito começaram no início da década de 90 (Klunk *et al.*, 1992; Meyerhoff *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1993; Shiino *et al.*, 1993), contando-se, atualmente, mais de 50 publicações em periódicos científicos.

Uma característica peculiar dessa técnica é o fato da análise ser específica a uma região escolhida para estudo, sendo que a escolha do tempo de eco (TE) curto ou longo influi no tipo de metabólito passível de análise, o que leva a muita diversidade nos estudos.

As alterações metabólicas mais encontradas são a redução do N-acetil aspartato (Naa) e a elevação do mioinositol (mi), sendo este último metabólito detectado somente com TEs curtos.

O estudo das áreas límbicas, que são precocemente acometidas pela DA, pode fornecer subsídios para seu diagnóstico precoce. Estudos mais

recentes têm-se voltado para a análise dessas áreas. Duas regiões merecem destaque: o cíngulo posterior e a formação hipocampal.

O cíngulo posterior tem demonstrado alterações precoces na DA, tanto em estudos com PET/SPECT (Minoshima *et al.*, 1997; Reiman *et al.*, 1998) como em estudos com ERM (Kantarci *et al.*, 2000; Kantarci *et al.*, 2002a; Kantarci *et al.*, 2002b), o que está de acordo com a progressão neuropatológica da doença proposta por Braak (Braak *et al.*, 1993).

A outra região de destaque é a mesial temporal, local de início das alterações patológicas, onde se espera que as alterações na ERM sejam ainda mais precoces. Por apresentar dificuldades técnicas intrínsecas à realização da ERM, relacionadas com a proximidade dos ossos da base do crânio, existem relativamente poucos estudos avaliando a referida região. Se forem considerados estudos com TE curto (capazes de detectar o ml), existem quatro publicações com trabalhos sobre a região temporal mesial (Engelhardt *et al.*, 2001; Chantal *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 2002; Chantal *et al.*, 2004).

Dentre esses estudos, três utilizaram um volume de interesse (VOI) cúbico e um não especificou o tamanho do VOI na descrição. Considerando-se que o hipocampo tem um formato alongado, só uma pequena parte do volume de interesse representava realmente, nesses estudos, o hipocampo e o restante (correspondendo à maioria do volume analisado) era composto de tecido encefálico temporal (sobretudo substância branca) adjacente.

Surgiu, então, a idéia de realizar a ERM com um volume de interesse retangular, seguindo-se o maior eixo do hipocampo para otimizar a avaliação

hipocampal e utilizando TE curto, o que permite a avaliação tanto do Naa como do ml. Além disso, este estudo visa a comparar seus resultados com o volume de interesse no cíngulo posterior, ambas estruturas límbicas e de acometimento precoce pela DA.

2 Objetivos

- 1- Descrever os achados de espectroscopia de prótons com volume de interesse único nos hipocampos e no cíngulo posterior em pacientes com DA e compará-los com o grupo de controles;
 - 2- Verificar a existência e comparar a associação entre as relações entre os metabólitos N-acetil aspartato/creatina (Naa/Cr), mioinositol/creatina (ml/Cr) e mioinositol/N-acetil aspartato (ml/Naa) nos hipocampos e no cíngulo posterior entre os grupos de pacientes e de controles;
 - 3- Verificar se existe associação entre as relações de metabólitos nos hipocampos e no cíngulo posterior com o escore do Miniexame do Estado Mental (MEEM).
-

3 Revisão da Literatura

3.1 DEFINIÇÃO

A DA é uma doença neurodegenerativa que se caracteriza por perda de função neuronal e alterações cognitivas, funcionais e comportamentais progressivas, sendo a perda progressiva de memória uma de suas características mais marcantes.

3.2 HISTÓRICO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Em 1901, em Frankfurt, Alois Alzheimer (1864-1915) examinou uma mulher com história clínica de demência iniciada aos 51 anos, com deterioração cognitiva progressiva e alterações de comportamento, cujo quadro clínico não podia ser classificado em nenhuma doença conhecida na época.

Após quatro anos e meio de evolução, a paciente faleceu e foi submetida a exame anatomopatológico. Ao exame microscópico, Alzheimer detectou dois tipos de lesões no tecido cerebral, conhecidas atualmente como emaranhados neurofibrilares e placas senis. Esses achados foram apresentados em 1906, em um encontro científico em Tübingen, e publicados em 1907. Em 1908, Kraepelin começou a referir-se a essa

condição como doença de Alzheimer, alcunha pela qual é conhecida até hoje (Mesulam, 2000).

Até o início da década de 70, a DA era considerada uma forma rara de demência pré-senil, distinta da demência senil e aterosclerótica, despertando menos interesse do que atualmente.

Em 1968, Blessed *et al.* observaram uma clara associação entre os achados neuropatológicos da DA e os da demência senil. Outros estudos neuropatológicos da década de 70 também mostraram que o substrato neuropatológico da DA e da demência senil era o mesmo; ambas passaram, assim, a ser consideradas formas do mesmo processo. Dessa forma, ampliou-se o conceito de DA, que inclui, desde então, as formas pré-senil e senil, a doença tendo se tornado uma das mais comuns do cérebro humano (Terry, 1976).

Com a ampliação do conceito de DA e o envelhecimento da população mundial, a doença passou de uma forma relativamente rara de demência pré-senil para uma doença muito mais prevalente, gerando interesse e preocupação crescentes tanto na população geral como na comunidade científica (Nitrini, 1999).

3.3 PREVALÊNCIA E INCIDÊNCIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER

A incidência de demência aumenta com a progressão da idade, assim como cresce a frequência relativa da DA. O envelhecimento da população, fenômeno que se restringia a países desenvolvidos, tem-se generalizado, aumentando o risco para doenças degenerativas em todo o mundo e, particularmente, para a DA (Kalache *et al.*, 1987).

No Brasil, o aumento da proporção de idosos começou a ser verificado a partir de 1960, e vem ocorrendo de maneira muito rápida, com estimativas de que o país passe da 16^a para a 6^a posição mundial em termos de número absoluto de indivíduos com 60 anos ou mais, entre 1960 e 2025 (Kalache *et al.*, 1987).

Em estudo populacional realizado por Herrera *et al.* (Herrera *et al.*, 2002) em 1997, na cidade de Catanduva - SP (100.913 habitantes), foram avaliados, em domicílio, 1.656 indivíduos com idade igual ou superior a 65 anos, correspondendo a aproximadamente 25% da população idosa residente na zona urbana do município. Os resultados de prevalência de demência e DA foram similares aos constatados em meta-análise da literatura realizada por Jorm *et al.* (1987 e 1990), com prevalência de demência variando entre 1,3% na faixa dos 65-69 anos e 37,8% acima dos 85 anos e com, respectivamente, 0,3% e 30,6% de prevalência de DA nas mesmas faixas etárias. Passados 39 meses Nitrini *et al.* (Nitrini *et al.*, 2004a) reavaliaram os indivíduos que não apresentavam demência em 1997 e

encontraram incidência anual de demência de 13,8 e de DA de 7,7 por 1.000 pessoas.

3.4 GENÉTICA DA DOENÇA DE ALZHEIMER

A DA é uma doença etiologicamente heterogênea e estima-se que de 40% a 70% dos casos sejam esporádicos e que de 20% a 60% tenham caráter familiar (Vallada Filho, 2000). Dos pacientes com DA do tipo familiar, de 5% a 10% são causados por mutações em genes autossômicos dominantes: gene da proteína precursora do amiloide (PPA, cromossomo 21), pré-senilina 1 (cromossomo 14) e pré-senilina 2 (cromossomo 1), estando associados com DA de início precoce (antes dos 65 anos). O alelo $\epsilon 4$ da apolipoproteína E (cromossomo 19) é um fator de risco genético para desenvolver DA de início tardio; entretanto, não é condição suficiente (Vallada Filho, 2000).

3.5 NEUROPATOLOGIA E PATOGENIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Os marcadores neuropatológicos principais da DA são os emaranhados neurofibrilares e as placas senis, que devem estar presentes em certa densidade e distribuição (Mesulam, 2000). Além dessas alterações, também são observadas perda de neurônios, degeneração

sináptica, depleção da inervação colinérgica cortical e gliose (Caramelli, 2000).

As placas senis (PS), também chamadas placas amilóides, são estruturas extracelulares cujo centro contém uma proteína denominada β amiloide (β A). Existem três tipos principais e distintos de PS descritos na DA: neuríticas, difusas e desgastadas (Caramelli, 2000) .

As placas senis neuríticas apresentam neuritos distróficos (axônios e dendritos degenerados) em sua composição e são encontradas em maior número na DA. As placas senis difusas são formadas, basicamente, por proteínas β A dispostas de forma desorganizada, com pouca participação celular e ausência de neuritos distróficos ao seu redor, podendo ser encontradas no envelhecimento normal e em outras doenças degenerativas. As placas senis desgastadas apresentam apenas um denso acúmulo de proteína β A, sem participação celular, e representam um subtipo mais raramente observado na DA (Caramelli, 2000).

O principal componente das placas senis na DA é a proteína β A, um fragmento resultante de clivagem anormal da proteína precursora do amiloide (PPA), uma glicoproteína da membrana celular encontrada em quase todas as células dos mamíferos e que está presente em concentração particularmente elevada nos neurônios. As enzimas responsáveis pela clivagem da proteína precursora são conhecidas (α , β e γ secretases) e são consideradas possíveis alvos da terapêutica. Na DA, a PPA sofre clivagem

anormal dando origem à proteína β A, que é secretada de maneira aumentada (Caramelli, 2000) .

A secreção anormal e aumentada de proteína amilóide no espaço extracelular, sua precipitação e agregação em forma de placas promovem um processo inflamatório e/ou oxidativo que leva à perda da função neuronal (Caramelli, 2000).

Os emaranhados neurofibrilares (ENF) encontrados na DA são filamentos intracelulares helicoidais compostos de proteína tau (os quais normalmente fazem parte do citoesqueleto e têm papel importante na manutenção da estabilidade dos microtúbulos), porém fosforilada de maneira anormal na doença. O acúmulo dos ENF no interior dos neurônios prejudica o transporte axoplasmático e leva à morte celular. Esses emaranhados estão presentes, virtualmente, em todos os pacientes com DA. Contudo, isso não é uma característica distintiva da doença, uma vez que tais emaranhados são encontrados também em outras doenças, como a síndrome de Down, a doença de Hallervorden-Spatz, paralisia supranuclear progressiva, demência associada à doença de Parkinson e demência pugilística (Petrella *et al.*, 2003)

Observa-se aumento da concentração da proteína tau no líquido de pacientes com DA, quando comparados com indivíduos controle com idade pareada e também em relação a outras demências (Caramelli, 2000; Petrella *et al.*, 2003; Hartmann *et al.*, 2004).

O acúmulo dos ENF segue uma evolução temporal característica na doença, sendo que a região mesial temporal é o local inicialmente e mais intensamente acometido (Braak e Braak, 1991; Arriagada *et al.*, 1992; Delacourte *et al.*, 1999; Mesulam, 2000). Segundo Mesulam (2000), a patologia neurofibrilar pode ser classificada em três estágios:

O primeiro estágio é o transentorrinal ou límbico baixo (correspondendo aos estágios I e II de Braak), caracterizado pelo acometimento do córtex transentorrinal, entorrinal e, mais levemente, da região CA (corno de Ammon) 1 do hipocampo. Tal distribuição dos ENF pode ser encontrada em praticamente todos os indivíduos (mesmo sem demência) acima de 60 anos.

O segundo estágio é o límbico ou límbico alto (correspondendo aos estágios III e IV de Braak), caracterizado pela acentuação do comprometimento da formação hipocampal e de algumas áreas adjacentes, como o córtex entorrinal, amígdala, núcleo basal de Meynert, giro fusiforme, neocórtex temporal (giros temporais inferior e medial), giros orbitofrontais e giro do cíngulo. Nenhuma parte do sistema límbico está livre do acúmulo de ENF.

O terceiro estágio é o isocortical (correspondendo aos estágios V e VI de Braak), caracterizado pelo acometimento de áreas corticais associativas. Mesulam (2000) subdivide esse estágio em dois, denominados de estágio neocortical baixo (similar ao estágio V de Braak) e alto (similar ao estágio VI de Braak). No estágio neocortical baixo, há extensão do comprometimento

aos giros temporais superior e médio e córtex de associação pré-frontal e parietal posterior, poupando o córtex primário motor e o sensitivo. No estágio neocortical alto, todas as áreas de associação do neocórtex estão densamente comprometidas, observando-se também comprometimento do *striatum*, em especial de sua porção límbica (núcleo *accumbens* e tubérculo olfatório), porém ainda poupando o córtex primário motor e sensitivo.

Um outro autor (Delacourte *et al.*, 1999) descreve a progressão dos emaranhados neurofibrilares em 10 estágios que, progressivamente, comprometem o córtex transentorrinal (estágio 1), córtex entorrinal (estágio 2), hipocampo (estágio 3), córtex polar temporal anterior (estágio 4), córtex temporal inferior (estágio 5), córtex temporal médio (estágio 6), córtex do cíngulo e áreas de associação polimodal, como o córtex temporal superior, parietal inferior e frontal anterior (estágio 7), giro frontal inferior (estágio 8), córtex sensorial e motor (estágio 9) e comprometimento de todo o córtex isocortical (estágio 10).

Além dos emaranhados neurofibrilares e das placas senis, também se observam na DA perda de neurônios, perda de sinapses, depleção da inervação colinérgica cortical e gliose (Caramelli, 2000).

A perda de neurônios é observada principalmente nas camadas piramidais de estruturas límbicas e córtices associativos, levando a uma atrofia cerebral difusa, porém não uniforme, predominando nas regiões frontais, temporais e parietais. No entanto, a atrofia ocorre nas fases avançadas da doença e muitas vezes, nos exames de imagem

convencionais (TC e RM), encontra-se apenas uma alteração volumétrica dentro do considerado habitual para a faixa etária. Estudos morfométricos e volumétricos mais recentes têm mostrado a atrofia da região mesial temporal como um marcador específico e precoce para o comprometimento cognitivo leve e DA (Fox *et al.*, 1996; Jack *et al.*, 1997).

Existe também perda de sinapses corticais na DA, tanto hipocampais como neocorticais; tal perda pode ocorrer secundariamente à perda neuronal e aos ENF, por degeneração Walleriana.

A inervação colinérgica do córtex cerebral origina-se em grande parte no núcleo basal de Meynert, que é um local de acometimento intenso e precoce pelos ENF na DA. Observa-se, na DA, uma grande perda de axônios e receptores colinérgicos no córtex cerebral, poupando a inervação colinérgica do *striatum* e do tálamo. Há evidências, por meio de estudos *in vitro*, de que a perda de receptores colinérgicos aumenta a toxicidade da proteína βA e de que a proteína βA interfere na síntese, liberação e efetividade pós-sináptica da acetilcolina (Mesulam, 2000). Cria-se, assim, um círculo vicioso em que a redução da neurotransmissão colinérgica intensifica a toxicidade e a produção das PS que, por sua vez, prejudicam ainda mais a neurotransmissão colinérgica. Não há, entretanto, evidências de que a transmissão colinérgica influencie a hiperfosforilação da proteína tau, ou a formação dos ENF, ou que leve à morte neuronal. Também foi descrita a redução, relacionada com a idade, de uma proteína ligadora de cálcio em neurônios do núcleo basal (Mesulam, 2000). A perda na habilidade

de compartimentalizar o cálcio intracelular pode aumentar a susceptibilidade desses neurônios a alterações patológicas relacionadas com a idade e com a demência (Mesulam, 2000).

Investigações na genética molecular têm destacado a importância da proteína precursora do amiloide (PPA) e da proteína β A na patogênese da DA. Tais fatores sugerem que a DA não representa uma doença única, mas uma síndrome resultante do aumento da secreção de proteína β A com depósitos de placas senis difusas, gliose, resposta inflamatória e estresse oxidativo, dando origem à formação das placas neuríticas, perda sináptica, degeneração neurofibrilar, morte celular, depleção colinérgica e demência.

Existem diversos argumentos a favor dessa hipótese, conhecida como hipótese da cascata do amiloide. São eles:

- 1) o depósito da proteína β A é uma condição necessária para o diagnóstico neuropatológico da DA;
- 2) mutações no gene precursor da PPA (cromossomo 21) causam DA pré-senil;
- 3) a trissomia do cromossomo 21 (Síndrome de Down) leva ao desenvolvimento da DA pré-senil em 100% dos casos;
- 4) as mutações nos genes pré-senilina 1 (cromossomo 14), pré-senilina 2 (cromossomo 1) e PPA (cromossomo 21) têm em comum o fato de levarem à formação da forma longa da proteína β A, mais neurotóxica;

- 5) a presença do alelo $\epsilon 4$ da apolipoproteína E leva à agregação da proteína βA ;
- 6) ao menos *in vitro*, a proteína βA mostra-se neurotóxica e induz a morte celular e a hiperfosforilação da proteína tau.

Existem, entretanto, dois importantes argumentos contrários, apresentados abaixo:

- 1) Até o presente momento, existe pouca evidência de que a proteína βA esteja ligada às outras alterações neuropatológicas da DA (ENF, perda neuronal ou depleção da inervação colinérgica), uma vez que há pouca associação anatômica entre os locais de acúmulo da proteína βA e dos ENF.
- 2) Há pouca correspondência entre a densidade ou distribuição anatômica do acúmulo da proteína βA e os sintomas clínicos. Na realidade, há uma grande variação individual e não parece haver um padrão consistente de distribuição temporal e espacial das PS nem, necessariamente um aumento correlacionado com a idade, ao contrário dos ENF cuja densidade total e distribuição mostram associação com a gravidade da demência, segundo alguns autores (Delacourte *et al.*, 1999; Mesulam, 2000).

Uma possível teoria que unifica esses dois elementos na patogênese da DA é a falência da plasticidade neural (Mesulam, 2000). Segundo essa teoria, a neuroplasticidade é um processo que existe durante toda a vida e que se caracteriza por reações estruturais e funcionais de dendritos, axônios

e sinapses frente a novas experiências (aprendizado), desgaste e lesão. As alterações neuropatológicas da DA representariam conseqüências de neuroplasticidade excessiva, porém ineficaz.

A neuroplasticidade não é homogênea por todo o cérebro; há evidências de que tal característica é maior em regiões límbicas e paralímbicas, é menor no neocórtex de associação e praticamente indetectável nas áreas primárias motora e sensitiva. As áreas de maior plasticidade coincidiriam, portanto, com as áreas de maior vulnerabilidade para a formação dos ENF (Mesulam, 2000).

O acúmulo da proteína βA , as mutações nos genes pré-senilina 1 e pré-senilina 2, o alelo $\epsilon 4$ da apolipoproteína E e a idade interferem e dificultam a neuroplasticidade. A teoria proposta baseia-se na premissa de que a restrição de plasticidade gerada ocorre nos dendritos e locais de sinapse e de que, com isso, seja ativada uma intensificação compensatória da plasticidade no corpo celular. Após muitos anos, tal processo compensatório torna-se ineficiente, com hiperfosforilação da proteína tau, menor capacidade de ligar os microtúbulos e, por fim, leva à sua polimerização em ENF. Os ENF apareceriam, inicialmente, nos neurônios límbicos e paralímbicos por representarem locais com os níveis mais altos de neuroplasticidade basal e também os locais com maior tempo de aumento da atividade compensatória do corpo celular (Mesulam, 2000).

Estudos mais recentes têm associado as perdas cognitivas iniciais, como alterações sutis de personalidade, perda da espontaneidade,

difficuldade de encontrar palavras apropriadas, realizar cálculos aritméticos e desorientação temporoespacial com a presença de formas solúveis de oligômeros da proteína βA (peptídeo 1-42 Abeta), presentes tanto no espaço intra como no extracelular, levando a perdas sinápticas (Terry, 2001). Tais perdas ocorreriam tanto no neocórtex como nas regiões mesiais temporais. No entanto, os neurônios do córtex entorrinal possuem, caracteristicamente, menor quantidade de terminações nervosas e a perda sináptica leva não só à disfunção na transmissão nervosa, mas também à perda de receptores de fatores tróficos essenciais à sobrevivência desses neurônios, com a conseqüente degeneração do corpo celular e a posterior formação de ENF. Os neurônios do neocórtex, por outro lado, por apresentarem uma quantidade maior de terminações nervosas, teriam uma “reserva” que impediria a degeneração celular nas fases iniciais da DA, mesmo com a perda de algumas terminações nervosas (Terry, 2000; Terry, 2001; Cleary *et al.*, 2005).

3.6 QUADRO CLÍNICO NA DOENÇA DE ALZHEIMER

A perda de memória é a característica mais importante da DA; porém, para o seu diagnóstico, deve estar acompanhada de déficit de pelo menos mais uma função cognitiva, confirmado por exame neuropsicológico. A idade de início dos sintomas e o curso clínico podem variar bastante mas, geralmente, inicia-se depois dos 65 anos, com a duração da doença

variando de um ano e meio a 15 anos. Além do declínio cognitivo, existe a perda progressiva do funcionamento de vários outros aspectos: atividades da vida diária, trabalho, lazer e atividades sociais.

A história natural da DA pode ser dividida em três estágios (Folstein, 1997; Petrella *et al.*, 2003) que, em média, duram de oito a dez anos. O Miniexame do Estado Mental (MEEM - Folstein *et al.* 1975) é a escala de avaliação cognitiva mais amplamente utilizada para a avaliação de demência, variando de zero a trinta; quanto menor o valor, maior é o comprometimento cognitivo. Assim:

- 1) DA inicial ou leve - os pacientes apresentam uma alteração gradual cognitiva, funcional, de comportamento e de humor, sendo a principal característica o esquecimento e perguntas repetitivas, com início do comprometimento das atividades cotidianas (MEEM entre 20 e 23, para indivíduos com escolaridade média ou alta);
- 2) DA intermediária ou moderada - existem piora gradual das funções cognitivas, perda de memória recente (por exemplo, dificuldade de se lembrar de conversas, esquecimento de compromissos, incapacidade de se lembrar de eventos recentes) e início de perda da fluência verbal, com dificuldade crescente de se lembrar da palavra correta. Nessa fase, o paciente começa a necessitar de supervisão para algumas atividades, como o horário das medicações, finanças, anotar recados de telefone ou utilizar transporte público (MEEM entre 10 e 19, para indivíduos com escolaridade média ou alta);

- 3) DA final ou grave – é a fase em que costuma haver alterações comportamentais, tais como agitação, alucinação, agressividade e vagar sem rumo. Costuma haver alteração do padrão de sono e, nas fases terminais, o paciente torna-se extremamente dependente, inclusive para se alimentar, se vestir e até para a higiene pessoal (MEEM menor que 10, para indivíduos com escolaridade média ou alta).

A fase pré-clínica da DA, que pode se manifestar como comprometimento cognitivo leve (CCL) (Petersen, 2004), é caracterizada por leve perda de memória, sem interferência nas atividades cotidianas. O MEEM é maior que 23 e sua duração é indeterminada.

O CCL caracteriza-se por leve perda de memória, isolada, que não prejudica as atividades cotidianas nem preenche os critérios diagnósticos de demência. Muitos autores acreditam que o CCL é um estágio intermediário entre cognição normal e DA, representando condição de risco para o desenvolvimento de DA. Estudos longitudinais têm demonstrado incidência de DA em cerca de 12% ao ano em indivíduos com CCL, enquanto que a incidência é de cerca de 1 a 2% ao ano em idosos cognitivamente normais (Atlas, 2002).

Existem alguns fatores preditivos de uma evolução pior e mais rápida da DA: idade mais avançada, etilismo, afasia, alterações de comportamento (como vagar sem rumo, inquietação e agressividade), depressão, sinais extrapiramidais precoces e sintomas psicóticos (Brucki, 2000).

3.7 TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Ainda não existe terapêutica definida ou cura para a DA. A abordagem visando a fatores etiológicos/fisiopatológicos primários e secundários é mais promissora; porém, ainda está em fase inicial de desenvolvimento. As estratégias compensatórias ou sintomáticas visam a compensar as lesões cerebrais já ocorridas por ocasião do diagnóstico clínico. Atualmente são mais acessíveis e compreendem os inibidores de colinesterase (sendo atualmente utilizados de forma mais rotineira na prática clínica: donepezil, galantamina e rivastigmina) e a memantina [antagonista dos receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) do glutamato] (Engelhardt *et al.*, 2000; Rogawski, 2004).

O tratamento com anticolinesterásicos, se iniciado precocemente, pode retardar a necessidade de institucionalização e pode alterar a progressiva deterioração da memória e de outras funções cognitivas (Kumari *et al.*, 2002; Petrella *et al.*, 2003). O diagnóstico precoce/pré-clínico, portanto, tem grande importância na tentativa de auxiliar a atividade colinérgica antes de haver danos irreversíveis aos neurônios (Kumari *et al.*, 2002).

3.8 DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

O exame neuropatológico é, até hoje, o único método diagnóstico definitivo da doença de Alzheimer (Caramelli, 2000). Os critérios mais recentes para o diagnóstico neuropatológico foram propostos em 1997 pelo *National Institute on Aging* e pelo Instituto Reagan. Segundo esses critérios, o exame neuropatológico é realizado em cinco áreas neocorticais, formação hipocampal (incluindo córtex entorrinal), substância negra e *locus ceruleus*, com análise semiquantitativa de PS (critérios do Consórcio para Estabelecimento de Registro de Doença de Alzheimer - CERAD) e ENF (estágios de Braak, I a VI). Qualquer lesão encontrada deve ser considerada patológica e deve ser anotada, o que difere dos critérios anteriores que faziam um ajuste para a faixa etária. Os casos são classificados como de probabilidade alta, intermediária ou baixa de DA. Tais critérios estão resumidos na **Tabela 1**.

Tabela 1- Critérios para o diagnóstico neuropatológico da doença de Alzheimer (NIA e Instituto Reagan 1997)

Prob. diagnóstica	PS Neuríticas (CERAD)	ENF (Estágios de Braak)
Alta	Freqüentes	estágio V/VI (acom. neocortical)
Intermediária	Moderadas	estágio III/IV (acom. límbico)
Baixa	Esparsas	estágio I/II (acom. transentorrinal)

NOTA: NIA=*National Institute on Aging*, Prob.=probabilidade, PS=placas senis, CERAD=consórcio para estabelecimento de registro da doença de Alzheimer, ENF=emaranhados neurofibrilares. Modificado de: Caramelli P. Neuropatologia da doença de Alzheimer. In: Forlenza OV e Caramelli P. *Neuropsiquiatria Geriátrica*. São Paulo: Atheneu; 2000. p.114, com a permissão do autor.

Na maioria das vezes, o diagnóstico clínico da DA é presuntivo, uma vez que a constatação definitiva da doença se dá por meio de estudo histopatológico de material de biópsia ou necrópsia. Assim, os indivíduos vivos incluídos como participantes de pesquisas são, na maior parte das vezes, considerados como possíveis ou prováveis portadores de DA, com base em achados clínicos, laboratoriais e de neuroimagem.

Os critérios mais utilizados para o diagnóstico de DA provável ou possível são os do *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke/ Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (NINCDS-ADRDA) (McKhann *et al.*, 1984; Kantarci e Jack, 2003).

Critérios para o diagnóstico clínico de DA provável

- Demência estabelecida através de exame clínico e documentada pelo MEEM, escala de demência de Blessed ou exame similar e confirmada por testes neuropsicológicos.
- Déficits em duas ou mais áreas de cognição.
- Piora progressiva de memória e de outras funções cognitivas.
- Ausência de distúrbio de consciência.
- Início entre 40 e 90 anos, mais frequentemente depois dos 65 anos.
- Ausência de doenças sistêmicas ou cerebrais que possam ser a causa dos déficits progressivos de memória e cognição.

O diagnóstico de DA provável é amparado por:

- deterioração progressiva de funções cognitivas específicas, como linguagem (afasia), habilidades motoras (apraxia) e percepção (agnosia);
 - prejuízo nas atividades cotidianas e alteração de comportamento;
 - história familiar de doenças semelhantes, particularmente com confirmação neuropatológica e resultados laboratoriais como:
 - Líquor normal em avaliação de rotina;
 - EEG de padrão normal ou com alterações inespecíficas, como aumento da atividade de ondas lentas;
 - evidência de atrofia cerebral em TC ou RM, com progressão documentada em exames seriados.
-

Outras características clínicas consistentes com o diagnóstico de DA provável, após exclusão de outras causas de demência, incluem:

- platô no curso ou progressão da doença;
- associação de sintomas de depressão, insônia, incontinência, alucinações, ilusões, explosões verbais, emocionais ou físicas, distúrbios sexuais e perda de peso;
- outras anormalidades neurológicas, principalmente com doença mais avançada e incluindo sinais motores, como aumento do tônus muscular, mioclonias ou alteração de marcha;
- convulsões no estágio avançado de doença;
- TC ou RM normal para a idade.

Características que tornam incerto ou improvável o diagnóstico de DA provável incluem:

- início súbito;
- sinais neurológicos focais como hemiparesia, perda sensorial, déficit de campo visual e distúrbio de coordenação em fases precoces da doença;
- convulsões ou alteração de marcha na apresentação da doença ou precocemente no curso da doença.

Critérios diagnósticos de DA possível

- O diagnóstico pode ser feito com base em uma síndrome demencial, na ausência de outras alterações neurológicas, psiquiátricas ou

sistêmicas suficientes para causar demência e na presença de variação na apresentação ou no curso clínico.

- Pode ser feito na presença de uma alteração sistêmica ou cerebral suficiente para justificar a demência, porém que não é considerada a causa da demência.
- Deve ser usado em centros de estudos quando um déficit cognitivo único, severo e gradualmente progressivo é identificado na ausência de outra causa identificável.

Critérios de diagnóstico definitivo de DA

- Critérios diagnósticos de DA provável e
- evidência histopatológica obtida por biópsia ou necrópsia.

Em instituições acadêmicas, o diagnóstico clínico tem acurácia de cerca de 90%; porém, fora delas, tal valor é bem menor (Petrella *et al.*, 2003). Técnicas mais recentes de imagem estão em desenvolvimento com o objetivo de auxiliar o diagnóstico clínico em casos precoces, duvidosos e em fase pré-clínica.

3.9 PAPEL DOS EXAMES DE IMAGEM NA DOENÇA DE ALZHEIMER

A TC e a RM convencionais são utilizadas na avaliação dos pacientes com diagnóstico de demência. Contudo, ambos os métodos têm baixa sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de DA e são, pois, primariamente utilizados para a exclusão de outras causas de demência, como hidrocefalia de pressão normal, demência vascular e lesões expansivas. A RM, por sua superior capacidade de detalhamento anatômico e de detecção de alterações, é o método de escolha para os pacientes em questão, exceto quando houver contra-indicações para sua realização.

Exames convencionais de RM, entretanto, podem mostrar apenas alterações volumétricas que podem ser consideradas habituais na faixa etária até fases mais moderadas a avançadas da doença, quando existe atrofia mais acentuada, principalmente frontal, temporal e parietal.

Técnicas de imagem mais avançadas visam a chegar a um diagnóstico mais precoce, podendo ser divididas em avaliação estrutural (volumetria, volumetria seriada, técnicas de compressão e subtração de volumes de interesse) e funcional (PET, SPECT, ressonância magnética funcional, perfusão por ressonância magnética e ERM).

Estudos volumétricos seriados têm revelado uma redução volumétrica global maior na DA do que no envelhecimento normal (Fox *et al.*, 2001).

A redução volumétrica do hipocampo é um dos primeiros sinais da DA e um dos fatores de risco para o desenvolvimento desse tipo de demência

(Convit *et al.*, 1997; Jack *et al.*, 1997). O comprometimento do hipocampo na DA é tão constante que a doença tem sido denominada por muitos como “demência hipocampal” (Ball *et al.*, 1985).

Diversos trabalhos apresentam evidências claras de que a atrofia hipocampal é um dado importante no diagnóstico precoce da DA (Scheltens *et al.*, 1992; Fox *et al.*, 1996; Jack *et al.*, 1997; Laakso *et al.*, 1998). Alguns estudos demonstram atrofia hipocampal em fase pré-clínica, indicando, igualmente, que a taxa de atrofia dessas regiões pode diferenciar pacientes com CCL que evoluíram posteriormente para DA (Fox *et al.*, 1996; Visser *et al.*, 2002).

No entanto, a gliose reativa que ocorre após a lesão neuronal pode atenuar a redução volumétrica, dificultando a detecção de DA pela imagem estrutural por ressonância magnética (Schuff *et al.*, 2002).

O SPECT detecta fluxo cerebral semiquantitativo ou relativo e o PET detecta consumo de glicose e também fluxo cerebral, observando-se menor fluxo relativo/consumo de glicose nas regiões temporoparietais, com a magnitude dessas anormalidades correlacionando-se com a gravidade do déficit cognitivo (Rodriguez *et al.*, 2000; Petrella *et al.*, 2003).

A perfusão por RM é uma técnica em que mais habitualmente se utiliza imagem rápida ponderada em T2* durante a primeira passagem do contraste paramagnético. Alguns estudos demonstraram a obtenção de informações semelhantes às do PET (Rosen *et al.*, 1989; Rempp *et al.*,

1994); porém, a perfusão por RM ainda é uma técnica menos estabelecida na prática clínica e com menor experiência na avaliação da DA.

A ERM é uma aplicação da RM que permite a avaliação dos metabólitos *in vivo*, de maneira não invasiva (Miller, 1991; Castillo *et al.*, 1996) e será descrita detalhadamente no item abaixo.

3.10 ESPECTROSCOPIA DE PRÓTONS NA DOENÇA DE ALZHEIMER

A ERM é uma técnica não invasiva que permite quantificar e determinar a estrutura de moléculas orgânicas em uma solução. Pode ser utilizada para a avaliação de material biológico e não biológico (utilizando amostras puras, isto é, contendo apenas poucas moléculas ou sistemas bem caracterizados), avaliação multicelular ou órgãos inteiros *ex vivo* e avaliação *in vivo*. Na prática médica clínica, a aplicação da ERM de maior utilidade é a ERM *in vivo*, que permite medidas de metabólitos de maneira não invasiva (Salibi e Brown, 1998).

A ERM *in vivo* surgiu em 1973, junto com a imagem por ressonância magnética, quando se deu o início das aplicações do fenômeno da ressonância nuclear magnética na área médica e biológica (Danielsen e Ross, 1999).

Embora muitos aparelhos utilizados na prática tivessem a capacidade de realizar ERM, geralmente era necessária a presença de um físico para

realizar e interpretar os seus resultados, o que limitava bastante a sua utilização.

Em 1995, com a aprovação pelo FDA (*Food and Drug Administration*) de uma seqüência de ERM totalmente automática, rápida e acessível para aplicação neurológica, houve uma mudança importante nessa situação, verificando-se um grande crescimento no interesse e utilização dessa técnica na prática médica clínica (Danielsen e Ross, 1999).

O estudo de ERM com o núcleo de próton (^1H) é o mais utilizado na prática clínica pela abundância desse elemento no organismo, pela alta sensibilidade à ressonância magnética nuclear desse próton em relação a outros núcleos e pela possibilidade de realização da ERM de prótons com a mesma bobina utilizada para realizar imagens rotineiras de RM (Castillo *et al.*, 1996). Outros núcleos podem ser estudados pela ERM com interesse biológico, como o lítio (^7Li), o carbono (^{13}C), o nitrogênio (^{14}N), o flúor (^{19}F), o sódio (^{23}Na), o alumínio (^{27}Al), o fósforo (^{31}P), o cloro (^{35}Cl), o potássio (^{39}K), o manganês (^{55}Mn) e o cobalto (^{59}Co) (McClure, 1995).

Cada núcleo apresenta um *spin* intrínseco, resultante do número ímpar de prótons ou nêutrons. Quando submetidos a um forte campo eletromagnético, existe alinhamento desses *spins* de maneira paralela ao campo aplicado. Quando aplicamos um pulso de radiofrequência específico (com a frequência de precessão característica para cada núcleo a ser estudado) por alguns microssegundos existe um desalinhamento do vetor total de magnetização. Quando o pulso de radiofrequência cessa, existe um

realinhamento ao campo magnético, o qual gera um pequeno sinal elétrico. Esse sinal elétrico (*free induction decay* - FID) é detectado pelas bobinas e, através de um cálculo matemático (transformada de Fourier), chega-se ao gráfico de espectroscopia.

A frequência de precessão dos prótons (ou frequência de Larmor) pode ser calculada pela equação de Larmor, sendo proporcional à intensidade do campo magnético aplicado e à constante giromagnética, esta específica para cada elemento químico e isótopo. Os prótons, no entanto, sofrem pequenos desvios da frequência de precessão calculada pela equação de Larmor devido ao campo magnético gerado pelos elétrons adjacentes, sendo o fenômeno chamado de desvio químico (*chemical shift*). Cada metabólito apresenta, então, um desvio químico específico - que pode ser medido em Hertz (Hz) ou em partes por milhão (ppm) - da diferença da frequência de referência. Geralmente, se utiliza a unidade de ppm, porque ela independe da intensidade do campo magnético, ou seja, independentemente do campo magnético utilizado, a medida da diferença em ppm entre dois metabólitos será sempre a mesma (Besson *et al.*, 1992).

O resultado desse processo não é uma imagem anatômica, porém um gráfico onde, no eixo horizontal, observamos a variação da frequência de ressonância (desvio químico), específica para cada metabólito e expressa em ppm, e no eixo vertical, a amplitude de cada metabólito. A amplitude ou a integral da área do pico de cada metabólito permite uma quantificação relativa do mesmo (Castillo *et al.*, 1996).

Na ERM, analisam-se amostras tridimensionais, denominadas VOI, e exclui-se o sinal do restante do tecido que estiver fora desse volume. O VOI deve ser posicionado de forma a conter o máximo possível do tecido a ser estudado.

Embora as imagens de RM sejam possíveis graças à grande sensibilidade inerente da RM aos prótons e à alta concentração de água nos tecidos biológicos, para a realização da ERM é de fundamental importância a supressão da água, que apresenta uma concentração de cerca de 10.000 vezes maior que os outros metabólitos a serem analisados (Kwock, 1998). Sem a supressão da água, a variação entre o maior e menor pico seria muito grande, o que prejudicaria a sensibilidade na detecção e análise dos metabólitos de menor concentração (Salibi e Brown, 1998).

O passo seguinte à supressão da água é a homogeneização do campo magnético (no inglês é denominado *shimming*) dentro do VOI e que, geralmente, é feita de maneira automatizada. Após o processo de homogeneização do campo magnético, o valor da largura do pico da água em unidades de frequência (FWHM -*frequency width at half maximum*) pode ser utilizado como uma medida do resultado da homogeneização de campo obtida, sendo melhor quanto menor for esse valor.

Quando não existe uma boa homogeneização pela presença de material que determina heterogeneidade do campo magnético, no interior ou próximo ao VOI, como material ferromagnético (encontradas, por exemplo, em próteses metálicas), osso, ar, sangue ou gordura, existe um alargamento

dos picos de metabólitos, determinando dificuldade na quantificação dos metabólitos ou até mesmo superposição entre picos diferentes.

O estudo de ERM pode ser classificado em VOI único ou múltiplo, o segundo sendo uma técnica que analisa, simultaneamente, múltiplas regiões de interesse. O estudo de VOI único é o mais comum devido à sua simplicidade, fácil implementação, boa homogeneização do campo e acesso imediato à interpretação do gráfico e das relações de picos de metabólitos. O estudo de múltiplos volumes de interesse, por sua vez, possibilita a aquisição simultânea de múltiplos volumes de interesse (até 32 x 32 VOI em uma medida), permitindo a obtenção de mapas espectrais e mapas de metabólitos que podem também ser sobrepostos a imagens de RM convencionais (Salibi e Brown, 1998). No entanto, na prática clínica, tem sido ainda menos utilizada que a ERM de VOI único, pois necessita de processamento em uma estação de trabalho para a obtenção das referidas informações, tornando o processo um pouco mais trabalhoso e demorado.

As duas técnicas mais utilizadas para a realização da ERM são: STEAM (modo de aquisição através de ecos estimulados – *stimulated echo acquisition mode*) e PRESS (espectroscopia com resolução pontual – *point resolved spectroscopy*).

Atualmente, ambas as técnicas (STEAM e PRESS) são capazes de detectar metabólitos com tempo de eco (TE) curto e longo. A técnica STEAM permite uma supressão de água mais efetiva e sem necessidade de aumento do tempo total de aquisição, pois existe um intervalo nessa

seqüência, chamado de tempo de mistura, necessário à obtenção dos ecos estimulados, em que se podem realizar pulsos adicionais de saturação de água além daqueles realizados no início da seqüência (Kwock, 1998).

A técnica PRESS, porém, é menos sensível à movimentação do paciente e tem o dobro da relação sinal/ruído que a técnica STEAM (De Graaf, 1998; Kwock, 1998).

O estudo com VOI único pode utilizar qualquer uma das técnicas; entretanto, o estudo com aquisição simultânea pode usar apenas a técnica PRESS em aparelhos de uso comercial.

O TE utilizado influi nos metabólitos passíveis de análise na ERM. O TE longo permite avaliação do N-acetil aspartato (Naa), colina (Co), creatina (Cr) e lactato (Lac), enquanto que o TE curto permite analisar, além desses metabólitos, o mioinositol (mi), complexo glutamato glutamina (Glx) e glicina (Kwock, 1998). Até o momento, o estudo de ERM com VOI múltiplos geralmente utiliza TE longo na maioria dos equipamentos disponíveis.

Os principais metabólitos analisáveis pela ERM no cérebro são (Ross *et al.*, 1997; Valenzuela e Sachdev, 2001) os abaixo apresentados.

- 1) N-acetil aspartato (Naa, chemical shift (δ) = 2,02 e 2,6 partes por milhão [ppm]). O Naa existe no cérebro em uma concentração de aproximadamente 12 mmol/L, estando elevado na doença de Canavan e reduzido em áreas de patologias neurológicas. É um metabólito exclusivo dos neurônios e oligodendrócitos (Urenjak *et al.*, 1992), não sendo detectado Naa em tecidos fora do SNC. O Naa existe no corpo celular,

axônio e dendritos (Simmons *et al.*, 1991). Há redução de Naa em doenças que têm perda neuronal e/ou axonal (Arnold *et al.*, 1992; Graham *et al.*, 1994; Foong *et al.*, 1999). No entanto, não se pode inferir simplesmente que a medida de Naa será igual à densidade neuronal (Barker, 2001). Há evidências de que a redução de Naa pode, algumas vezes, ser reversível, sendo que o volume de água cerebral e o volume de distribuição aparente devem ser considerados na interpretação das medidas (Catani *et al.*, 2003). Além disso, foi descrita reversão de suas alterações após remissão de surtos de esclerose múltipla (De Stefano *et al.*, 1993), pós-trauma (De Stefano *et al.*, 1995) e, em alguns pacientes com Complexo AIDS demência após tratamento (Vion-Dury *et al.*, 1995). Pode-se considerar, portanto, que o Naa representa um marcador da viabilidade neuronal. O Naa pode ser estudado tanto com TE curto ou longo e representa o maior pico numa espectroscopia normal do SNC.

- 2) Colina (Co, $\delta = 3,2$ ppm). A colina é um precursor limitante da síntese da acetilcolina e um precursor da fosfatidilcolina da membrana celular. O pico de colina na espectroscopia mede o nível total de colina móvel, que inclui colina livre, acetilcolina (presente em quantidades relativamente pequenas), glicerofosforilcolina (um produto da quebra da fosfatidilcolina) e fosfocolina (um precursor da fosfatidilcolina). Observa-se o aumento dos seus níveis quando ocorrem proliferação de membranas e hiper celularidade ou em processos desmielinizantes. A Co pode ser estudada tanto com TE curto ou longo.

-
- 3) Creatina-fosfocreatina (Cr, $\delta = 3,0$ e $3,9$ ppm). Representa uma reserva energética e o pico de Cr reflete a integridade dos sistemas energéticos. É relativamente estável, e é utilizada como denominador para a realização da relação entre os picos de metabólitos. Pode ser estudada com TE curto ou longo.
 - 4) Mioinositol (ml, $\delta = 3,6$ e $4,0$ ppm). O ml é um metabólito marcador de células gliais, osmorregulador, mensageiro intracelular e um agente desintoxicante no cérebro. Cerca de 70% do pico de ml corresponde ao ml livre, enquanto que cerca de 15% corresponde ao ml fosfato. O pico de mioinositol é significativo em tecidos fora do SNC, como nos carcinomas de cabeça e pescoço. Necessita de TE curto para ser detectado.
 - 5) Complexo glutamato glutamina (Glx, $\delta = 2,1$ a $2,4$ ppm). O glutamato funciona como principal neurotransmissor excitatório no cérebro; a glutamina tem função na desintoxicação e participa na regulação do glutamato, seu precursor. A individualização de cada um dos picos é difícil e, comumente, descreve-se como um complexo de picos. Precisa de TE curto para ser estudado.
 - 6) Lactato (Lac, $\delta = 1,32$ e $4,1$ ppm). O lactato tem uma configuração característica e é representado por um pico duplo (*doublet*). Além disso, apresenta inversão do seu pico (abaixo da linha de base) com TE de 136 ms. O pico localizado em 4.1 ppm tem uma proximidade grande com o pico da água e, geralmente, é suprimido. Normalmente os níveis de
-

lactato no cérebro não são detectáveis, e um aumento do seu pico representa predomínio do metabolismo anaeróbio da glicose.

- 7) Lipídios ($\delta = 0,8; 1,2; 1,5$ e $6,0$ ppm). Precisam de TE curto para sua detecção e podem estar aumentados em astrocitomas com alto grau de malignidade e meningiomas, além de processos necróticos. Deve ser lembrado, porém, que o aparecimento desse pico pode decorrer de contaminação de gordura do subcutâneo dentro do VOI.

Os primeiros trabalhos com ERM de prótons na DA datam do início da década de 90 (Klunk *et al.*, 1992; Meyerhoff *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1993; Shiino *et al.*, 1993). Estudos *post-mortem* têm demonstrado uma redução do Naa e suas relações nas regiões temporoparietais, hipocampais e parahipocampais (Klunk *et al.*, 1992; Kreiss *et al.*, 1993; Kwo-On-Yuen *et al.*, 1994; Mohanakrishnan *et al.*, 1997), que correspondem aos locais de maior concentração das PS e ENF.

Os achados mais constantes nos estudos de ERM na DA *in vivo* são a redução do Naa e de suas relações (Naa/Cr e Naa/água) (Shonk *et al.*, 1995; Frederick *et al.*, 1997; Schuff *et al.*, 1998; Jessen *et al.*, 2000; Kantarci *et al.*, 2000; Engelhardt *et al.*, 2001; Block *et al.*, 2002b; Kantarci *et al.*, 2002b; Schuff *et al.*, 2002; Herminghaus *et al.*, 2003; Weiss *et al.*, 2003; Martinez-Bisbal *et al.*, 2004) e o aumento de ml e de suas relações (ml/Cr e ml/água) (Shonk *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1998; Kantarci *et al.*, 2000; Engelhardt *et al.*, 2001; Kantarci *et al.*, 2002b; Herminghaus *et al.*, 2003; Martinez-Bisbal *et al.*, 2004), sendo o aumento de ml e de suas relações um

achado mais precoce (Kantarci *et al.*, 2000; Catani *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2001).

O aumento do ml e de suas relações foi detectado tanto em substância branca como na cinzenta (Miller *et al.*, 1993; Klunk *et al.*, 1996; Kantarci *et al.*, 2000) e também em pacientes com síndrome de Down em fase pré-clínica da DA (Huang *et al.*, 1999).

A colina e suas relações apresentam achados variáveis. Alguns trabalhos demonstram seu aumento (Meyerhoff *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1993; MacKay *et al.*, 1996; Lazeyras *et al.*, 1998; Pfefferbaum *et al.*, 1999a), porém este aumento não foi confirmado por outros trabalhos (Miller *et al.*, 1993; Moats *et al.*, 1994; Ernst *et al.*, 1997; Heun *et al.*, 1997; Parnetti *et al.*, 1997; Schuff *et al.*, 1998; Rose *et al.*, 1999).

A relação ml/Naa, que reúne as duas alterações metabólicas mais significativas na DA, é considerada importante na detecção da DA (Moats *et al.*, 1994; Shonk *et al.*, 1995; Parnetti *et al.*, 1997; Rose *et al.*, 1999). Segundo Shonk *et al.*, 1995, a associação da redução do Naa e aumento do ml caracterizam a DA. Nesse trabalho, os autores mostram a importância dessa relação num estudo com uma grande casuística: 212 indivíduos, com 65 pacientes com DA, 39 com outras demências, 10 com demência frontal, 98 idosos sem demência mas com outras doenças metabólicas e 32 controles sadios. Foi feita a ERM do córtex bioccipital utilizando-se TE curto (30ms), com uma sensibilidade de 83% e especificidade de 98% (valor preditivo positivo de 98% e valor preditivo negativo de 65%) para o

diagnóstico de DA através da relação ml/Naa, quando comparados ao grupo de controles. Já a avaliação da relação de ml/Cr conseguiu distinguir a DA das outras demências analisadas: demência multinfarto, pseudodemência (depressão) e demência associada à doença de Parkinson com 82% de sensibilidade e 64% de especificidade, e valor preditivo negativo de 80%. Um outro estudo com avaliação parietal central, incluindo o cíngulo posterior, observou que a relação ml/Naa foi a que melhor diferenciou pacientes com DA de controles (Rose *et al.*, 1999).

A alteração do Naa e de suas relações foram correlacionadas com a gravidade das alterações cognitivas em diversos trabalhos (Kwo-On-Yuen *et al.*, 1994; Heun *et al.*, 1997; Adalsteinsson *et al.*, 2000; Jessen *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2001; Weiss *et al.*, 2003; Frederick *et al.*, 2004) e, principalmente, com a memória (Chantal *et al.*, 2002). A associação entre Naa e ml também foi correlacionada com a gravidade da doença (Waldman e Rai, 2003).

A redução isolada do Naa ou de suas relações, porém, não é específica da DA, podendo ser encontrada em doenças vasculares (Wardlaw *et al.*, 1998; Capizzano *et al.*, 2000), metabólicas (Rajanayagam *et al.*, 1997) e inflamatórias (De Stefano *et al.*, 2001).

O aumento do ml pode também ser detectado em outras patologias: *diabetes mellitus* (Kreis e Ross, 1992; Geissler *et al.*, 2003), leucodistrofia metacromática (Brockmann *et al.*, 2003), encefalopatia hipóxica (Groenendaal *et al.*, 1996), insuficiência renal, hipernatremia (Lee *et al.*,

1994) e demência frontotemporal (Huang *et al.*, 2001). A redução do ml pode ser encontrada em encefalopatia hepática (Kreis *et al.*, 1991; Kreis *et al.*, 1992), inclusive encefalopatia hepática subclínica (Ross *et al.*, 1994) e hiponatremia (Videen *et al.*, 1995).

Deve-se considerar, portanto, não apenas a alteração metabólica, mas também o local esperado de alteração segundo sua fisiopatologia.

A grande maioria dos estudos de ERM na DA avaliou o neocórtex associativo, como a região occipital medial, temporoparietal, temporal e parietal, as quais representam os locais mais tardiamente acometidos na DA. Em busca do diagnóstico precoce, outros locais do cérebro têm sido examinados. Segundo os estágios de alterações patológicas descritas por Braak em 1993, há maior e mais precoce acometimento do córtex límbico do que do isocórtex, poupando até estágios mais avançados o córtex motor e sensitivo primários. Dentro do sistema límbico, a região mesial temporal (córtex entorrinal, transentorrinal e hipocampo) é o local inicialmente acometido, seguido do restante do sistema límbico.

Por outro lado, estudos com PET têm mostrado alterações precoces no cíngulo posterior, que constitui córtex de associação límbica (Reiman *et al.*, 1996; Minoshima *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 1998). O cíngulo posterior tem participação importante no aprendizado espacial (Sutherland *et al.*, 1988), aquisição de memória a longo prazo (Meunier e Destradre, 1988), memória de orientação espacial (Vogt *et al.*, 1992), memória verbal e

auditiva (Meyerhoff *et al.*, 1993) que, quando lesada, leva à amnésia anterógrada e retrógrada (Valenstein *et al.*, 1987; Yukie, 1995).

Um outro estudo com SPECT demonstrou redução da perfusão cerebral no complexo amígdalo-hipocampal, tálamo anterior e cíngulo posterior (Johnson *et al.*, 1998).

Em um estudo de Kantarci *et al.*, em 2000, foram comparados os achados de ERM no cíngulo posterior, regiões temporal superior e occipital medial entre DA e CCL, detectando-se alteração mais precoce no cíngulo posterior, caracterizada pelo aumento da relação ml/Cr. A redução da relação Naa/Cr foi mais tardia e foi detectada na região temporal superior e cíngulo posterior dos pacientes com DA, mas não daqueles com CCL. Nesse mesmo estudo, porém, os autores lembram que a região temporal medial não foi avaliada e que tal área, conforme a classificação de Braak, poderia mostrar alterações ainda mais precoces.

Alguns estudos compararam os achados de ERM dos hipocampus com outras regiões neocorticais, tendo sido encontrada uma redução da relação Naa/Cr precocemente nos hipocampus em relação ao córtex da região pré e pós-central (Jessen *et al.*, 2000; Jessen *et al.*, 2001), região temporal lateral e occipital (Block *et al.*, 2002a). Porém, esses estudos de ERM utilizaram TE longo, não permitindo a avaliação da relação ml/Cr.

Em 2002, Watanabe *et al.* estudaram oito pacientes com DA, oito com doença de Binswanger (demência vascular) e três controles usando ERM na substância branca e cinzenta (hipocampus, cíngulo posterior e bioccipital).

Constatou-se, nesse estudo, redução de Naa (tendo sido realizada quantificação absoluta) nos hipocampus nos pacientes com DA em relação ao grupo com doença de Binswanger e ao de controle, e não foi detectada alteração significativa do Naa no cíngulo posterior, o que pode indicar que a alteração de Naa nos hipocampus foi mais precoce do que no cíngulo posterior, nessa casuística. Mais uma vez, porém, o Mi ou a relação ml/Cr não foi avaliada.

Encontrou-se cerca de 10 estudos de ERM com avaliação da região temporal mesial; porém, apenas quatro utilizaram TE curto (Engelhardt *et al.*, 2001; Chantal *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 2002; Chantal *et al.*, 2004), o que possibilita a avaliação conjunta do Naa e ml. Desses estudos, três (Engelhardt *et al.*, 2001; Chantal *et al.*, 2002; Chantal *et al.*, 2004) utilizaram um VOI de 2 x 2 x 2cm, e um (Watanabe *et al.*, 2002) não especificou a dimensão do VOI. Dos referidos estudos, um analisou somente essa região (Engelhardt *et al.*, 2001; Chantal *et al.*, 2002); dois examinaram também o neocórtex associativo (córtex pré-frontal e parietotemporal) (Chantal *et al.*, 2002; Chantal *et al.*, 2004) e o outro, o cíngulo posterior (Watanabe *et al.*, 2002). Esse último estudo, porém, tem uma casuística de apenas oito pacientes com DA e três controles, não mencionando também a análise do ml, embora ele tenha sido feito com TE curto. Esses trabalhos estão resumidos na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Tabela de publicações sobre ERM na região temporal medial usando TE curto

AUTOR ANO	CASUÍSTICA	LOCAL DE ESTUDO	TÉCNICA	TAMANHO VOI (cm)
Chantal 2004	14 DA Leve 14 CCL 14C	Temporal medial, córtex pré-frontal e córtex parietotemporal bilateral	PRESS TE=50 ms	2 x 2 x 2 3 x 2 x 1 4 x 2 x 1
Watanabe 2002	8 DA 8 BD 3 C	Cíngulo posterior e hipocampus	PRESS TE=30 ms	?
Chantal 2002	14 DA leve 14 C	Temporal medial, córtex pré-frontal e córtex parietotemporal bilateral	PRESS TE=50 ms	2 x 2 x 2 3 x 2 x 1 4 x 2 x 1
Engelhardt 2001	40 DA 20 C	Hipocampus	PRESS TE=50 ms	2 x 2 x 2

NOTA: BD=doença de Biswanger; DA=doença de Alzheimer; C=controle; CCL=comprometimento cognitivo leve; PRESS=espectroscopia por resolução pontual; TE=tempo de eco.

É importante ressaltar que na ERM, porém, a escolha do VOI tem fundamental importância para o resultado obtido, pois somente a área dentro do VOI será analisada e, ao mesmo tempo (nos estudos com VOI único), tudo o que estiver dentro do VOI será levado em consideração para o resultado. Portanto, é de crucial importância haver a menor “contaminação” possível, isto é, tecido que não represente o objetivo de estudo, dentro do VOI selecionado. O hipocampo tem uma morfologia alongada e suas dimensões são pequenas, de modo que um VOI cúbico de 2 x 2 x 2 cm³ conseguirá englobar apenas pequena parte de tecido hipocampal, e a maior parte desse volume será ocupada por córtex e substância branca do

restante do lobo temporal. O estudo de ERM com VOI múltiplos, por outro lado, resolveria o problema da “contaminação”, mas não permitiria o uso do TE curto, já que, atualmente, os aparelhos disponíveis comercialmente garantem apenas a realização da ERM com VOI múltiplos com TE longo, impossibilitando a análise do ml.

Para o estudo atual foi utilizado um VOI retangular, com medidas que otimizam a inclusão do hipocampo, com TE curto para análise tanto do Naa como do ml, e com técnica PRESS, pois ela apresenta o dobro da relação de sinal/ruído e menor sensibilidade à movimentação do paciente em relação à técnica STEAM (De Graaf, 1998).

O estudo atual visa a analisar também o cíngulo posterior com técnica de VOI único, técnica PRESS, com TE curto, e comparar seus achados com os do hipocampo, ambas estruturas límbicas de acometimento precoce e importantes para o diagnóstico em fases iniciais.

Pela classificação de Braak, o hipocampo é acometido precocemente pela doença em relação ao cíngulo posterior e podem ser esperadas alterações metabólicas mais precoces; porém, a homogeneização do campo é mais difícil e a relação de sinal/ruído é menor nessa estrutura, sendo que até pequenos movimentos do paciente podem piorar ainda mais essas condições. Por outro lado, o cíngulo posterior representa um local mais fácil e rápido de se realizar a ERM, além de melhor homogeneização do campo e melhor relação sinal/ruído, sendo, por isso, importante comparar os achados em ambos os locais.

4 Casuística e Métodos

4.1 CASUÍSTICA

Este foi um estudo prospectivo, baseado na análise de ERM realizadas no setor de Ressonância Magnética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no período de outubro de 2003 a março de 2005, em 45 pacientes provenientes do ambulatório de Neurologia Cognitiva e do Comportamento do mesmo hospital e do Centro de Referência em Distúrbios Cognitivos (CEREDIC).

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O paciente ou o seu responsável legal foi informado e orientado quanto à participação neste estudo e, após manifestar sua aceitação, assinou o termo de consentimento informado livre e esclarecido (Anexo A).

Os critérios de inclusão neste estudo foram:

- pacientes com diagnóstico de DA provável pelos critérios do NINCDS-ADRDA e com demência leve a moderada, segundo os critérios do DSM-III R;
 - assinatura do termo de consentimento informado pelo paciente ou por seu responsável legal;
 - paciente colaborativo.
-

Todos os pacientes realizaram exames para dosagem de vitamina B12, dosagem de hormônios tireoidianos, sorologia para sífilis, hemograma, dosagem de uréia e creatinina, enzimas hepáticas e proteínas totais de frações para exclusão de outras causas de déficits cognitivos.

Foram considerados critérios de exclusão:

- pacientes com doenças psiquiátricas ou neurológicas;
- antecedentes de traumatismo craniano;
- uso de medicação psicotrópica;
- *diabetes mellitus*;
- evidências, por exame de imagem (RM), de lesões cerebrais focais ou difusas, tais como tumores, hidrocefalia e infartos cerebrais; não se considerou critério de exclusão a presença de focos esparsos de alto sinal na substância branca dos hemisférios cerebrais na seqüência ponderada em T2, comumente observados em pacientes idosos (classe 1 e 2 da escala de Fazekas e Schmidt (Fazekas *et al.*, 1987; Schmidt *et al.*, 1992));
- foram excluídas as espectroscopias nas quais, após o processo de homogeneização do campo magnético, o valor da largura do pico da água em unidades de frequência (FWHM -*frequency width at half maximum*) foi maior que 7Hz.

Com base nesses critérios, foram excluídos 16 pacientes (11 com diabetes mellitus, quatro por infartos cerebrais e um por *diabetes mellitus* e meningeoma); portanto, 29 pacientes fazem parte deste trabalho. As idades variaram entre 56 e 87 anos (média de $74,2 \pm 7,6$ anos e mediana de 75

anos - **Gráfico 1**). Do total de pacientes, 17 eram do sexo feminino (59%) e 12 do sexo masculino (41%) (**Gráfico 2**). O conjunto dos dados demográficos dos pacientes: nome, idade, sexo, data de realização de exame, classificação DSM III-R, uso de medicação para DA e valores do MEEM podem ser observados no Anexo B. No anexo C, apresenta-se a versão do MEEM utilizada no estudo (Brucki *et al.*, 2003).

Gráfico 1 - Distribuição dos pacientes segundo a idade

Gráfico 2 - Distribuição dos pacientes segundo o sexo

Constituiu-se, especialmente para este estudo, um grupo de controles de 15 voluntários, sem queixas de déficits cognitivos. Estes voluntários eram idosos sem déficits cognitivos, provenientes do CEREDIC, algumas vezes representando parentes de pacientes com DA atendidos pelo HCFMUSP ou parentes de colegas. As idades variaram entre 66 e 79 anos (média de $72,5 \pm 3,3$ anos) (**Gráfico 3**). Nove voluntários eram do sexo feminino (60%) e seis do sexo masculino (40%) (**Gráfico 4**).

Gráfico 3 - Distribuição dos controles segundo a idade **Gráfico 4 -** Distribuição dos controles segundo o sexo

Todos os voluntários apresentaram valores normais no teste de evocação tardia (≥ 6) (Nitrini *et al.*, 2004b), no MEEM (Brucki *et al.*, 2003) e no teste de fluência verbal (Caramelli *et al.*, 2003; Nitrini *et al.*, 2004b), os dois últimos valores corrigidos para a escolaridade. O teste de fluência verbal consiste em citar nomes de frutas ou animais no menor tempo possível, e anota-se o número citado em um minuto. No teste de memória tardia, o indivíduo deve se lembrar do maior número de figuras desenhadas numa folha de papel (10 figuras), após cinco minutos em que esteve desempenhando outras tarefas.

Os valores normais do MEEM e fluência verbal corrigidos para a escolaridade constam nas **Tabelas 3 e 4**. O conjunto dos dados dos voluntários, com nome, idade, sexo, data do exame, valores do MEEM, fluência verbal, memória de evocação tardia e escolaridade estão no Anexo D. Foram também excluídos controles com depressão, além dos critérios de exclusão dos pacientes.

Tabela 3 - Notas de corte do MEEM para voluntários sadios corrigidos pela escolaridade (Brucki *et al.*, 2003)

ESCOLARIDADE	NOTA DE CORTE DO MEEM
1 a 4 anos	≥ 25
5 a 8 anos	≥ 26
> 8 anos	≥ 28

NOTA: MEEM = Miniexame do Estado Mental.

Tabela 4 - Notas de corte do teste de fluência verbal para voluntários sadios corrigidos pela escolaridade (Caramelli *et al.*, 2003)

<i>ESCOLARIDADE</i>	<i>FLUÊNCIA VERBAL</i>
Analfabetos	≥ 9
1 a 7 anos	≥ 12
≥ 8 anos	≥ 13

4.2 MÉTODOS

Os pacientes e controles foram submetidos a exame de RM e ERM na mesma sessão, em aparelho de 1,5 Tesla, da marca GE-Horizon LX 8.3 (*General Electric* Sistemas Médicos, Milwaukee, WI, EUA), com gradiente de 33 mT/m de intensidade, em bobina de quadratura para o estudo do crânio. Os exames tiveram duração média aproximada de 60 minutos.

O protocolo de aquisição das imagens de RM de crânio foi constituído pelas seguintes seqüências: eco de *spins* (ES) no plano sagital ponderada em T1, eco de *spins* rápido (ESR) ponderada em T2 no plano axial, ponderada em *fluid attenuated inversion recovery* (FLAIR) no plano axial, imagem de difusão ecoplanar (DWI-EPI) no plano axial, gradiente volumétrica (SPGR - *spoiled gradient recalled acquisition in steady-state* – aquisição de ecos de gradientes refocalizados em estado de equilíbrio com dissipação de coerência transversal) e ESR ponderada em T2 no plano axial

para a localização dos hipocampus, chamada de seqüência localizadora. Os parâmetros técnicos estão apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5 - Parâmetros técnicos das seqüências de RM

SÉRIE	TR (ms)	TE (ms)	TI (ms)	ESP/INT (mm)	MATRIZ	NEX	DUR APROXIM
Sagital ES T1	450	8	-	5.0/1.5	288 x 192	1	1min 30s
Volume SPGR T1	-	-	-	1.6/0	256x 192	1	5min 20s
Axial FLAIR	1000 0	92	2300	5.0/2.0	256 x 192	1	2min 20s
Axial DWI- EPI	8000	77.2	-	5.0/0	128 x 128	1	32s
Axial ESR T2	3475	120	-	3.0	256 x 192	2	4 min
Localiz axial ESR T2	3475	102	-	10/0	256 x 192	1	40s

NOTA: DUR APROX=duração aproximada, DWI-EPI=imagem de difusão ecoplanar, ES=eco de *spins*, ESP/INT=espessura/intervalo, ESR=eco de *spins* rápido, Localiz=localizador, ms=milissegundos, NEX=número de excitações por ciclo, SPGR=aquisição de ecos de gradientes refocalizados num estado de equilíbrio com dissipação de coerência transversal, TE=tempo de eco, TI=tempo de inversão, TR=tempo de repetição.

As seqüências de espectroscopia de VOI único foram realizadas por meio da técnica PRESS com TR = 1500 ms, TE = 35 ms, 8 NEX (número de excitações por ciclo), 96 e 128 excitações, respectivamente no cíngulo posterior e nos dois hipocampus, com duração de três minutos no cíngulo

posterior e três minutos e 48 segundos para cada hipocampo. As seqüências de espectroscopia de prótons foram precedidas por uma pré-aquisição automática que inclui um ajuste de receptor-transmissor, otimização do ângulo de inclinação para supressão da água e ajuste da homogeneidade do campo para o VOI selecionado. Não foi realizada administração endovenosa de meio de contraste, excetuando-se dois casos (um paciente e um controle) que apresentaram, como achados incidentais, pequenos tumores de provável origem meningotelial. Esses indivíduos foram excluídos da casuística.

4.2.1 Localização e dimensões dos volumes de interesse

O VOI utilizado para a avaliação do cíngulo teve dimensões de 2 x 2 x 2 cm (8 cm³) e para os hipocampos teve espessura de 1 cm, com a largura e comprimento variáveis, conforme as dimensões do hipocampo, porém em média de 1,5 x 4,0 cm, com volume médio de 6 cm³. A localização do VOI do cíngulo posterior foi feita no plano sagital, na imagem mediana, abaixo do sulco do cíngulo e acima do sulco parietoccipital, incluindo o cíngulo posterior e a região inferior do pré-cúneus; essa localização é habitualmente utilizada para a avaliação do cíngulo posterior em estudos de ERM (Kantarci *et al.*, 2000; Hattori *et al.*, 2002; Kantarci *et al.*, 2002b; Kantarci *et al.*, 2003; Martinez-Bisbal *et al.*, 2004). A localização do VOI no hipocampo foi feita a partir de imagem localizadora no plano axial que passa no centro do hipocampo, previamente programada sobre as imagens sagitais. A

localização do VOI foi realizada em todos os casos pela mesma pessoa (pesquisadora HWL) (**Figuras 1, 2, 3 e 4**).

Figura 1 - Imagem sagital ES ponderada em T1 (TR=450ms, TE=8ms), com representação do VOI no cíngulo posterior

NOTA: ES=eco de *spins*, TR=tempo de repetição, TE=tempo de eco, VOI=volume de interesse.

Figura 2 - Representação do VOI no cíngulo nos planos axial e coronal, através de reformatações da sequência volumétrica SPGR ponderada em T1

NOTA: SPGR=aquisição de ecos de gradientes refocalizados num estado de equilíbrio com dissipação de coerência transversal, VOI=volume de interesse.

Figura 3 - Imagens axiais ESR ponderadas em T2 (TR=3475ms e TE=102ms), com representação do VOI nos hipocampos

NOTA: ESR=eco de *spins* rápido, TR=tempo de repetição, TE=tempo de eco, VOI=volume de interesse.

Figura 4 - Representação do VOI nos hipocampus nos planos coronal e sagital, através de reformatações da sequência volumétrica SPGR ponderada em T1

NOTA: SPGR=aquisição de ecos de gradientes refocalizados num estado de equilíbrio com dissipação de coerência transversal, VOI=volume de interesse.

4.2.2 Escolha dos metabólitos analisados

A relação de Co/Cr não foi incluída na análise desta pesquisa em virtude dos achados inconstantes nos diversos trabalhos de ERM na DA, como já descrito anteriormente (vide capítulo de revisão da literatura). Analisamos, pois, as relações Naa/Cr, ml/Cr e ml/Naa no cíngulo posterior e nos hipocampos.

4.2.3 Processamento

O processamento das espectroscopias foi feito com o programa MRUI (*Magnetic Resonance User Interface*), versão Java, fornecido pelo projeto da União Européia *Advanced signal processing for medical resonance imaging and spectroscopy*, TMR, FMRX-CT97-0160. Esse programa necessita da transferência de dados brutos de espectroscopia, armazenados a partir do aparelho de RM em um servidor e, posteriormente, para um computador pessoal, utilizando-se o protocolo FTP (*file transfer protocol*). No computador pessoal, os dados de cada espectroscopia foram processados por meio do programa MRUI, que permite a quantificação dos dados de espectroscopia através da análise no domínio do tempo, utilizando-se o método AMARES (*advanced method for accurate, robust and efficient spectral fitting*). Uma das primeiras etapas é realizar a correção da fase do espectro. Em seguida, faz-se a localização do pico da água cujo desvio químico é de 4,7 ppm.

Posteriormente, o sinal da água é suprimido através do algoritmo *Hankel-Lanczos singular value decomposition* (HLSVD).

Uma vez suprimido o pico da água, é feita a identificação dos outros picos que serão quantificados. Tal identificação é feita automaticamente, partindo-se de uma base de dados comum a todas as espectroscopias a serem analisadas e que estabelece a posição de cada pico, ajustado segundo um “conhecimento prévio” (*prior knowledge*), baseado em conhecimento teórico.

Desse modo, obtivemos como resultado uma lista de 21 picos identificados, com a frequência (ppm), amplitude e largura média (LM) para cada espectroscopia. A largura média do pico tem relação direta com a homogeneização do campo e quanto menor for esta medida (e, portanto, mais estreito for o pico) melhor será a quantificação do metabólito. Quando a largura média é muito grande, existe menor acurácia na medida desse metabólito, podendo haver sobreposição com picos de metabólitos vizinhos. Considerou-se que os picos quantificados Naa e ml têm a mesma largura de pico que a Cr, por ser um metabólito considerado constante no tecido cerebral, invariável com a idade (Danielsen e Ross, 1999), mesmo em condições patológicas como a DA (Moats *et al.*, 1994; Christiansen *et al.*, 1995; Shonk *et al.*, 1995; Parnetti *et al.*, 1997; Schuff *et al.*, 1997; Pfefferbaum *et al.*, 1999a) ou outras doenças neurodegenerativas (Pioro *et al.*, 1994; Chan *et al.*, 1999).

A partir dos valores de amplitude dos metabólitos no domínio do tempo (que corresponde aos valores da integral da área do pico no domínio da frequência após a transformada de Fourier), calculamos as relações dos mesmos utilizando a Cr como denominador (Naa/Cr e ml/Cr). A relação entre metabólitos através da Cr como denominador é aceita e amplamente utilizada em trabalhos de espectroscopia de prótons na DA (Meyerhoff *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1993; Shiino *et al.*, 1993; Shonk *et al.*, 1995; Kattapong *et al.*, 1996; Tedeschi *et al.*, 1996b; Frederick *et al.*, 1997; Rose *et al.*, 1999; Jessen *et al.*, 2000; Kantarci *et al.*, 2000; Catani *et al.*, 2001; Jessen *et al.*, 2001; Block *et al.*, 2002a; Catani *et al.*, 2002; Hattori *et al.*, 2002; Kantarci *et al.*, 2002b; Colla *et al.*, 2003; Herminghaus *et al.*, 2003; Kantarci *et al.*, 2003; Waldman e Rai, 2003; Weiss *et al.*, 2003; Frederick *et al.*, 2004; Martinez-Bisbal *et al.*, 2004). Alguns outros trabalhos utilizaram o pico da água como denominador (Parnetti *et al.*, 1997; Chantal *et al.*, 2002; Chantal *et al.*, 2004).

Também se calculou a relação m/Naa, que reúne as duas alterações metabólicas mais significativas na DA e que é considerada como tendo grande sensibilidade e especificidade na detecção da doença (Shonk *et al.*, 1995; Rose *et al.*, 1999).

A partir dos valores de amplitude dos picos, também foram criados gráficos: um com os picos individuais, outro com a soma deles, chamado espectroscopia estimada, e ainda um gráfico com o sinal residual a partir da subtração da espectroscopia original e a espectroscopia estimada.

Um exemplo desses resultados do MRUI pode ser observado no Anexo E.

4.2.4 Análise Estatística

Inicialmente, todas as variáveis foram analisadas de forma descritiva.

O teste de Qui-quadrado foi utilizado para a comparação entre as distribuições por sexo dos dois grupos (dados nominais).

Para as variáveis quantitativas contínuas, aplicou-se o teste de Levene para verificar a homogeneidade das variâncias.

Para verificar se os dados seguiam distribuição normal foi realizado o teste de Anderson-Darling e os dados foram considerados como tendo distribuição não normal quando o nível descritivo foi menor que 0,01.

A comparação das médias dos grupos de pacientes e de controle utilizou o teste-t quando os dados seguiam distribuição normal e o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para os dados que não seguiam a distribuição normal.

Para definirmos a sensibilidade e a especificidade das medidas das relações dos metabólitos, utilizamos a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*). Uma medida para a qualidade da curva ROC é a área sob a curva (ASC) do gráfico (Lee e Wang, 2003). Quanto mais próximo de um for

essa área, melhor será o teste (mais sensível e mais específico). Como parâmetro para medir a acurácia do teste, costuma-se utilizar os seguintes valores para as áreas:

- 0,9 a 1,0 : Excelente
- 0,8 a 0,9 : Bom
- 0,7 a 0,8 : Aceitável
- 0,6 a 0,7 : Pobre
- 0,5 a 0,6 : Falho

As correlações entre o MEEM e as relações de metabólitos foram calculadas através do coeficiente linear de Pearson.

O nível descritivo considerado significativo foi de 5% ($< 0,05$), exceto no teste de Anderson-Darling, como acima descrito.

As análises estatísticas foram baseadas em Agresti (1990); Bussab *et al.* (1987); Conover (1980), Hosmer *et al.* (2000); Lee *et al.* (2003); Neter *et al.* (1990); Siegel (1975) e Winer (1971).

5 Resultados

5.1 DESCRIÇÃO DOS GRUPOS

Para a análise, contamos com um total de 44 indivíduos, sendo 29 pacientes e 15 controles. As idades dos pacientes e controles distribuíram-se conforme apresentado na **Tabela 6** e no **Gráfico 5**. Pela análise destes dados, podemos observar que o grupo de pacientes apresenta uma média de idade um pouco superior à do grupo de controles, o mesmo ocorrendo com a sua variabilidade.

Tabela 6 - Medidas das idades em anos dos pacientes e controles

<i>GRUPO</i>	<i>MÉDIA</i>	<i>MEDIANA</i>	<i>DP</i>	<i>MÍNIMO</i>	<i>MÁXIMO</i>	<i>AMOSTRAS</i>
Controles	72,5	72,0	3,3	66	79	15
Pacientes	74,2	75,0	7,6	56	87	29

NOTA: DP=desvio padrão.

Gráfico 5 - Média $\pm$ 1 desvio padrão para a idade dos pacientes e controles

Para verificarmos se a idade era diferente entre os grupos, utilizamos o teste-t para médias (não pareado), por meio do qual obtivemos o nível descritivo de 0,299 e concluímos não haver diferença significativa entre os grupos.

Quanto ao sexo, a distribuição dos pacientes e controles não apresenta diferenças significativas (**Tabela 7 e Gráfico 6**).

Tabela 7 - Distribuição de pacientes e controles quanto ao sexo

<i>GRUPO</i>	<i>FEMININO</i>	<i>MASCULINO</i>	<i>TOTAL</i>
Controles	9	6	15
Pacientes	17	12	29
Total	26	18	44

Gráfico 6 - Distribuição percentual dos pacientes e controles quanto ao sexo

Para verificarmos se os percentuais dos sexos eram ou não diferentes entre os grupos, utilizamos o teste de ajuste Qui-quadrado, por meio do qual obtivemos o nível descritivo de 0,930 e concluímos não haver diferença significativa entre os grupos.

Quanto à escolaridade, os pacientes se distribuíram conforme apresentado na **Tabela 8** e no **Gráfico 7**. Foi possível observar que o grupo de pacientes apresenta uma média de anos de escolaridade um pouco inferior à do grupo de controles, com variabilidades parecidas.

Tabela 8 - Medidas de escolaridade em anos dos pacientes e controles

GRUPO	MÉDIA	MEDIANA	DP	MÍNIMO	MÁXIMO	AMOSTRAS
Controle	8,9	7,0	4,2	4	17	15
Pacientes	6,0	4,0	4,6	0	17	29

NOTA: DP=desvio padrão

Gráfico 7 - Média $\pm$ 1 desvio padrão para a escolaridade (em anos)

Para verificarmos se a escolaridade era diferente entre os grupos, utilizamos o teste-t para médias, por meio do qual obtivemos o nível descritivo de 0,041 e concluímos que há diferença significativa entre os grupos. Mesmo se excluindo duas pacientes analfabetas do grupo de pacientes, houve diferença significativa de escolaridade entre os grupos (nível descritivo do Kruskal-Wallis = 0,024).

Os dados do MEEM se distribuíram conforme apresentado na **Tabela 9** e **Gráfico 8**. Pode-se observar uma média do MEEM menor e uma maior variabilidade no grupo de pacientes.

Tabela 9 - Medidas do MEEM dos pacientes e controles

<i>GRUPO</i>	<i>MÉDIA</i>	<i>MEDIANA</i>	<i>DP</i>	<i>MÍNIMO</i>	<i>MÁXIMO</i>	<i>AMOSTRAS</i>
Controle	27.8	28	1.4	25	30	15
Pacientes	19.0	19	3.9	6	28	29

NOTA: DP=desvio padrão e MEEM=Miniexame do Estado Mental.

Gráfico 8 - Média $\pm$ 1 desvio padrão para o MEEM

NOTA: MEEM=Miniexame do Estado Mental.

O resumo dos dados demográficos dos pacientes e controles está apresentado na **Tabela 10**.

Tabela 10 - Resumo dos dados demográficos do grupo de pacientes e controles

	PACIENTES	CONTROLES
Número de indivíduos	29	15
Idade (anos)	(74,2) $\pm$ 7,6	(72,5) $\pm$ 3,3
Masculino/feminino	12/19	6/9
Escolaridade (anos)	(6) $\pm$ 4,6	(8,9) $\pm$ 4,2
MEEM	(19) $\pm$ 3,87	(27,8) $\pm$ 1,8

NOTA: MEEM=Miniexame do Estado Mental; os valores entre parênteses representam a média e após $\pm$ o desvio padrão.

5.2 DESCRIÇÃO DOS ACHADOS DE ESPECTROSCOPIA

Realizou-se o pós-processamento de três espectroscopias por paciente, excluindo-se oito hipocampos (pacientes 5, 11, 16, 22 e 28) em virtude da inadequada homogeneização do campo magnético (*shimming* maior que 7Hz), totalizando 79 espectroscopias de 29 pacientes (Anexos F, G e H).

Os 15 voluntários do grupo de controles também tiveram três espectroscopias pós-processadas cada um, excluindo-se três hipocampos (controles 10, 11 e 12) por inadequada homogeneização do campo magnético (*shimming* maior que 7Hz), totalizando 42 espectroscopias (Anexos I, J e K).

Foram comparadas as relações entre metabólitos Naa/Cr, ml/Cr e ml/Naa, obtidas do cíngulo posterior, hipocampo direito e esquerdo dos pacientes em relação aos controles. Dos 29 pacientes selecionados, 23 tinham DA leve e seis tinham DA moderada. As análises foram feitas considerando-se o grupo de pacientes e o subgrupo de pacientes com DA leve em relação aos controles. Estas comparações foram feitas através do teste-t (não pareado), uma vez que se obteve distribuição normal desses dados.

5.2.1 Coeficientes de variação dos metabólitos

Calculamos o coeficiente de variação (CV), o qual é a repetibilidade (desvio padrão) dividida pela média dos valores das relações entre os metabólitos analisados. A idéia é que quanto maior o CV maior a variabilidade em relação à média dos valores. No experimento, o mesmo indivíduo (HWL) fez todas as análises, repetindo a medição em 18 amostras selecionadas aleatoriamente para os hipocampus (10 no hipocampo direito e oito no hipocampo esquerdo) e em 24 para cíngulo. Na **Tabela 11**, temos os resultados e observamos que os CVs são baixos, não passando de 10%.

Tabela 11 - Coeficientes de variação para as medidas

<i>LOCAL</i>	<i>MEDIDA</i>	<i>MÉDIA</i>	<i>CV%</i>
Cíngulo	Naa/Cr	1,687	3,9
	ml/Cr	0,082	6,3
	ml/Naa	0,479	5,9
Hipocampos	Naa/Cr	1,358	8,5
	ml/Cr	1,092	6,4
	ml/Naa	0,781	4,3

Nota: CV%=coeficiente de variação em %.

5.2.2 Análise regional da largura média dos picos de metabólitos

A largura média dos picos (LM) representa indiretamente o grau de homogeneização do campo magnético. Os dados estatísticos descritivos dos valores das larguras médias do cíngulo e hipocampos no grupo de controles e no de pacientes (grupo completo) podem ser observados nas **Tabelas 12 e 13** e nos **Gráficos 9 e 10**.

Tabela 12 - Largura média dos picos no grupo dos pacientes

<i>REGIÃO</i>	<i>MÉDIA</i>	<i>MEDIANA</i>	<i>DP</i>	<i>MÍNIMO</i>	<i>MÁXIMO</i>	<i>AMOSTRAS</i>
Cíngulo	4,56	4,57	0,55	3,96	6,31	29
Hipocampos	6,55	6,46	0,76	5,07	8,29	27

NOTA: DP=desvio padrão e $p < 0,001$.

Gráfico 9 - Médias $\pm$ 1 desvio padrão para a largura média (LM) em Hz, dos picos no grupo de pacientes

Para verificarmos se existia diferença em relação à média no grupo de pacientes, utilizamos o test-t pareado, o qual leva em consideração o fato de que fizemos as medidas no mesmo paciente. Por meio dele obtivemos o nível descritivo $<0,001$ e concluímos que temos diferença significativa entre as medidas nos hipocampus e no cíngulo.

Tabela 13 - Largura média dos picos no grupo de controles

REGIÃO	MÉDIA	MEDIANA	DP	MÍNIMO	MÁXIMO	AMOSTRAS
Cíngulo	4,50	4,40	0,47	3,97	5,75	15
Hipocampus	6,19	6,14	0,56	5,35	7,25	15

NOTA: $p < 0,001$.

Gráfico 10 - Médias $\pm$ 1 desvio padrão para largura média (LM) em Hz, dos picos no grupo de controles

Para verificarmos se existia diferença em relação à média no grupo de controles, utilizamos o teste-t pareado, o qual leva em consideração o fato de que fizemos as medidas no mesmo paciente. Por meio dele obtivemos o nível descritivo $<0,001$ e concluímos que também há diferença significativa entre as medidas nos hipocampus e no cíngulo para o grupo de controles.

Portanto, foram observados valores significativamente maiores de LMs nos hipocampus em relação ao cíngulo posterior, tanto no grupo de controles como no de pacientes.

5.2.3 Análise das relações entre metabólitos no cíngulo posterior

No cíngulo posterior, observamos diferença significativa entre as relações Naa/Cr entre os grupos, com $p < 0,001$ tanto para o grupo de pacientes com DA como para o subgrupo com DA leve em relação ao grupo de controles; a relação ml/Naa também mostrou diferença significativa, com $p < 0,001$ para o grupo de pacientes e de 0,002 para o subgrupo com DA leve. A relação ml/Cr não apresentou diferenças significativas entre os grupos de pacientes e de controles ($p=0,093$ para o grupo de pacientes e de 0,292 para o subgrupo com DA leve), porém com baixo poder de teste ($<80\%$). Estes resultados podem ser observados nas **Tabelas 14 a 16**.

Tabela 14 – Resultados da análise dos volumes de interesse no cíngulo posterior do grupo de controles

RELAÇÕES METABÓLITOS	N	MÉDIA	DP	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO
Naa/Cr	15	1,787	0,084	1,790	1,61	1,91
ml/Cr	15	0,773	0,056	0,750	0,68	0,86
ml/Naa	15	0,433	0,033	0,440	0,38	0,49

NOTA: N= número de pacientes.

Tabela 15 - Resultados da análise dos volumes de interesse no cíngulo posterior do subgrupo dos pacientes com DA leve

RELAÇÕES METABÓLITOS	N	MÉDIA	DP	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	p
Naa/Cr	23	1,643	0,084	1,790	1,61	1,91	<0,001
ml/Cr	23	0,802	0,112	0,810	0,48	0,98	0,292
ml/Naa	23	0,493	0,077	0,500	0,29	0,65	0,002

NOTA: DP=desvio padrão, N= número de pacientes e p=nível descritivo.

Tabela 16 - Resultados da análise dos volumes de interesse no cíngulo posterior do grupo de pacientes com DA

RELAÇÕES METABÓLITOS	N	MÉDIA	DP	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	p
Naa/Cr	29	1,636	0,095	1,640	1,46	1,84	<0,001
ml/Cr	29	0,817	0,113	0,820	0,48	1,07	0,093
ml/Naa	29	0,503	0,076	0,500	0,29	0,65	<0,001

NOTA: DP=desvio padrão, N= número de pacientes e p=nível descritivo.

5.2.4 Análise das relações entre metabólitos nos hipocampus

Os valores das relações entre os metabólitos nos hipocampus direito e esquerdo foram considerados conjuntamente. Nos hipocampus, observamos diferença significativa entre as relações ml/Cr entre os grupos com $p < 0,001$ para o grupo de pacientes e de 0,001 para o subgrupo com DA leve; a relação ml/Naa teve diferença significativa com $p < 0,001$ tanto

para o grupo de pacientes como para o subgrupo com DA leve. A relação Naa/Cr não apresentou diferença significativa entre os grupos de pacientes e de controles ($p= 0,072$ para o grupo de pacientes e de $0,074$ para o subgrupo com DA leve), porém com baixo poder de teste ($<80\%$). Esses resultados podem ser observados nas **Tabelas 17 a 19**.

Tabela 17 - Resultados da análise dos volumes de interesse nos hipocampus do grupo de controles

RELAÇÕES METABÓLITOS	N	MÉDIA	DP	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO
Naa/Cr	27	1,482	0,268	1,470	0,49	1,98
ml/Cr	27	1,059	0,128	1,030	0,86	1,27
ml/Naa	27	0,704	0,094	0,700	0,45	0,85

NOTA: DP=desvio padrão e N=número de pacientes.

Tabela 18 - Resultados da análise dos volumes de interesse nos hipocampus no subgrupo dos pacientes com DA leve

RELAÇÕES METABÓLITOS	N	MÉDIA	DP	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	p
Naa/Cr	36	1,369	0,208	1,415	0,95	1,88	0,074
ml/Cr	23	1,185	0,151	1,190	0,78	1,49	0,001
ml/Naa	23	0,883	0,161	0,855	0,59	1,29	<0,001

NOTA: DP=desvio padrão, N=número de pacientes e p=nível descritivo.

Tabela 19 - Resultados da análise dos volumes de interesse no hipocampo dos pacientes com DA

RELAÇÕES METABÓLITOS	N	MÉDIA	DP	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	p
Naa/Cr	47	1,373	0,194	1,390	0,95	1,88	0,072
ml/Cr	47	1,181	0,142	1,190	0,78	1,49	<0,001
ml/Naa	47	0,875	0,152	0,860	0,59	1,29	<0,001

NOTA: DP=desvio padrão, N=número de pacientes e p=nível descritivo.

Os níveis descritivos para os teste de Levine, Anderson-Darling e t-Student para os metabólitos estão detalhados nos Anexos L e M.

5.2.5 Análise da sensibilidade e especificidade das relações entre os metabólitos

Na **Tabela 20**, temos o resumo dos resultados para as curvas ROC, com os valores da área sob a curva (ASC), os níveis descritivos do teste (para verificar se a ASC é significativamente maior que 0,5) e temos também o intervalo de confiança (IC) com 95% de confiança para o valor da ASC. Os melhores resultados das ASC foram em ordem decrescente: Naa/Cr do cíngulo (ASC=0,886, com $p=0,000$), ml/Naa do cíngulo (ASC=0,837, com $p=0,000$) e ml/Naa dos hipocampos (ASC=0,831 com $p=0,000$).

Tabela 20 - Valores da área sob a curva (ASC), níveis descritivos e intervalos de confiança para as ASC

<i>LOCAL</i>	<i>MEDIDA</i>	<i>ASC</i>	<i>p</i>	<i>IC</i>
Cíngulo	Naa/Cr	0,886	<0,001	(0,781 ; 0,990)
	ml/Cr	0,659	0,088	(0,493 ; 0,820)
	ml/Naa	0,837	<0,001	(0,717 ; 0,950)
Hipocampus	Naa/Cr	0,665	0,018	(0,538 ; 0,790)
	ml/Cr	0,745	<0,001	(0,627 ; 0,863)
	ml/Naa	0,831	<0,001	(0,741 ; 0,921)

NOTA: ASC=área sob a curva, p=nível descritivo, IC=intervalo de confiança.

A seguir apresentaremos as curvas ROC para as relações entre os metabólitos (**Gráficos 11 a 13**):

Gráfico 11 – Curva ROC para a relação Naa/Cr

NOTA: C-Naa/Cr= medidas da relação Naa/Cr no cíngulo, H-Naa/Cr= medidas da relação Naa/Cr nos hipocampos.

Gráfico 12 - Curva ROC para a relação ml/Cr

NOTA: C-ml/Cr=medidas da relação ml/Cr no cíngulo, H-ml/Cr= medidas da relação ml/Cr nos hipocampos.

Gráfico 13 - Curva ROC para a relação ml/Naa

NOTA: C-ml/Naa=medidas da relação ml/Naa no cíngulo, H-ml/Naa=medidas da relação ml/Na nos hipocampos.

Os valores de sensibilidade e especificidade para a relação entre os metabólitos acima estão nos Anexos N a S, separados por localização.

Na **Tabela 21**, estão os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia do método para um valor de corte escolhido das relações de metabólitos que apresentaram as melhores áreas sob a curva, considerando-se o grupo completo de pacientes. Na **Tabela 22** estão as mesmas medidas para o subgrupo com DA leve.

Tabela 21 - Valores de sensibilidade/especificidade, valor preditivo positivo/negativo (VPP/VPN) e acurácia do método das relações entre os metabólitos na comparação entre os pacientes e controles

	<i>C Naa/Cr</i>	<i>C ml/Naa</i>	<i>H ml/Cr</i>	<i>H ml/Naa</i>
Valor de corte	1,71	0,46	1,13	0,74
S/E em %	83/87	83/80	70/67	83/60
VPP/VPN em %	92/72	89/71	70/67	78/69
AM em %	84	82	69	76

NOTA: AM=acurácia do método, C Naa/Cr=medida Naa/Cr no cíngulo, C ml/Naa=medida ml/Naa no cíngulo, H ml/Cr=medida ml/Cr nos hipocampos, H ml/Naa=medida ml/Naa nos hipocampos, p=nível descritivo e S/E=sensibilidade/especificidade.

Tabela 22 - Valores de sensibilidade/especificidade, valor preditivo positivo/negativo (VPP/VPN) e acurácia do método das relações entre os metabólitos na comparação entre o subgrupo de pacientes com DA leve e grupo de controles

	<i>C Naa/Cr</i>	<i>C ml/Naa</i>	<i>H ml/Cr</i>	<i>H ml/Naa</i>
Valor de corte	1,71	0,46	1,13	0,74
S/E em %	78/80	78/80	69/70	86/70
VPP/VPN em %	86/71	86/71	76/63	79/79
AM em %	79	79	70	79

NOTA: AM=acurácia do método, C Naa/Cr= medida Naa/Cr no cíngulo, C ml/Naa= medida ml/Naa no cíngulo, H ml/Cr= medida ml/Cr nos hipocampos, H ml/Naa= medida ml/Naa nos hipocampos, p=nível descritivo e S/E=sensibilidade/especificidade.

Considerando-se a acurácia do método, teremos em ordem decrescente: Naa/Cr do cíngulo, ml/Naa do cíngulo, ml/Naa dos hipocampos e ml/Cr dos hipocampos, quando tomado todo o grupo de pacientes; porém, se levarmos em conta apenas o subgrupo com DA leve, verificamos que as relações de Naa/Cr do cíngulo e ml/Naa do cíngulo e hipocampos têm resultados semelhantes no que concerne à acurácia.

5.2.6 Diferenças regionais do padrão metabólico no cíngulo e hipocampos

A comparação das relações entre os metabólitos encontradas no cíngulo posterior e hipocampos, nos grupos controle e de pacientes (inclusive o subgrupo com DA leve), mostra uma redução relativa do Naa/Cr

e aumento das relações ml/Cr e ml/Naa nos hipocampos em relação ao cíngulo; no grupo de pacientes (tanto o grupo completo como o subgrupo com DA leve), existe uma acentuação da diferença em relação ao cíngulo nas relações ml/Cr e ml/Naa. Tais dados estão na **Tabela 23** e nos **Gráficos 14 a 16**.

Tabela 23 - Comparação entre a média das relações entre os metabólitos no cíngulo e nos hipocampos, no grupo de controles, grupo de pacientes e no subgrupo de pacientes com DA leve

GRUPOS ANALISADOS	Naa/Cr	ml/Cr	ml/Naa	AMOSTRAS
Cíngulo -Controle	1,79	0,77	0,43	15
Cíngulo - Pacientes	1,64	0,82	0,50	29
Cíngulo – Pac (DA leve)	1,64	0,80	0,49	23
Hipocampos - Controle	1,48	1,06	0,70	27
Hipocampos - Pacientes	1,37	1,18	0,88	47
Hipocampos – Pac (DA leve)	1,37	1,18	0,88	36

NOTA: Pac=pacientes.

Gráfico 14 - Comparação entre as relações entre os metabólitos no cíngulo e hipocampus do grupo de controles

Gráfico 15 - Comparação entre as relações entre os metabólitos no cíngulo e hipocampus do grupo completo de pacientes

Gráfico 16 - Comparação entre as relações entre os metabólitos no cíngulo e hipocampus do subgrupo de pacientes com DA leve

5.2.7 Análise da associação entre as relações entre os metabólitos e o MEEM

Realizou-se o estudo comparativo entre o MEEM e as relações entre os metabólitos, calculando-se os índices de correlação linear de Pearson para cada metabólito, considerando toda a amostra e também isoladamente para o grupo de pacientes e para o grupo de controles. Duas pacientes (12 e 13) analfabetas e uma outra paciente com DA leve (paciente 14), que apresentava um comprometimento muito acentuado da linguagem, com valor do MEEM muito baixo (MEEM = 6), desproporcional às outras funções cognitivas que estavam relativamente preservadas, foram excluídas desta análise, pois a falta de alfabetização e o comprometimento muito acentuado

da linguagem prejudica a análise e a pontuação do MEEM, o que poderia gerar um viés na associação das relações entre os metabólitos e o MEEM.

Quando analisamos os grupos separadamente, nenhuma associação é significativa. Quando analisamos todos os dados (pacientes e controles) conjuntamente, observa-se correlação significativa para algumas medidas, sendo positiva para a relação Naa/Cr no cíngulo (0,61) e negativa para a relação ml/Naa no cíngulo (-0,55). Tais valores indicam alguma associação, porém com grandes dispersões entre o MEEM e as relações entre os metabólitos. Esses dados podem ser observados na **Tabela 24**.

Tabela 24 - Associação entre MEEM e as relações entre os metabólitos

Medida	GLOBAL		PACIENTES		CONTROLES	
	correlação	p	correlação	p	correlação	p
C-Naa/Cr	0,61	<0,001	0,27	0,176	-0,46	0,086
C-ml/Cr	-0,33	0,035	-0,29	0,149	-0,45	0,094
C-ml/Naa	-0,55	<0,001	-0,36	0,071	-0,11	0,702
H-Naa/Cr	0,21	0,084	0,02	0,888	0,12	0,550
H-ml/Cr	-0,37	0,001	0,01	0,929	-0,14	0,482
H-ml/Naa	-0,47	0,000	-0,04	0,787	-0,26	0,186

NOTA: C Naa/Cr=medida Naa/Cr no cíngulo, Cml/Cr=medida ml/Cr no cíngulo, C ml/Naa=medida ml/Naa no cíngulo, GLOBAL=grupo de controles e de pacientes, H Naa/Cr=medida Naa/Cr nos hipocampos, H ml/Cr=medida ml/Cr nos hipocampos, H ml/Naa=medida ml/Naa nos hipocampos e p=nível descritivo.

Esse nível de associação pode ser bem demonstrado através dos **Gráficos 17 a 22**, onde apresentamos cada indivíduo como um ponto e uma reta de correlação para os dados globais.

Gráfico 17 - Diagrama de dispersão para MEEM e Naa/Cr no cíngulo

NOTA: C-Naa/Cr= medida da relação Naa/Cr no cíngulo.

Gráfico 18 – Diagrama de dispersão para MEEM e ml/Cr no cíngulo

NOTA: C-ml/Cr= medida da relação ml/Cr do cíngulo.

Gráfico 19 - Diagrama de dispersão para MEEM e ml/Naa no cíngulo

NOTA: C-mI/Naa= medida da relação ml/Naa do cíngulo.

Gráfico 20 - Diagrama de dispersão para MEEM e Naa/Cr nos hipocampus

NOTA: H-Naa/Cr= medida da relação Naa/Cr dos hipocampus.

Gráfico 21 - Diagrama de dispersão para MEEM e ml/Cr nos hipocampus

NOTA: H-ml/Cr= medida da relação ml/Cr dos hipocampus.

Gráfico 22 - Diagrama de dispersão para MEEM e ml/Naa nos hipocampus

NOTA: H-ml/Naa= medida da relação ml/Naa dos hipocampus.

6 Discussão

6.1 DESCRIÇÃO DOS GRUPOS

Os grupos estudados não apresentaram diferenças significativas de idade ou distribuição por sexo, porém houve uma diferença significativa, embora pequena quanto à escolaridade (anos de escolaridade) entre os grupos de pacientes e de controles, sendo menor no grupo de pacientes. A diferença de escolaridade entre os grupos nesta casuística se deve a um maior interesse de indivíduos idosos com maior escolaridade na participação como voluntários, fazendo parte do grupo de controles deste estudo, em geral mais esclarecidos e preocupados com os problemas de memória. Ao mesmo tempo, os indivíduos idosos com menor escolaridade apresentavam menor motivação para investigar problemas associados à memória e uma maior resistência em realizar exame de RM. No entanto, é improvável que diferenças de escolaridade possam interferir em resultados de ERM.

6.2 COEFICIENTES DE VARIAÇÃO DOS METABÓLITOS

A reprodutibilidade da ERM já foi previamente comprovada em outros trabalhos utilizando TE longo (Marshall *et al.*, 1996; Tedeschi *et al.*, 1996a; Hsu *et al.*, 2001; Dixon *et al.*, 2002) e TE curto (Rose *et al.*, 1999; Hammen *et al.*, 2005). Marshall *et al.* (Marshall *et al.*, 1996) estudaram a substância

branca parietal direita e esquerda com VOI único de 8 cm³ e TE de 135 ms, em 12 voluntários saudáveis jovens (idade média de 33 anos) e obtiveram CVs de 12 a 17% para a relação Naa/Cr. Tedeschi *et al.* (Tedeschi *et al.*, 1996a) estudaram múltiplos volumes de interesse (centro semi-oval, córtex frontal, córtex parietal, córtex occipital, giro do cíngulo, córtex insular, tálamo e caudado), com TE de 272 ms, em seis voluntários saudáveis (com idades entre 30 e 40 anos) e obtiveram CVs de 8,2 a 22,2% para a relação Naa/Cr. Hsu *et al.* (Hsu *et al.*, 2001) compararam ERM com VOI único (6 cm³) e múltiplo no hipocampo esquerdo, com TE de 135 ms, em 30 indivíduos saudáveis (com idades entre 18 e 36 anos) e observaram coeficientes de variação entre 16 e 19% para a relação de Naa/(Cr+Co). Os CVs foram semelhantes para os estudos com VOI único e múltiplo para a relação entre metabólitos. Dixon *et al.* (Dixon *et al.*, 2002) realizaram 11 medidas de ERM dos hipocampus direito e esquerdo de um indivíduo saudável de 35 anos, com VOI único (4,5 cm³), utilizando TE de 90ms e encontraram CV de 20% para Naa/(Co + Cr).

Rose *et al.* (Rose *et al.*, 1999) estudaram a substância cinzenta parietal central, com VOI de 14,6 cm³ e TE de 30 ms, em 27 idosos saudáveis (média de idade de 74,7 anos) e 13 indivíduos com DA (média de idade de 73,2 anos) e obtiveram CVs de 2,08% para Naa/Cr, 3,10% para ml/Cr e 4,85% para Naa/ml em medidas realizadas num mesmo dia.

Um trabalho recente apresentou o estudo da reprodutibilidade da ERM nos hipocampus com TE curto (30 ms), com VOI de 2 cm³, em 30 voluntários jovens (média de idade de 28,1 anos) e saudáveis, porém com

quantificação absoluta dos metabólitos, tendo sido encontrados valores de CVs de 4,8% para o Naa; 10,8% para a creatina e 11,9% para o mioinositol (Hammen *et al.*, 2005).

No presente estudo, foram encontrados, para todas as relações de metabólitos e para ambas as regiões avaliadas, um CV menor que 10%. No cíngulo, os valores foram comparáveis aos obtidos por Rose *et al.* (Rose *et al.*, 1999) e, nos hipocampos, os valores são comparáveis ao do estudo de Hammen *et al.* (Hammen *et al.*, 2005), ainda mais se considerarmos as diferenças técnicas entre os dois trabalhos, uma vez que a medida utilizada no presente trabalho é a relação entre os metabólitos e não a quantificação absoluta.

6.3 ANÁLISE REGIONAL DA LARGURA MÉDIA DOS PICOS DE METABÓLITOS

A largura média dos picos de metabólitos demonstrou valores significativamente maiores nos hipocampos em relação ao cíngulo posterior, tanto no grupo de controles como no de pacientes, o que significa que a homogeneização do campo magnético foi pior nos hipocampos, apesar do número de aquisições ter sido aumentado nos hipocampos (128 ao invés de 96), acarretando um tempo maior de aquisição (três minutos e 48 segundos).

Essa pior homogeneização pode ser explicada pela proximidade de estruturas ósseas e ar (base do crânio e mastóides) e, em algumas situações, pela proximidade de materiais metálicos de origem dentária; as dificuldades técnicas da realização da espectroscopia de prótons nos hipocampos já foram citadas em trabalhos anteriores (Schuff *et al.*, 1997; Kantarci *et al.*, 2000; Hammen *et al.*, 2005).

O cíngulo posterior, por ter uma localização mais central dentro do crânio, sofre menos interferência desses materiais metálicos dentários, além de estar distante de estruturas ósseas cranianas, o que facilita a homogeneização do campo e permite um número menor de aquisições (96, com duração de três minutos). Com isso, a aquisição é mais rápida e, mesmo assim, com resultados de homogeneização de campo melhores que nos hipocampos.

6.4 COMPARAÇÃO DAS RELAÇÕES DE METABÓLITOS NA DISCRIMINAÇÃO ENTRE O GRUPO DE PACIENTES E O GRUPO DE CONTROLES

O Naa representa um marcador de viabilidade neuronal e está reduzido na maioria das doenças neurodegenerativas, bem como em demências de outras causas. Na DA, as alterações neuropatológicas iniciam-se nas regiões mesiais temporais, com progressão para o restante do sistema límbico, neocórtex de associação e, por último, para o córtex

primário sensitivo e motor. Existe uma forte associação entre o acúmulo de ENF e a proliferação astrocitária e glial (Klunk *et al.*, 1996), o que pode levar a uma redução de Naa e ao aumento de ml. Além disso na DA também se observa perda de neurônios, com conseqüente redução do Naa.

O ciclo metabólico do ml é complexo e não completamente conhecido. É considerado um marcador de gliose, proteína amilóide e emaranhados neurofibrilares presentes na DA. É também um precursor para a síntese e a regeneração da membrana de fosfolípidos (fosfatidil-inositol), e a inibição da enzima dessa conversão também resultaria em um aumento de ml na DA (Ross *et al.*, 1998). O aumento do ml é observado precocemente na DA e já foi descrito aumento de cerca de 20 a 30% nos lobos parietocipitais, frontais e temporais em estágios precoces da doença (Miller *et al.*, 1993; Shiino *et al.*, 1993; Moats *et al.*, 1994; Ernst *et al.*, 1997; Heun *et al.*, 1997; Parnetti *et al.*, 1997; Rose *et al.*, 1999; Kantarci *et al.*, 2000; Valenzuela e Sachdev, 2001). Shonk e Ross, em 1995, descreveram aumento significativo do ml em adultos com síndrome de Down, antes da instalação de demência ou redução do Naa, comprovando a precocidade dessa alteração (Shonk e Ross, 1995). Kantarci *et al.* em 2000 descreveram o aumento de ml no cíngulo posterior como uma alteração precoce, encontrada nos pacientes com CCL que ainda não apresentavam alteração de Naa (Kantarci *et al.*, 2000). No entanto, tal achado não foi confirmado em estudo da ERM na região mesial temporal por outros autores que detectaram aumento de ml em pacientes com DA, porém não em pacientes com CCL (Chantal *et al.*, 2004). No entanto, no estudo de Kantarci *et al.*,

2000, o TE utilizado foi de 30ms, mais sensível para a detecção de ml do que o estudo de Chantal *et al.*, 2004, que utilizou um TE de 50 ms. Assim, o ml sinaliza uma alteração metabólica muito importante na investigação da DA, principalmente em fases precoces.

A relação ml/Naa, que reúne as duas alterações metabólicas mais significativas na DA, é considerada importante na detecção da doença (Shonk *et al.*, 1995; Parnetti *et al.*, 1997; Rose *et al.*, 1999).

Uma outra vantagem da utilização da relação ml/Naa é que ela independe da Cr. Embora muitos autores tenham validado a utilização da Cr na relação entre metabólitos por representar um metabólito estável com o envelhecimento e em diferentes doenças, existem alguns poucos trabalhos que discordam de tal fato e demonstram uma redução da Cr em indivíduos idosos em relação aos jovens (Pfefferbaum *et al.*, 1999b) ou aumento da Cr em pacientes com DA em relação a idosos saudáveis (Huang *et al.*, 1998). Por esse motivo alguns pesquisadores preconizam o uso da quantificação absoluta dos metabólitos e não o de relações utilizando a Cr. Entretanto, a quantificação absoluta é trabalhosa e demorada, dificultando a sua adoção na prática clínica.

Estudos volumétricos e neuropatológicos indicam um acometimento mais precoce do hipocampo do que de outras regiões límbicas e cerebrais.

Diversos trabalhos de volumetria apresentam evidências de que a atrofia hipocampal é um dado importante no diagnóstico precoce da DA (Scheltens *et al.*, 1992; Fox *et al.*, 1996; Jack *et al.*, 1997; Laakso *et al.*,

1998) e um dos fatores de risco para o desenvolvimento desse tipo de demência (Fox *et al.*, 1996; Convit *et al.*, 1997; Jack *et al.*, 1997; Laakso *et al.*, 1998). Alguns estudos demonstram atrofia hipocampal em fase pré-clínica e indicam que a taxa de atrofia dessas regiões pode diferenciar pacientes com CCL que evoluíram posteriormente para DA (Fox *et al.*, 1996; Visser *et al.*, 2002). Na DA, as alterações neuropatológicas iniciam-se nas regiões mesiais temporais (particularmente os ENF) que, mesmo nas fases finais, são uma das regiões mais acometidas (Hyman *et al.*, 1984; Ball *et al.*, 1985; Hyman *et al.*, 1990; Braak *et al.*, 1993).

Por outro lado, estudos com PET mostram alterações de perfusão precoces no cíngulo posterior. Além disso, um trabalho com ERM já demonstrou o acometimento precoce do cíngulo posterior, porém quando comparado com outras regiões corticais como a região temporal lateral e occipital (Kantarci *et al.*, 2000). Neste trabalho, entretanto, não houve comparação entre o cíngulo e o hipocampo.

Já um outro trabalho utilizando SPECT (Johnson *et al.*, 1998) mostrou redução de perfusão tanto no cíngulo posterior como no complexo amígdalo-hipocampal, além do tálamo anterior e cíngulo anterior em pacientes com DA em fase pré-clínica.

No presente estudo, observou-se diferença significativa entre os grupos de controles e de pacientes quanto às relações de picos de Naa/Cr e ml/Naa no cíngulo posterior e de ml/Cr e ml/Naa nos hipocampos, inferindo perda/disfunção neuronal, proliferação glial e acúmulo de ENF nesses locais.

Tais diferenças se mantiveram quando se realizou a comparação entre o subgrupo com DA leve e o de controles, inferindo-se que as alterações encontradas também se aplicam a pacientes nas fases iniciais da doença.

A capacidade de discriminação entre os grupos pode ser quantificada pela sensibilidade e especificidade, representada pela área sob a curva (ASC) da curva ROC. As relações com boa discriminação entre grupos e com os melhores resultados em ordem decrescente foram: Naa/Cr do cíngulo, ml/Naa do cíngulo e ml/Naa dos hipocampos. A melhor discriminação entre os grupos foi obtida com a relação Naa/Cr no cíngulo. As relações ml/Naa, tanto no cíngulo como nos hipocampos, foram semelhantes entre si e somente um pouco inferiores na capacidade de discriminação, em comparação com a relação Naa/Cr no cíngulo. A relação ml/Cr nos hipocampos também teve uma discriminação aceitável entre os grupos, porém menor que as medidas anteriormente descritas.

Se utilizarmos a acurácia do método, porém, teremos valores um pouco superiores para as duas medidas significativas do cíngulo (Naa/Cr e ml/Naa) em relação à medida dos hipocampos (ml/Naa), ao considerarmos o grupo de pacientes com DA. Entretanto, quando consideramos o subgrupo com DA leve, a acurácia é semelhante nas duas regiões para os três metabólitos.

A relação ml/Naa apresentou bons resultados em distinguir o grupo de pacientes (e também o subgrupo com DA leve) tanto no cíngulo como nos hipocampos no presente estudo. Os valores de sensibilidade e

especificidade da relação ml/Naa nos hipocampos foram semelhantes e um pouco superiores aos encontrados no trabalho de Engelhardt em 2001, possivelmente pela diferença no TE de aquisição das espectroscopias, pois, no presente estudo, utilizou-se um TE mais curto e mais sensível para a medida do ml. Os outros trabalhos que utilizaram TE curto para avaliação dos hipocampos não avaliaram a relação ml/Naa, nem a correlacionaram com o cíngulo posterior (Chantal *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 2002; Chantal *et al.*, 2004).

A relação Naa/Cr no cíngulo também demonstrou bons resultados na discriminação entre os grupos de controles e de pacientes, sendo inclusive um pouco superior em relação aos resultados obtidos pela relação ml/Naa tanto do cíngulo como dos hipocampos. Houve uma tendência à redução de Naa/Cr nos hipocampos dos pacientes em relação ao grupo de controles, mas sem atingir diferença estatisticamente significativa. A redução do pico de Naa ou de sua relação com Cr ou água nos hipocampos já foi descrita em estudos de ERM dos hipocampos na DA (Frederick *et al.*, 1997; Schuff *et al.*, 1997; Jessen *et al.*, 2000; Engelhardt *et al.*, 2001; Jessen *et al.*, 2001; Block *et al.*, 2002a; Block *et al.*, 2002b; Chantal *et al.*, 2002; Dixon *et al.*, 2002; Schuff *et al.*, 2002; Chantal *et al.*, 2004; Frederick *et al.*, 2004; Martinez-Bisbal *et al.*, 2004). O fato de não haver diferença significativa no atual estudo pode se justificar, em parte, pelo baixo poder de teste com a amostra de controles deste estudo. Observaram-se, também, diferenças na localização do VOI em relação aos estudos com TE curto (Engelhardt *et al.*, 2001; Chantal *et al.*, 2002; Chantal *et al.*, 2004), que utilizaram um VOI mais

central no lobo temporal, incluindo parte dos hipocampos mas também parte da substância branca temporal adjacente. A localização do VOI no atual estudo, direcionada para a maior inclusão do hipocampo propriamente dito e menor inclusão possível de outras estruturas adjacentes, ficou mais próxima de estruturas ósseas da base do crânio, prejudicando a homogeneização do campo magnético e, conseqüentemente, as medidas dos metabólitos (e de suas relações). Outros estudos, que tiveram a localização do VOI mais próxima daquela do atual estudo, utilizaram TE longo, um deles com estudo de VOI único (Dixon *et al.*, 2002) e os outros com estudo de múltiplos volumes de interesse (Schuff *et al.*, 1997; Jessen *et al.*, 2000; Jessen *et al.*, 2001; Block *et al.*, 2002a; Schuff *et al.*, 2002). O TE longo facilita a mensuração dos picos de Naa e da Cr, melhorando a precisão da medida da relação Naa/Cr; no entanto, não permite a medida do pico de ml. Como não se encontrou diferença estatisticamente significativa na relação Naa/Cr nos hipocampos não se pode comparar a eficácia da relação Naa/Cr para diferenciar pacientes e controles nos dois locais.

A relação de ml/Cr dos hipocampos apresentou uma discriminação aceitável entre os grupos. A relação desses metabólitos no cíngulo posterior apresentou um aumento no grupo de pacientes, entretanto, sem atingir diferença estatisticamente significativa. O aumento do pico de ml ou da relação ml/Cr no cíngulo posterior já foi descrito em estudos anteriores (Rose *et al.*, 1999; Kantarci *et al.*, 2000; Kantarci *et al.*, 2002b; Kantarci *et al.*, 2003; Martinez-Bisbal *et al.*, 2004). O fato de não haver diferença estatisticamente significativa no cíngulo posterior no atual estudo pode

também, em parte, estar relacionado com o baixo poder de teste obtido com a amostra deste estudo para a relação entre metabólitos nesse local. Uma outra explicação possível é a diferença no valor do TR utilizado na sequência de espectroscopia do atual estudo (TR de 1500 ms) em relação a esses outros trabalhos (TR de 2000 ms). O aumento do TR aumenta a relação sinal/ruído; porém, aumenta também o tempo de duração da sequência. A escolha do TR de 1500ms para o presente estudo teve dois motivos: o primeiro era manter os mesmos valores de TR e TE para ambos os locais, a fim de se obter melhor comparação; o segundo era evitar aumentar a duração da sequência, para que fosse viável, futuramente, a sua aplicação na prática clínica. Os valores de TR e TE utilizados foram sugeridos pela empresa fabricante e apresentam, segundo ela, a melhor relação custo/benefício, ou seja, relação sinal/ruído x tempo de duração da sequência. Com isso também não foi possível a comparação da acurácia da relação ml/Cr nos dois locais para diferenciar pacientes e controles.

No presente estudo, não houve melhor sensibilidade, especificidade ou acurácia do método nas relações de metabólitos realizadas nos hipocampos em relação ao cíngulo, mesmo no subgrupo com DA leve. Isso poderia decorrer do fato de que os pacientes, neste estudo, todos com diagnóstico de DA provável, já tinham alterações metabólicas tanto nos hipocampos quanto no cíngulo, correspondendo pelo menos à fase límbica alta da classificação de Braak e Braak (1991). A discreta superioridade da acurácia do método nas medidas das relações de metabólitos no cíngulo posterior (quando considerado o grupo de pacientes e de controles) poderia

estar relacionada com a pior homogeneização do campo magnético nos hipocampos, reduzindo a precisão das medidas dos metabólitos (e de suas relações) nesse último local. A melhora relativa da acurácia do método das medidas dos hipocampos quando considerado apenas o subgrupo com DA leve e de controles (em que as medidas do cíngulo posterior e hipocampos têm igualdade de acurácia do método) poderia indicar um menor comprometimento relativo do cíngulo posterior em fases mais precoces da doença, levando a uma “vantagem” nas medidas das relações entre metabólitos nos hipocampos, as quais, embora prejudicadas pela pior homogeneização do campo magnético, permitiriam obter valores semelhantes de acurácia em distinguir os grupos de pacientes e de controles, quando comparadas com o cíngulo posterior.

A utilidade da ERM dos hipocampos em pacientes com DA pré-clínica (CCL) ainda precisa ser investigada. O estudo por ERM de pacientes em fases ainda mais precoces ou pré-clínicas da doença talvez permita a detecção de alterações mais precoces nos hipocampos do que no cíngulo.

Neste estudo, observa-se boa acurácia da relação ml/Naa tanto no cíngulo posterior como nos hipocampos, para diferenciar os grupos de pacientes e de controles, reforçando a importância de se utilizar essa relação entre metabólitos na avaliação da DA.

6.5 ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DAS RELAÇÕES DOS METABÓLITOS COM O MEEM

Houve uma associação significativa da relação Naa/Cr e ml/Naa no cíngulo posterior com o MEEM. A relação Naa/Cr teve correlação positiva e a relação ml/Naa, uma correlação negativa. As medidas do Naa e da relação Naa/Cr foram correlacionadas positivamente com o MEEM em trabalhos anteriores, quando estudados na substância cinzenta occipital e parietal (Huang *et al.*, 2001), substância cinzenta parietoccipital (Waldman e Rai, 2003), substância cinzenta occipital (Weiss *et al.*, 2003), substância branca temporal (Frederick *et al.*, 2004) e giro para-hipocampal (em estudo *post-mortem*) (Kwo-On-Yuen *et al.*, 1994). Há também evidências de associação entre a diminuição da concentração do Naa e o declínio cognitivo (Adalsteinsson *et al.*, 2000; Kantarci e Jack, 2003). A relação Naa/ml também foi correlacionada positivamente com o MEEM (Waldman e Rai, 2003); contudo para o ml isoladamente ou ml/Cr, essa associação tem resultados discordantes. Alguns trabalhos demonstram a presença de correlação negativa: da relação ml/Cr no cíngulo posterior (Rose *et al.*, 1999) ou do ml, isoladamente, na substância branca frontal (Parnetti *et al.*, 1997). Porém, outros autores (Huang *et al.*, 2001; Waldman e Rai, 2003) não observaram correlação significativa da relação ml/Cr ou do ml, isoladamente, com o MEEM. Possivelmente, a correlação das relações Naa/ml ou ml/Naa sejam devidas ao componente do Naa. De fato, no

presente estudo, a correlação foi mais forte para a relação Naa/Cr do que para a relação ml/Naa.

Os hipocampos não apresentaram associação significativa entre as relações entre metabólitos e o MEEM, o que pode estar relacionado com a pior homogeneização do campo magnético nessa topografia, prejudicando, principalmente, a medida do Naa/Cr dos hipocampos (que obteve o maior valor de CV dentre as relações entre metabólitos obtidas nos hipocampos, neste estudo), e assim prejudicando a medida da relação entre metabólitos, a qual, com mais frequência, é descrita como tendo associação com a gravidade clínica.

6.6 DIFERENÇAS REGIONAIS ENTRE OS PADRÕES METABÓLICOS NO CÍNGULO E HIPOCAMPOS

Observou-se uma diferença regional no padrão metabólico do cíngulo e dos hipocampos, caracterizada por uma relação Naa/Cr menor e por relações ml/Cr e ml/Naa maiores nos hipocampos, quando comparadas com o cíngulo posterior na população estudada. A mesma diferença metabólica regional foi encontrada tanto no grupo de controles como no grupo de pacientes (bem como no subgrupo de pacientes com DA leve).

A redução relativa de Naa nos hipocampos ou em regiões mesiais temporais em relação a outras regiões do cérebro já foi descrita em alguns trabalhos anteriores: em relação ao cíngulo posterior (com quantificação

absoluta, porém com casuística de apenas oito controles e três pacientes) (Watanabe *et al.*, 2002), em relação à região temporal lateral e occipital (Block *et al.*, 2002a) e em relação ao córtex parietal central (Shonk e Ross, 1995; Frederick *et al.*, 1997). O acúmulo de ENF no córtex transentorrinal, entorrinal e na região CA1 do hipocampo é observado em praticamente todos os indivíduos acima de 60 anos e postula-se que tal acúmulo pode, ao menos em parte, explicar as alterações na função mental relacionadas com a idade (Mesulam, 2000).

A relativa redução de Naa nos hipocampus, portanto, mesmo no grupo de controles, poderia estar relacionada com o acúmulo de ENF, embora em graus mais leves de acometimento do que na DA.

O aumento das relações que contêm o ml nos hipocampus em relação ao cíngulo posterior pode indicar um aumento regional desse metabólito, achado que ainda não foi descrito em trabalhos anteriores. Esse aumento também pode estar relacionado com o acúmulo de ENF nos hipocampus.

A diferença metabólica encontrada nessas duas regiões límbicas pressupõe que, na prática clínica, a comparação com valores de relações entre metabólitos de controles deve ser feita apenas entre as mesmas regiões.

7 Conclusões

-
- 1.1 - Observou-se uma redução da relação do Naa/Cr e um aumento das relações do ml/Cr e do ml/Naa tanto no cíngulo posterior como nos hipocampos dos pacientes com DA, quando comparados com os indivíduos do grupo de controles.
 - 1.2 - Existe um padrão metabólico diferente dos hipocampos em relação ao cíngulo posterior para todos os grupos estudados, observando-se uma redução da relação Naa/Cr e um aumento das relações ml/Cr e ml/Naa nos hipocampos em relação ao cíngulo.
 - 2.1 - As relações entre metabólitos Naa/Cr no cíngulo, ml/Naa no cíngulo e nos hipocampos e ml/Cr dos hipocampos foram as que apresentaram melhor resultado para diferenciar os pacientes dos controles.
 - 2.2 - A comparação da relação ml/Naa em ambos os locais não mostrou melhores resultados diagnósticos pela análise dos metabólitos nos hipocampos em relação ao cíngulo posterior.
 - 3 - Observou-se uma correlação positiva da relação Naa/Cr e negativa da relação ml/Naa com o MEEM no cíngulo posterior.
-

8 Anexos

Anexo A – Termo de consentimento pós-informado

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS –INFORMAÇÃO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO.....Nº.....APTO:
BAIRRO:.....CIDADE
CEP:.....TELEFONE:DDD(.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE:.....SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO:.....Nº.....APTO:
BAIRRO:.....CIDADE:.....
CEP:.....TELEFONE:DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Avaliação da Doença de Alzheimer pela espectroscopia de prótons: comparação de volumes de interesse no cíngulo posterior e hipocampus**

2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Dra. Cláudia da Costa Leite

CARGO/FUNÇÃO: Docente da FMUSP e Chefe do Setor de Ressonância Magnética do HCFMUSP

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº: 65.349

UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto de Radiologia – INRAD

PESQUISADOR EXECUTANTE: Dra. Hae Won Lee

CARGO/FUNÇÃO: médica pós-graduanda (doutorado)

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº: 87119

UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto de Radiologia – INRAD

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:SEM RISCO ☐

RISCO MÍNIMO X

RISCO MÉDIO ☐RISCO BAIXO ☐RISCO MAIOR ☐

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 4 anos.**III – EXPLICAÇÕES SOBRE A PESQUISA:**

Ao assinar este formulário você estará concordando em participar da pesquisa que lhe será explicada abaixo:

Esta pesquisa utilizará a ressonância magnética para estudar o cérebro. Esta pesquisa tem como objetivo analisar com detalhes as estruturas do cérebro que estão relacionadas com a doença de Alzheimer.

Na ressonância magnética, o paciente fica deitado dentro de um tubo onde há um barulho alto, e são adquiridas imagens do cérebro. O paciente não pode se mexer durante a realização do exame. A ressonância magnética **não usa radiação** e o exame dura em média 50 minutos.

Não pode fazer este exame: o paciente que tem marca-passo, clip de aneurisma cerebral ou prótese no ouvido e pacientes nos primeiros 3 meses de gestação. Como há uma entrevista antes de fazer o exame, se você tiver qualquer dúvida é só perguntar para o enfermeiro ou o médico.

IV - GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. Você terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecimento de eventuais dúvidas.
2. Será dada a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência prestada à você pelo hospital das Clínicas de São Paulo.
3. Garantimos o sigilo e a privacidade durante e após o término da pesquisa.
4. O HCFMUSP se disponibiliza a prestar assistência médica por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.
5. Há viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V. DADOS DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS:

Dra. Claudia da Costa Leite

Dra. Hae Won Lee

Av. Dr. Ovídio Pires Campos S/N– São Paulo. Setor de Ressonância Magnética .Telefone:
11 – 3069 7095

Dra. Hae: celular: 11 9655-5745 / e-mail: haewonlee@uol.com.br

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 200 .

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal assinatura/carimbo do pesquisador

Anexo B – Nome, data de exame, idade, sexo, MEEM, classificação DSM III-R, anos de escolaridade e uso de medicação dos pacientes

NOME	Data do exame	Idade (anos)	Sexo	MEEM	DSM III -R	Anos Escola	Trat DA
1-JPS	24/10/2003	75	M	20	leve	14	Sim
2-JAN	30/10/2003	67	M	15	moderada	16	Sim
3-MFS	6/11/2003	71	F	28	leve	11	Sim
4-OBM	26/11/2003	74	F	15	moderada	4	Sim
5-IOC	6/12/2003	79	F	19	leve	2	Sim
6-CNZ	6/12/2003	79	F	20	leve	3	Sim
7-HL	6/12/2003	87	F	17	moderada	4	Sim
8-MBG	13/12/2003	65	F	22	moderada	11	Sim
9-LAF*	13/12/2003	57	M	19	leve	6	Sim
10-JSP	4/2/2004	66	M	23	leve	4	Sim
11-LNC	5/3/2004	68	F	22	leve	4	Sim
12-RGO	12/3/2004	78	F	14	leve	0	Sim
13-IRC	19/3/2004	79	F	17	leve	0	Sim
14-JIL	2/4/2004	76	F	6	leve	1	Sim
15-HG	7/4/2004	80	M	22	leve	4	Sim
16-JP	16/4/2004	80	M	18	leve	8	Sim
17-MTRS*	11/8/2004	56	F	20	leve	4	Sim
18-DG	18/8/2004	87	F	19	leve	10	Não
19-RNF	15/10/2004	78	M	17	leve	4	Sim
20-HFC	29/10/2004	87	F	18	leve	4	Não
21-JSC	12/11/2004	68	F	20	leve	4	Não
22-LGS	19/11/2004	78	M	24	leve	17	Não
23-MT	1/12/2004	75	M	19	leve	4	Não
24-CMDA	17/12/2004	72	F	17	moderada	11	Não
25-JG	5/1/2005	74	M	21	leve	10	Não
26-NCP	19/1/2005	76	F	22	leve	4	Não
27-LZ	16/2/2005	77	M	22	leve	1	Não
28-HCS	23/2/2005	70	F	19	leve	4	Não
29-JR	18/3/2005	73	M	17	moderada	4	Não

NOTA: Anos escola=anos de escolaridade, DA=doença de Alzheimer, DSM IIIR= *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – Third edition revised*, F=feminino, M=masculino, MEEM=mini exame do estado mental e trat DA=tratamento da DA.

Anexo C – Miniexame do Estado Mental**MINIEXAME DO ESTADO MENTAL - MEM**

(FOLSTEIN, FOLSTEIN & McHUGH, 1975)

ORIENTAÇÃO

- Dia da semana.....
- Dia do mês.....
- Mês.....
- Ano.....
- Hora aproximada.....
- Local específico (apartamento ou setor).....
- Instituição (hospital, residência, clínica).....
- Bairro ou rua próxima.....
- Cidade.....
- Estado.....

MEMÓRIA IMEDIATA

- Vaso, carro, tijolo.....

ATENÇÃO E CÁLCULO

- 100 - 7 sucessivos.....

EVOCAÇÃO

- Recordar as 3 palavras.....

LINGUAGEM

- Nomear um relógio e uma caneta.....
- Repetir: “Nem aqui, nem ali, nem lá.”.....
- Comando: “Pegue este papel com sua mão direita, dobre ao meio e coloque no chão.”.....
- Ler e obedecer: “Feche os olhos.”.....
- Escrever uma frase.....
- Copiar um desenho.....

ESCORE_____ / 30

SOLETRAR

- Soletrar a palavra “mundo” de trás para a frente.....

ESCORE:_____ / 35

FECHE OS
OLHOS

Anexo D - Nome, data de exame, idade, sexo, MEEM, fluência verbal, memória de evocação de 5 minutos e anos de escolaridade dos controles

Nome	Data	Idade	Sexo	MEEM	FV	M5 min	anos de escolaridade
1-LMR	16/7/2004	70	F	30	19	10	11
2-NB	4/8/2004	73	F	27	24	10	12
3-JCS	17/9/2004	75	M	27	13	7	4
4-LBN	20/10/2004	70	F	29	19	10	14
5-JDFS	10/11/2004	72	M	29	21	8	15
6-SOP	3/12/2004	66	F	30	13	10	8
7-ACM	10/2/2004	69	F	28	15	9	6
8-GMB	21/1/2005	70	F	26	17	8	5
9-MAC	2/2/2005	72	M	29	17	8	7
10-IR	4/2/2005	79	M	27	15	7	7
11-MM	11/2/2005	72	F	27	20	10	5
12-MIMDP	9/3/2005	75	F	27	21	9	12
13-GAP	11/3/2005	72	F	28	14	9	7
14-NT	1/4/2005	76	M	25	19	6	4
15-MT	7/4/2005	76	M	28	18	7	17

NOTA: F=feminino, FV=fluência verbal, M=masculino, MEEM=Miniexame do Estado Mental e M5min=memória de evocação de 5 minutos.

Anexo E - Padrão de apresentação dos dados do processamento das ERM pelo programa MRUI

Experiment		Algorithm parameters	
Date	07/04/2005	Algorithm used	AMARES
Directory		Iterations	32
Current file		Points	2048/2048
Calc. time (ms)	5968	Signal/Quant.	
Sampling Int. (ms)	0.400	Truncated Points	0
Zero Order (deg)	-1.7 +/- 0.0	Asked/found	21 / 21
Begin Time (ms)	0.02 +/- 0.00	Noise St.D.	2.71E5

Name	Freq.(ppm)	Linew.(Hz)	Amplitude	sd. Amp.	Phase(deg)
1	0.985	30.00	1.62E6	1.41E6	0.0
2	1.313	30.00	9.16E5	2.59E6	0.0
3	1.577	17.36	2.11E6	1.02E6	0.0
4	2.023	5.85	2.63E6	1.44E5	0.0
5	2.114	11.75	6.43E5	8.22E5	0.0
6	2.245	15.00	2.01E6	1.34E6	0.0
7	2.356	4.24	8.88E4	2.00E5	0.0
8	2.447	20.00	1.93E6	5.44E5	0.0
9	2.690	5.45	2.51E5	1.07E5	0.0
10	2.861	4.77	9.52E4	6.51E4	0.0
11	3.033	5.85	1.76E6	5.28E4	0.0
12	3.235	5.85	1.27E6	5.27E4	0.0
13	3.366	3.22	2.47E5	8.56E4	0.0
14	3.457	8.83	5.42E5	2.51E5	0.0
15	3.567	5.85	1.34E6	1.10E5	0.0
16	3.706	10.00	1.39E6	2.18E5	0.0
17	3.800	5.79	5.16E5	1.52E5	0.0
18	3.894	5.59	8.12E5	1.11E5	0.0
19	3.972	5.85	1.18E6	3.54E4	0.0
20	4.325	20.00	4.18E5	1.74E5	0.0
21	4.145	9.45	2.07E5	1.26E5	0.0

Anexo F - Valores de metabólitos no cingulo dos pacientes

NOME	C-LM	C-Naa/Cr	C-ml/Cr	C-ml/Naa
1-JPS	4.22	1.8	0.68	0.38
2-JAN	4.73	1.48	0.84	0.57
3-MFS	4.35	1.59	0.81	0.51
4-OBM	4.32	1.68	1.07	0.64
5-IOC	5.65	1.66	0.67	0.41
6-CNZ	4.07	1.49	0.68	0.46
7-HL	5.83	1.64	0.9	0.55
8-MBG	4.33	1.64	0.84	0.51
9-LAF	4.09	1.51	0.98	0.65
10-JSP	4.49	1.78	0.84	0.47
11-LNC	4.78	1.7	0.81	0.48
12-RGO	4.13	1.84	0.82	0.45
13-IRC	4.69	1.55	0.75	0.49
14-JIL	4.8	1.69	0.97	0.58
15-HG	4.63	1.62	0.78	0.48
16-JP	4.61	1.46	0.88	0.6
17-MTRS	4.61	1.64	0.87	0.53
18-DG	4.03	1.68	0.48	0.29
19-RNF	6.31	1.59	0.92	0.58
20-HFC	4.17	1.55	0.82	0.53
21-JSC	4.85	1.62	0.81	0.5
22-LGS	4.22	1.74	0.69	0.4
23-MaT	4.16	1.68	0.84	0.5
24-CMDA	4.57	1.64	0.77	0.47
25-JG	3.97	1.66	0.82	0.5
26-NCP	4.59	1.66	0.79	0.48
27-LZ	4.63	1.54	0.79	0.52
28HCS	3.96	1.74	0.95	0.55
29-JR	4.57	1.56	0.81	0.52

NOTA: C-LM=largura média dos picos no cingulo, C-ml/Cr=relação ml/Cr no cingulo, C-ml/Naa=relação ml/Naa no cingulo e C-Naa/Cr=relação Naa/Cr no cingulo.

Anexo G - Valores de metabólitos no hipocampo direito dos pacientes

NOME	HD-LM	HD-Naa/Cr	HD-ml/Cr	HD-ml/Naa
1-JPS	6.97	1.59	1.21	0.76
2-JAN	0	0	0	0
3-MFS	6.22	1.49	1.29	0.86
4-OBM	6.22	1.2	1.12	0.94
5-IOC	0	0	0	0
6-CNZ	6.17	1.47	1.18	0.8
7-HL	7.51	1.29	1.21	0.94
8-MBG	5.9	1.3	1.17	0.9
9-LAF	5.54	1.39	1.3	0.94
10-JSP	7	1.16	1.14	0.98
11-LNC	6.4	1.52	1.02	0.67
12-RGO	5.17	1.23	1.06	0.86
13-IRC	6.59	1.52	0.9	0.59
14-JIL	6.1	1.14	1.11	0.98
15-HG	6.34	1.11	1.2	1.09
16-JP	0	0	0	0
17-MTRS	6.49	1.29	1.05	0.82
18-DG	0	0	0	0
19-RNF	5.96	0.95	1.07	1.12
20-HFC	6.45	1.47	1.33	0.9
21-JSC	6.84	1.38	1.02	0.74
22-LGS	0	0	0	0
23-MaT	7.62	1.23	1.19	0.97
24-CMDA	6.29	1.58	1.15	0.73
25-JG	8.17	1.56	1.29	0.82
26-NCP	0	0	0	0
27-LZ	6.75	1.3	1.19	0.91
28HCS	0	0	0	0
29-JR	4.85	1.29	1.05	0.82

NOTA: HD-LM=largura média dos picos no hipocampo direito, HD-ml/Cr=relação ml/Cr no hipocampo direito, HD-ml/Naa=relação ml/Naa no hipocampo direito e HD-Naa/Cr=relação Naa/Cr no hipocampo direito.

Anexo H - Valores de metabólitos no hipocampo esquerdo dos pacientes

NOME	HE-LM	HE-Naa/Cr	HE-ml/Cr	HE-ml/Naa
1-JPS	0	0	0	0
2-JAN	6.41	1.46	1.31	0.89
3-MFS	7.17	1.88	1.32	0.7
4-OBM	7.9	1.39	1.29	0.93
5-IOC	0	0	0	0
6-CNZ	5.99	1.44	1.09	0.76
7-HL	8.49	1.42	1.28	0.9
8-MBG	7.01	1.23	1.19	0.97
9-LAF	6.26	1.28	1.35	1.06
10-JSP	6.01	1.11	1.23	1.11
11-LNC	0	0	0	0
12-RGO	5.69	1.68	1.49	0.89
13-IRC	6.15	1.44	1.18	0.82
14-JIL	6.14	1.32	1.47	1.11
15-HG	5.66	1.06	1.28	1.21
16-JP	5.21	1.46	1.15	0.79
17-MTRS	7.44	1.56	1.16	0.74
18-DG	6.73	1.04	0.78	0.75
19-RNF	6.88	1.26	1.19	0.95
20-HFC	7.37	1.48	1.4	0.94
21-JSC	7.31	1.23	0.97	0.79
22-LGS	0	0	0	0
23-MaT	7.89	1.44	1.22	0.85
24-CMDA	5.78	1.67	1.14	0.68
25-JG	8.4	1.53	1.22	0.8
26-NCP	6.1	1.56	1.05	0.67
27-LZ	6.32	1.07	1.37	1.29
28HCS	7.24	1.63	1.19	0.73
29-JR	5.28	1.45	0.92	0.63

NOTA: HE-LM=largura média dos picos no hipocampo esquerdo, HE-ml/Cr=relação ml/Cr no hipocampo esquerdo, HE-ml/Naa=relação ml/Naa no hipocampo esquerdo e HE-Naa/Cr=relação Naa/Cr no hipocampo esquerdo.

Anexo I - Valores de metabólitos no cíngulo dos controles

NOME	C-LM	C-Naa/Cr	C-mI/Cr	C-mI/Naa
1-LMR	4.17	1.71	0.68	0.4
2-NB	5.33	1.71	0.84	0.49
3-JCS	4.04	1.78	0.86	0.48
4-LBN	4.4	1.83	0.8	0.44
5-JDFS	5.75	1.61	0.77	0.48
6-SOP	4.62	1.72	0.74	0.43
7-ACM	4.52	1.78	0.71	0.4
8-GMB	4.65	1.91	0.75	0.39
9-MAC	4.46	1.79	0.75	0.42
10-IR	4.16	1.82	0.75	0.41
11-MM	4.38	1.81	0.82	0.45
12-MID	4.46	1.7	0.75	0.44
13-GAP	4.33	1.91	0.85	0.44
14-NT	3.97	1.86	0.82	0.44
15-MoT	4.31	1.86	0.7	0.38

NOTA: C-LM=largura média dos picos no cíngulo, C-mI/Cr=relação mI/Cr no cíngulo, C-mI/Naa=relação mI/Naa no cíngulo e C-Naa/Cr=relação Naa/Cr no cíngulo.

Anexo J - Valores de metabólitos no hipocampo direito dos controles

NOME	HD-LM	HD-Naa/Cr	HD-ml/Cr	HD-ml/Naa
1-LMR	6.06	1.73	1.03	0.6
2-NB	7.13	1.55	1.25	0.81
3-JCS	5.75	1.22	1.03	0.85
4-LBN	6.57	1.48	1.14	0.77
5-JDFS	5.81	1.61	1.24	0.77
6-SOP	6.5	1.41	1.12	0.79
7-ACM	5.15	1.41	0.99	0.7
8-GMB	6.15	1.43	0.91	0.63
9-MAC	5.31	1.3	0.92	0.71
10-IR	6.93	1.6	1.2	0.75
11-MM	6.57	1.33	1.03	0.78
12-MID	0	0	0	0
13-GAP	5.47	1.84	1.26	0.69
14-NT	6.13	1.37	1.15	0.84
15-MoT	6.72	1.4	0.86	0.61

NOTA: HD-LM=largura média dos picos no hipocampo direito, HD-ml/Cr=relação ml/Cr no hipocampo direito, HD-ml/Naa=relação ml/Naa no hipocampo direito e HD-Naa/Cr=relação Naa/Cr no hipocampo direito.

Anexo K - Valores de metabólitos no hipocampo esquerdo dos controles

NOME	HE-LM	HE-Naa/Cr	HE-ml/Cr	HE-ml/Naa
1-LMR	5.63	1.98	0.9	0.45
2-NB	7.37	1.59	1.27	0.8
3-JCS	6.37	1.55	1.25	0.8
4-LBN	6.53	1.33	1.05	0.79
5-JDFS	6.47	1.5	0.96	0.64
6-SOP	5.9	1.47	1.04	0.71
7-ACM	5.93	0.49	1.02	0.69
8-GMB	6.1	1.46	0.9	0.62
9-MAC	5.38	1.43	0.88	0.61
10-IR	0	0	0	0
11-MM	0	0	0	0
12-MID	6.84	1.41	0.98	0.7
13-GAP	5.35	1.9	1.14	0.6
14-NT	5.46	1.64	1.05	0.64
15-MoT	5.68	1.59	1.03	0.65

NOTA: HE-LM=largura média dos picos no hipocampo esquerdo, HE-ml/Cr=relação ml/Cr no hipocampo esquerdo, HE-ml/Naa=relação ml/Naa no hipocampo esquerdo e HE-Naa/Cr=relação Naa/Cr no hipocampo esquerdo.

Anexo L - Níveis descritivos para os testes de Levine, Anderson-Darling e t-Student para pacientes x controles

Medida	Levene	Anderson-Darling	teste-t
C Naa/Cr	0,709	0,622	0,000
C ml/Cr	0,171	0,048	0,093
C ml/Naa	0,049	0,055	0,000
H Naa/Cr	0,767	0,065	0,072
H ml/Cr	0,886	0,723	0,000
H ml/Naa	0,029	0,335	0,000

NOTA: C Naa/Cr=medidas da relação Naa/Cr no cíngulo, C ml/Cr=medidas da relação ml/Cr no cíngulo, C ml/Naa=medidas da relação ml/Naa no cíngulo, H Naa/Cr= medidas da relação Naa/Cr nos hipocampos, H ml/Cr= medidas da relação ml/Cr nos hipocampos e H ml/Naa= medidas da relação ml/Naa nos hipocampos.

Anexo M - Níveis descritivos para os teste de Levine, Anderson-Darling e t-Student para pacientes do subgrupo com DA leve x controles

Medida	Levene	Anderson-Darling	teste-t
C Naa/Cr	0,508	0,923	0,000
C ml/Cr	0,159	0,158	0,292
C ml/Naa	0,058	0,064	0,002
H Naa/Cr	0,959	0,087	0,074
H ml/Cr	0,660	0,656	0,001
H ml/Naa	0,020	0,266	0,000

NOTA: C Naa/Cr=medidas da relação Naa/Cr no cíngulo, C ml/Cr=medidas da relação ml/Cr no cíngulo, C ml/Naa=medidas da relação ml/Naa no cíngulo, H Naa/Cr= medidas da relação Naa/Cr nos hipocampos, H ml/Cr= medidas da relação ml/Cr nos hipocampos e H ml/Naa= medidas da relação ml/Naa nos hipocampos.

Anexo N - Valores para sensibilidade e especificidade para a relação Naa/Cr do cingulo posterior

Positivo se menor que	Sensibilidade	1 - Especificidade
0,46	0,000	0,000
1,47	0,034	0,000
1,49	0,069	0,000
1,50	0,103	0,000
1,53	0,138	0,000
1,55	0,172	0,000
1,56	0,241	0,000
1,58	0,276	0,000
1,60	0,345	0,000
1,62	0,345	0,067
1,63	0,414	0,067
1,65	0,552	0,067
1,67	0,655	0,067
1,69	0,759	0,067
1,70	0,793	0,067
1,71	0,828	0,133
1,72	0,828	0,267
1,73	0,828	0,333
1,76	0,897	0,333
1,79	0,931	0,467
1,80	0,931	0,533
1,81	0,966	0,533
1,82	0,966	0,600
1,83	0,966	0,667
1,84	0,966	0,733
1,85	1,000	0,733
1,89	1,000	0,867
2,91	1,000	1,000

Anexo O - Valores para sensibilidade e especificidade para a relação Naa/Cr dos hipocampos

Positivo se menor que	Sensibilidade	1 - Especificidade
-0,51	0,000	0,000
0,72	0,000	0,037
1,00	0,021	0,037
1,05	0,043	0,037
1,07	0,064	0,037
1,09	0,085	0,037
1,13	0,128	0,037
1,15	0,149	0,037
1,18	0,170	0,037
1,21	0,191	0,037
1,23	0,191	0,074
1,25	0,277	0,074
1,27	0,298	0,074
1,29	0,319	0,074
1,30	0,383	0,074
1,31	0,426	0,111
1,33	0,447	0,111
1,35	0,447	0,185
1,38	0,447	0,222
1,39	0,468	0,222
1,40	0,511	0,222
1,41	0,511	0,259
1,42	0,511	0,370
1,43	0,532	0,370
1,44	0,532	0,444
1,45	0,596	0,444
1,46	0,617	0,444
1,47	0,660	0,481
1,48	0,702	0,519
1,49	0,723	0,556
1,50	0,745	0,556
1,51	0,745	0,593
1,53	0,787	0,593
1,54	0,809	0,593
1,56	0,809	0,667
1,57	0,872	0,667
1,59	0,894	0,667
1,60	0,915	0,741
1,61	0,915	0,778
1,62	0,915	0,815
1,64	0,936	0,815
1,66	0,936	0,852
1,68	0,957	0,852
1,71	0,979	0,852
1,79	0,979	0,889
1,86	0,979	0,926
1,89	1,000	0,926
1,94	1,000	0,963
2,98	1,000	1,000

Anexo P - Valores para sensibilidade e especificidade para a relação m/Cr do cingulo posterior

Positivo se maior que	Sensibilidade	1 - Especificidade
-0,52	1,000	1,000
0,58	0,966	1,000
0,68	0,931	1,000
0,69	0,862	0,933
0,70	0,828	0,933
0,71	0,828	0,867
0,73	0,828	0,800
0,75	0,828	0,733
0,76	0,793	0,467
0,78	0,759	0,400
0,79	0,724	0,400
0,80	0,655	0,400
0,81	0,655	0,333
0,82	0,517	0,333
0,83	0,414	0,200
0,85	0,276	0,133
0,86	0,276	0,067
0,87	0,276	0,000
0,88	0,241	0,000
0,89	0,207	0,000
0,91	0,172	0,000
0,94	0,138	0,000
0,96	0,103	0,000
0,98	0,069	0,000
1,03	0,034	0,000
2,07	0,000	0,000

Anexo Q - Valores para sensibilidade e especificidade para a relação ml/Cr dos hipocampos

Positivo se maior que	Sensibilidade	1 - Especificidade
-0,22	1,000	1,000
0,82	0,979	1,000
0,87	0,979	0,963
0,89	0,979	0,926
0,91	0,957	0,852
0,92	0,957	0,815
0,94	0,936	0,778
0,97	0,936	0,741
0,98	0,915	0,741
0,99	0,915	0,704
1,01	0,915	0,667
1,03	0,872	0,630
1,04	0,872	0,481
1,05	0,872	0,444
1,06	0,809	0,370
1,07	0,787	0,370
1,08	0,766	0,370
1,10	0,745	0,370
1,12	0,723	0,370
1,13	0,702	0,333
1,15	0,660	0,259
1,16	0,617	0,222
1,17	0,596	0,222
1,18	0,574	0,222
1,19	0,532	0,222
1,20	0,426	0,222
1,21	0,404	0,185
1,22	0,362	0,185
1,23	0,319	0,185
1,24	0,298	0,185
1,25	0,298	0,148
1,26	0,298	0,074
1,27	0,298	0,037
1,28	0,298	0,000
1,29	0,255	0,000
1,30	0,191	0,000
1,31	0,170	0,000
1,32	0,149	0,000
1,33	0,128	0,000
1,34	0,106	0,000
1,36	0,085	0,000
1,39	0,064	0,000
1,44	0,043	0,000
1,48	0,021	0,000
2,49	0,000	0,000

Anexo R - Valores para sensibilidade e especificidade para a relação ml/Naa do cingulo posterior

Positivo se maior que	Sensibilidade	1 - Especificidade
0,00	1,000	1,000
0,34	0,966	1,000
0,39	0,931	0,933
0,40	0,931	0,867
0,41	0,897	0,733
0,42	0,862	0,667
0,43	0,862	0,600
0,44	0,862	0,533
0,45	0,862	0,267
0,46	0,828	0,200
0,47	0,793	0,200
0,48	0,724	0,200
0,49	0,621	0,067
0,50	0,586	0,000
0,51	0,483	0,000
0,52	0,414	0,000
0,53	0,345	0,000
0,54	0,276	0,000
0,56	0,207	0,000
0,58	0,172	0,000
0,59	0,103	0,000
0,62	0,069	0,000
0,65	0,034	0,000
1,00	0,000	0,000

Anexo S - Valores para sensibilidade e especificidade para a relação ml/Naa dos hipocampus

Positivo se maior que	Sensibilidade	1 - Especificidade
-0,55	1,000	1,000
0,52	1,000	0,963
0,60	0,979	0,963
0,61	0,979	0,889
0,62	0,979	0,815
0,63	0,979	0,778
0,64	0,957	0,741
0,65	0,957	0,667
0,66	0,957	0,630
0,68	0,915	0,630
0,69	0,894	0,630
0,70	0,894	0,556
0,71	0,872	0,481
0,72	0,872	0,407
0,74	0,830	0,407
0,75	0,787	0,407
0,76	0,766	0,370
0,77	0,723	0,370
0,78	0,723	0,296
0,79	0,723	0,259
0,80	0,681	0,185
0,81	0,638	0,111
0,82	0,638	0,074
0,83	0,553	0,074
0,85	0,553	0,037
0,86	0,532	0,000
0,88	0,489	0,000
0,90	0,447	0,000
0,91	0,383	0,000
0,92	0,362	0,000
0,94	0,340	0,000
0,95	0,255	0,000
0,96	0,234	0,000
0,98	0,191	0,000
1,02	0,149	0,000
1,08	0,128	0,000
1,10	0,106	0,000
1,12	0,064	0,000
1,17	0,043	0,000
1,25	0,021	0,000
2,29	0,000	0,000

9 Referências

Adalsteinsson E, Sullivan EV, Kleinhans N, Spielman DM, Pfefferbaum A. Longitudinal decline of the neuronal marker N-acetyl aspartate in Alzheimer's disease. *Lancet*. 2000;355:1696-7.

Arnold DL, Matthews PM, Francis GS, O'Connor J, Antel JP. Proton magnetic resonance spectroscopic imaging for metabolic characterization of demyelinating plaques. *Ann Neurol*; 1992;31:235-41.

Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology*. 1992;42:631-9.

Atlas S. *Magnetic resonance imaging of the brain and spine*. 3rd. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2002. 1230p.

Ball MJ, Fisman M, Hachinski V, Blume W, Fox A, Kral VA, Kirshen AJ, Fox H, Merskey H. A new definition of Alzheimer's disease: a hippocampal dementia. *Lancet*. 1985;1:14-6.

Barker PB. N-acetyl aspartate--a neuronal marker? *Ann Neurol*. 2001;49:423-4.

Besson JA, Best PV, Skinner ER. Post-mortem proton magnetic resonance spectrometric measures of brain regions in patients with a pathological diagnosis of Alzheimer's disease and multi-infarct dementia. *Br J Psychiatry*. 1992;160:187-90.

Block W, Jessen F, Traber F, Flacke S, Manka C, Lamerichs R, Keller E, Heun R, Schild H. Regional N-acetylaspartate reduction in the hippocampus detected with fast proton magnetic resonance spectroscopic imaging in patients with Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2002a;59:828-34.

Block W, Traber F, Flacke S, Jessen F, Pohl C, Schild H. In-vivo proton MR-spectroscopy of the human brain: assessment of N-acetylaspartate (NAA) reduction as a marker for neurodegeneration. *Amino Acids*. 2002b;23:317-23.

Braak H, Braak E. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1991;82:239-59.

Braak H, Braak E, Bohl J. Staging of Alzheimer-related cortical destruction. *Eur Neurol*. 1993;33:403-8.

Brockmann K, Dechent P, Wilken B, Rusch O, Frahm J, Hanefeld F. Proton MRS profile of cerebral metabolic abnormalities in Krabbe disease. *Neurology*. 2003;60:819-25.

Brucki SMD. Curso clínico da Doença de Alzheimer. In: Forlenza OV, Caramelli P. *Neuropsiquiatria geriátrica*. São Paulo: Atheneu; 2000. p.119-58.

Brucki SMD, Nitrini R, Caramelli P, Bertolucci PHF, Okamoto IH. Sugestões para o uso do Mini-Exame do Estado Mental no Brasil. *Arq Neuropsiquiatr*. 2003;61:777-81.

Capizzano AA, Schuff N, Amend DL, Tanabe JL, Norman D, Maudsley AA, Jagust W, Chui HC, Fein G, Segal MR, Weiner MW. Subcortical ischemic vascular dementia: assessment with quantitative MR imaging and 1H MR spectroscopy. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2000;21:621-30.

Caramelli P. Neuropatologia da Doença de Alzheimer. In: Forlenza OV; Caramelli P. *Neuropsiquiatria geriátrica*. São Paulo: Atheneu; 2000. p.107-18.

Caramelli P, Carthery MT, Porto CS, Charchat-Fichman H, Bahia VS, Nitrini R. Teste de fluência verbal no diagnóstico da doença de Alzheimer leve: notas de corte em função da escolaridade. *Arq Neuropsiquiatr*. 2003;61:23.

Castillo M, Kwock L, Mukherji SK. Clinical applications of proton MR spectroscopy. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1996;17:1-15.

Catani M, Cherubini A, Howard R, Tarducci R, Pelliccioli GP, Piccirilli M, Gobbi G, Senin U, Mecocci P. (1)H-MR spectroscopy differentiates mild cognitive impairment from normal brain aging. *Neuroreport*. 2001;12:2315-7.

Catani M, Mecocci P, Tarducci R, Howard R, Pelliccioli GP, Mariani E, Metastasio A, Benedetti C, Senin U, Cherubini A. Proton magnetic resonance spectroscopy reveals similar white matter biochemical changes in patients with chronic hypertension and early Alzheimer's disease. *J Am Geriatr Soc*. 2002;50:1707-10.

Catani M, Piccirilli M, Cherubini A, Tarducci R, Sciarra T, Gobbi G, Pelliccioli G, Petrillo SM, Senin U, Mecocci P. Axonal injury within language network in primary progressive aphasia. *Ann Neurol*. 2003;53:242-7.

Chan S, Shungu DC, Douglas-Akinwande A, Lange DJ, Rowland LP. Motor neuron diseases: comparison of single-voxel proton MR spectroscopy of the motor cortex with MR imaging of the brain. *Radiology*. 1999;212:763-9.

Chantal S, Braun CM, Bouchard RW, Labelle M, Boulanger Y. Similar 1H magnetic resonance spectroscopic metabolic pattern in the medial temporal

lobes of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Brain Res.* 2004;1003:26-35.

Chantal S, Labelle M, Bouchard RW, Braun CM, Boulanger Y. Correlation of regional proton magnetic resonance spectroscopic metabolic changes with cognitive deficits in mild Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2002;59:955-62.

Christiansen P, Schlosser A, Henriksen O. Reduced N-acetylaspartate content in the frontal part of the brain in patients with probable Alzheimer's disease. *Magn Reson Imaging.* 1995;13:457-62.

Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ, Ashe KH. Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci.* 2005;8:79-84.

Colla M, Ende G, Bohrer M, Deuschle M, Kronenberg G, Henn F, Heuser I. MR spectroscopy in Alzheimer's disease: gender differences in probabilistic learning capacity. *Neurobiol Aging.* 2003;24:545-52.

Convit A, De Leon MJ, Tarshish C, De Santi S, Tsui W, Rusinek H, George A. Specific hippocampal volume reductions in individuals at risk for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 1997;18:131-8.

Danielsen ER, Ross B. *Magnetic resonance spectroscopy diagnosis of neurological diseases*. New York: Marcel Dekker; 1999. 327p.

De Graaf RA. *In Vivo NMR spectroscopy: Principles and Techniques*. In: John Wiley & Sons; 1998. p.272.

De Stefano N, Francis J, Antel D, Arnold D. Reversible decreases of N-acetylaspartate in the brain of patients with relapsing remitting multiple

sclerosis. *Proceedings of the 12th annual meeting of the Society for Magnetic Resonance in Medicine. Abstract*, 1993.

De Stefano N, Mathews D, Arnold D. Reversible decreases in N-acetylaspartate after acute brains injury. *Magn Reson Med*. 1995;34:721-7.

De Stefano N, Narayana PA, Francis GS. Evidence of axonal damage in the early stages of multiple sclerosis and its relevance to disability. *Arch Neurol*. 2001;58:65-70.

Delacourte A, David JP, Sergeant N, Buee L, Wattez A, Vermersch P, Ghazali F, Fallet-Bianco C, Pasquier F, Lebert F, Petit H, Di Menza C. The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology*. 1999;52:1158-65.

Dixon RM, Bradley KM, Budge MM, Styles P, Smith AD. Longitudinal quantitative proton magnetic resonance spectroscopy of the hippocampus in Alzheimer's disease. *Brain*. 2002;125:2332-41.

Doraiswamy PM, Chen JG, Charles HC. Brain magnetic resonance spectroscopy:role in assessing outcomes in Alzheimer's disease. *CNS Drugs*. 2000;14:457-72.

Ebly EM, Parhad IM, Hogan DB, Fung TS. Prevalence and types of dementia in the very old: results from the Canadian Study of Health and Aging. *Neurology*. 1994;44:1593-600.

Engelhardt E, Laks J, Rozenenthal M, Marinho VM. Tratamento farmacológico da Doença de Alzheimer. In: Forlenza OV, Caramelli P. *Neuropsiquiatria geriátrica*. São Paulo: Atheneu; 2000. p.151-76.

Engelhardt E, Moreira DM, Laks J, Marinho VM, Rozenthal M, Oliveira AC, Jr. Alzheimer's disease and magnetic resonance spectroscopy of the hippocampus. *Arq Neuropsiquiatr*. 2001;59:865-70.

Ernst T, Chang L, Melchor R, Mehringer CM. Frontotemporal dementia and early Alzheimer disease: differentiation with frontal lobe H-1 MR spectroscopy. *Radiology*. 1997;203:829-36.

Fazekas F, Chawluk JB, Alavi A, Hurtig HI, Zimmerman RA. MR signal abnormalities at 1.5 T in Alzheimer's dementia and normal aging. *AJR Am J Roentgenol*. 1987;149:351-6.

Folstein MF. Differential diagnosis of dementia. The clinical process. *Psychiatr Clin North Am*. 1997;20:45-57.

Foong J, Rozewicz L, Davie CA, Thompson AJ, Miller DH, Ron MA. Correlates of executive function in multiple sclerosis: the use of magnetic resonance spectroscopy as an index of focal pathology. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 1999;11:45-50.

Fox NC, Crum WR, Scahill RI, Stevens JM, Janssen JC, Rossor MN. Imaging of onset and progression of Alzheimer's disease with voxel-compression mapping of serial magnetic resonance images. *Lancet*. 2001;358:201-5.

Fox NC, Warrington EK, Freeborough PA, Hartikainen P, Kennedy AM, Stevens JM, Rossor MN. Presymptomatic hippocampal atrophy in Alzheimer's disease. A longitudinal MRI study. *Brain*. 1996;119(Pt 6):2001-7.

Frederick BB, Satlin A, Yurgelun-Todd DA, Renshaw PF. In vivo proton magnetic resonance spectroscopy of Alzheimer's disease in the parietal and temporal lobes. *Biol Psychiatry*. 1997;42:147-50.

Frederick BD, Lyoo IK, Satlin A, Ahn KH, Kim MJ, Yurgelun-Todd DA, Cohen BM, Renshaw PF. In vivo proton magnetic resonance spectroscopy of the temporal lobe in Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2004;28:1313-22.

Geissler A, Frund R, Scholmerich J, Feuerbach S, Zietz B. Alterations of cerebral metabolism in patients with diabetes mellitus studied by proton magnetic resonance spectroscopy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2003;111:421-7.

Graham SH, Meyerhoff DJ, Bayne L, Sharp FR, Weiner MW. Magnetic resonance spectroscopy of N-acetylaspartate in hypoxic-ischemic encephalopathy. *Ann Neurol*. 1994;35:490-4.

Groenendaal F, van der Grond J, van Haastert IC, Eken P, Mali WP, de Vries LS. [Findings in cerebral proton spin resonance spectroscopy in newborn infants with asphyxia, and psychomotor development]. *Ned Tijdschr Geneesk*. 1996;140:255-9.

Hammen T, Stadlbauer A, Tomandl B, Ganslandt O, Pauli E, Huk W, Neundorfer B, Stefan H. Short TE single-voxel (1)H-MR spectroscopy of hippocampal structures in healthy adults at 1.5 Tesla-how reproducible are the results? *NMR Biomed*. 2005;18:195-201.

Hartmann AP, Almeida SM, Livramento JA, Nitrini R, Takahashi D, Caramelli P. Hyperphosphorylated tau protein in the cerebrospinal fluid of patients with

Alzheimer's disease and other dementias: preliminary findings. *Arq Neuropsiquiatr.* 2004;62:751-5.

Hattori N, Abe K, Sakoda S, Sawada T. Proton MR spectroscopic study at 3 Tesla on glutamate/glutamine in Alzheimer's disease. *Neuroreport.* 2002;13:183-6.

Herminghaus S, Frolich L, Gorriz C, Pilatus U, Dierks T, Wittsack HJ, Lanfermann H, Maurer K, Zanella FE. Brain metabolism in Alzheimer disease and vascular dementia assessed by in vivo proton magnetic resonance spectroscopy. *Psychiatry Res.* 2003;123:183-90.

Herrera E, Jr., Caramelli P, Silveira AS, Nitrini R. Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2002;16:103-8.

Heun R, Schlegel S, Graf-Morgenstern M, Tintera J, Gawehn J, Stoeter P. Proton magnetic resonance spectroscopy in dementia of Alzheimer type. *Int J Geriatr Psychiatry.* 1997;12:349-58.

Hsu YY, Chen MC, Lim KE, Chang C. Reproducibility of hippocampal single-Voxel proton MR spectroscopy and chemical shift imaging. *AJR Am J Roentgenol.* 2001;176:529-36.

Huang W, Alexander GE, Chang L, Shetty HU, Krasuski JS, Rapoport SI, Schapiro MB. Brain metabolite concentration and dementia severity in Alzheimer's disease: a (1)H MRS study. *Neurology.* 2001;57:626-32.

Huang W, Alexander GE, Daly EM, Shetty HU, Krasuski JS, Rapoport SI, Schapiro MB. High brain myo-inositol levels in the predementia phase of

Alzheimer's disease in adults with Down's syndrome: a ¹H MRS study. *Am J Psychiatry*. 1999;156:1879-86.

Hyman BT, Damasio AR, Van Hoesen GW, Barnes CL. Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science*. 1984;225:1168-70.

Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR. Memory-related neural systems in Alzheimer's disease: an anatomic study. *Neurology*. 1990;40:1721-30.

Jack CR, Jr., Petersen RC, Xu YC, Waring SC, O'Brien PC, Tangalos EG, Smith GE, Ivnik RJ, Kokmen E. Medial temporal atrophy on MRI in normal aging and very mild Alzheimer's disease. *Neurology*. 1997;49:786-94.

Jessen F, Block W, Traber F, Keller E, Flacke S, Lamerichs R, Schild HH, Heun R. Decrease of N-acetylaspartate in the MTL correlates with cognitive decline of AD patients. *Neurology*. 2001;57:930-2.

Jessen F, Block W, Traber F, Keller E, Flacke S, Papassotiropoulos A, Lamerichs R, Heun R, Schild HH. Proton MR spectroscopy detects a relative decrease of N-acetylaspartate in the medial temporal lobe of patients with AD. *Neurology*. 2000;55:684-8.

Johnson KA, Jones K, Holman BL, Becker JA, Spiers PA, Satlin A, Albert MS. Preclinical prediction of Alzheimer's disease using SPECT. *Neurology*. 1998;50:1563-71.

Jorm AF, Jolley D. The incidence of dementia: a meta-analysis. *Neurology*. 1998;51:728-33.

Kalache A, Veras RP, Ramos LR. O envelhecimento da população mundial: um desafio novo. *Revista de Saúde Pública*. 1987;21:200-10.

Kantarci K, Jack CR, Jr. Neuroimaging in Alzheimer disease: an evidence-based review. *Neuroimaging Clin N Am*. 2003;13:197-209.

Kantarci K, Jack CR, Jr., Xu YC, Campeau NG, O'Brien PC, Smith GE, Ivnik RJ, Boeve BF, Kokmen E, Tangalos EG, Petersen RC. Regional metabolic patterns in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: A ¹H MRS study. *Neurology*. 2000;55:210-7.

Kantarci K, Reynolds G, Petersen RC, Boeve BF, Knopman DS, Edland SD, Smith GE, Ivnik RJ, Tangalos EG, Jack CR, Jr. Proton MR spectroscopy in mild cognitive impairment and Alzheimer disease: comparison of 1.5 and 3 T. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2003;24:843-9.

Kantarci K, Smith GE, Ivnik RJ, Petersen RC, Boeve BF, Knopman DS, Tangalos EG, Jack CR, Jr. ¹H magnetic resonance spectroscopy, cognitive function, and apolipoprotein E genotype in normal aging, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Int Neuropsychol Soc*. 2002a;8:934-42.

Kantarci K, Xu Y, Shiung MM, O'Brien PC, Cha RH, Smith GE, Ivnik RJ, Boeve BF, Edland SD, Kokmen E, Tangalos EG, Petersen RC, Jack CR, Jr. Comparative diagnostic utility of different MR modalities in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2002b;14:198-207.

Kattapong VJ, Brooks WM, Wesley MH, Kodituwakku PW, Rosenberg GA. Proton magnetic resonance spectroscopy of vascular- and Alzheimer-type dementia. *Arch Neurol*. 1996;53:678-80.

Klunk WE, Panchalingam K, Moosy J, McClure RJ, Pettegrew JW. N-acetyl-L-aspartate and other amino acid metabolites in Alzheimer's disease brain: a preliminary proton nuclear magnetic resonance study. *Neurology*. 1992;42:1578-85.

Klunk WE, Xu C, Panchalingam K, McClure RJ, Pettegrew JW. Quantitative ¹H and ³¹P MRS of PCA extracts of postmortem Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Aging*. 1996;17:349-57.

Kreis R, Farrow N, Ross BD. Localized ¹H NMR spectroscopy in patients with chronic hepatic encephalopathy. Analysis of changes in cerebral glutamine, choline and inositols. *NMR Biomed*. 1991;4:109-16.

Kreis R, Ross BD. Cerebral metabolic disturbances in patients with subacute and chronic diabetes mellitus: detection with proton MR spectroscopy. *Radiology*. 1992;184:123-30.

Kreis R, Ross BD, Farrow NA, Ackerman Z. Metabolic disorders of the brain in chronic hepatic encephalopathy detected with H-1 MR spectroscopy. *Radiology*. 1992;182:19-27.

Kreiss R, Ernst T, Ross BD. Absolute quantification of water and metabolites in the human brain. Part II: metabolite concentrations. *J Magn Reson*. 1993;102:9-19.

Kumari V, Mitterschiffthaler MT, Sharma T. Neuroimaging to predict preclinical Alzheimer's disease. *Hosp Med*. 2002;63:341-5.

Kwock L. Localized MR spectroscopy - basic principles. In: Castillo M. *Neuroimaging Clin N Am*. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1998. 8, p.713-31.

Kwo-On-Yuen PF, Newmark RD, Budinger TF, Kaye JA, Ball MJ, Jagust WJ. Brain N-acetyl-L-aspartic acid in Alzheimer's disease: a proton magnetic resonance spectroscopy study. *Brain Res.* 1994;667:167-74.

Laakso MP, Soininen H, Partanen K, Lehtovirta M, Hallikainen M, Hanninen T, Helkala EL, Vainio P, Riekkinen PJ, Sr. MRI of the hippocampus in Alzheimer's disease: sensitivity, specificity, and analysis of the incorrectly classified subjects. *Neurobiol Aging.* 1998;19:23-31.

Lazeyras F, Charles HC, Tupler LA, Erickson R, Boyko OB, Krishnan KR. Metabolic brain mapping in Alzheimer's disease using proton magnetic resonance spectroscopy. *Psychiatry Res.* 1998;82:95-106.

Lee ET, Wang JW. *Statistical Methods for Survival Data Analysis*. 3rd edition. New Jersey: John Wiley & Sons; 2003. 513p.

Lee JH, Arcinue E, Ross BD. Organic osmolytes in the brain of an infant with hipernatremia. *New England J. Med.* 1994;331:439-42.

MacKay S, Meyerhoff DJ, Constans JM, Norman D, Fein G, Weiner MW. Regional gray and white matter metabolite differences in subjects with AD, with subcortical ischemic vascular dementia, and elderly controls with 1H magnetic resonance spectroscopic imaging. *Arch Neurol.* 1996;53:167-74.

Marshall I, Wardlaw JM, Cannon J, Slattery J, Sellar RJ. Reproducibility of metabolite peak areas in 1H MRS of brain. *Magn Reson Imaging.* 1996;281-92.

Martinez-Bisbal MC, Arana E, Marti-Bonmati L, Molla E, Celda B. Cognitive impairment: classification by 1H magnetic resonance spectroscopy. *Eur J Neurol.* 2004;11:187-93.

McClure RJ. *Magnetic Resonance Spectroscopy and its Application to aging and Alzheimer's Disease*. 1995.

McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*. 1984;34:939-44.

Mesulam MM. Aging, Alzheimer's Disease and Dementia. In: *Principles of behavioral and cognitive neurology*. 2nd. New York: Oxford University Press; 2000. p.461-2.

Meunier M, Destradre C. Electrolytic but not ibotenic acid lesions of the posterior cingulate cortex produce transitory facilitation of learning in mice. *Behav Brain Res*. 1988;27:161-72.

Meyerhoff DJ, MacKay S, Constans JM, Norman D, Van Dyke C, Fein G, Weiner MW. Axonal injury and membrane alterations in Alzheimer's disease suggested by in vivo proton magnetic resonance spectroscopic imaging. *Ann Neurol*. 1993;36:40-7.

Miller BL. A review of chemical issues in ¹H NMR spectroscopy: N-acetyl-L-aspartate, creatine and choline. *NMR Biomed*. 1991;4:47-52.

Miller BL, Moats RA, Shonk T, Ernst T, Woolley S, Ross BD. Alzheimer disease: depiction of increased cerebral myo-inositol with proton MR spectroscopy. *Radiology*. 1993;187:433-7.

Minoshima S, Giordani B, Berent S, Frey KA, Foster NL, Kuhl DE. Metabolic reduction in the posterior cingulate cortex in very early Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1997;42:85-94.

Moats RA, Ernst T, Shonk TK, Ross BD. Abnormal cerebral metabolite concentrations in patients with probable Alzheimer disease. *Magn Reson Med*. 1994;32:110-5.

Mohanakrishnan P, Fowler AH, Vonsattel JP, Jolles PR, Husain MM, Liem P, Myers L, Komoroski RA. Regional metabolic alterations in Alzheimer's disease: an in vitro ¹H NMR study of the hippocampus and cerebellum. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1997;52:B111-7.

Nitrini R. Epidemiologia da Doença de Alzheimer no Brasil. *Revista de Psiquiatria Clínica*. 1999;26.

Nitrini R, Caramelli P, Herrera E, Jr., Bahia VS, Caixeta LF, Radanovic M, Anghinah R, Charchat-Fichman H, Porto CS, Carthery MT, Hartmann AP, Huang N, Smid J, Lima EP, Takada LT, Takahashi DY. Incidence of dementia in a community-dwelling Brazilian population. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2004a;18:241-6.

Nitrini R, Caramelli P, Herrera Junior E, Porto CS, Charchat-Fichman H, Carthery MT, Takada LT, Lima EP. Performance of illiterate and literate nondemented elderly subjects in two tests of long-term memory. *J Int Neuropsychol Soc*. 2004b;10:634-8.

Parnetti L, Tarducci R, Presciutti O, Lowenthal DT, Pippi M, Palumbo B, Gobbi G, Pelliccioli GP, Senin U. Proton magnetic resonance spectroscopy can differentiate Alzheimer's disease from normal aging. *Mech Ageing Dev*. 1997;97:9-14.

Petersen RC. Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *J Intern Med*. 2004;256:183-94.

Petrella JR, Coleman RE, Doraiswamy PM. Neuroimaging and early diagnosis of Alzheimer disease: a look to the future. *Radiology*. 2003;226:315-36.

Pfefferbaum A, Adalsteinsson E, Spielman D, Sullivan EV, Lim KO. In vivo brain concentrations of N-acetyl compounds, creatine, and choline in Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry*. 1999a;56:185-92.

Pfefferbaum A, Adalsteinsson E, Spielman D, Sullivan EV, Lim KO. In vivo spectroscopic quantification of the N-acetyl moiety, creatine, and choline from large volumes of brain gray and white matter: effects of normal aging. *Magn Reson Med*. 1999b;41:276-84.

Pioro EP, Antel JP, Cashman NR, Arnold DL. Detection of cortical neuron loss in motor neuron disease by proton magnetic resonance spectroscopic imaging in vivo. *Neurology*. 1994;44:1933-8.

Rajanayagam V, Balthazor M, Shapiro EG, Krivit W, Lockman L, Stillman AE. Proton MR spectroscopy and neuropsychological testing in adrenoleukodystrophy. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1997;18:1909-14.

Reiman EM, Caselli RJ, Yun LS, Chen K, Bandy D, Minoshima S, Thibodeau SN, Osborne D. Preclinical evidence of Alzheimer's disease in persons homozygous for the epsilon 4 allele for apolipoprotein E. *N Engl J Med*. 1996;334:752-8.

Reiman EM, Uecker A, Caselli RJ, Lewis S, Bandy D, de Leon MJ, De Santi S, Convit A, Osborne D, Weaver A, Thibodeau SN. Hippocampal volumes in cognitively normal persons at genetic risk for Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1998;44:288-91.

Rempp KA, Brix G, Wenz F, Becker CR, Guckel F, Lorenz WJ. Quantification of regional cerebral blood flow and volume with dynamic susceptibility contrast-enhanced MR imaging. *Radiology*. 1994;193:637-41.

Rodriguez G, Vitali P, Calvini P, Bordoni C, Girtler N, Taddei G, Mariani G, Nobili F. Hippocampal perfusion in mild Alzheimer's disease. *Psychiatry Res*. 2000;100:65-74.

Rogawski MA. What is the rationale for new treatment strategies in Alzheimer's disease? *CNS Spectr*. 2004;9:6-12.

Rose SE, de Zubicaray GI, Wang D, Galloway GJ, Chalk JB, Eagle SC, Semple J, Doddrell DM. A ¹H MRS study of probable Alzheimer's disease and normal aging: implications for longitudinal monitoring of dementia progression. *Magn Reson Imaging*. 1999;17:291-9.

Rosen BR, Belliveau JW, Chien D. Perfusion imaging by nuclear magnetic resonance. *Magn Reson Q*. 1989;5:263-81.

Ross BD, Bluml S, Cowan R, Danielsen E, Farrow N, Gruetter R. In vivo magnetic resonance spectroscopy of human brain: the biophysical basis of dementia. *Biophys Chem*. 1997;68:161-72.

Ross BD, Bluml S, Cowan R, Danielsen E, Farrow N, Tan J. In vivo MR spectroscopy of human dementia. *Neuroimaging Clin N Am*. 1998;8:809-22.

Ross BD, Jacobson S, Villamil F, Korula J, Kreis R, Ernst T, Shonk T, Moats RA. Subclinical hepatic encephalopathy: proton MR spectroscopic abnormalities. *Radiology*. 1994;193:457-63.

Salibi N, Brown MA. *Clinical MR Spectroscopy: first principles*. New York: Wiley-Liss; 1998. 220p.

Scheltens P, Leys D, Barkhof F, Huglo D, Weinstein HC, Vermersch P, Kuiper M, Steinling M, Wolters EC, Valk J. Atrophy of medial temporal lobes on MRI in "probable" Alzheimer's disease and normal ageing: diagnostic value and neuropsychological correlates. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1992;55:967-72.

Schmidt R, Fazekas F, Kleinert G, Offenbacher H, Gindl K, Payer F, Freidl W, Niederkorn K, Lechner H. Magnetic resonance imaging signal hyperintensities in the deep and subcortical white matter. A comparative study between stroke patients and normal volunteers. *Arch Neurol*. 1992;49:825-7.

Schuff N, Amend D, Ezekiel F, Steinman SK, Tanabe J, Norman D, Jagust W, Kramer JH, Mastrianni JA, Fein G, Weiner MW. Changes of hippocampal N-acetyl aspartate and volume in Alzheimer's disease. A proton MR spectroscopic imaging and MRI study. *Neurology*. 1997;49:1513-21.

Schuff N, Amend DL, Meyerhoff DJ, Tanabe JL, Norman D, Fein G, Weiner MW. Alzheimer disease: quantitative H-1 MR spectroscopic imaging of frontoparietal brain. *Radiology*. 1998;207:91-102.

Schuff N, Capizzano AA, Du AT, Amend DL, O'Neill J, Norman D, Kramer J, Jagust W, Miller B, Wolkowitz OM, Yaffe K, Weiner MW. Selective reduction of N-acetylaspartate in medial temporal and parietal lobes in AD. *Neurology*. 2002;58:928-35.

Shiino A, Matsuda M, Morikawa S, Inubushi T, Akiguchi I, Handa J. Proton magnetic resonance spectroscopy with dementia. *Surg Neurol*. 1993;39:143-7.

Shonk T, Ross BD. Role of increased cerebral myo-inositol in the dementia of Down syndrome. *Magn Reson Med*. 1995;33:858-61.

Shonk TK, Moats RA, Gifford P, Michaelis T, Mandigo JC, Izumi J, Ross BD. Probable Alzheimer disease: diagnosis with proton MR spectroscopy. *Radiology*. 1995;195:65-72.

Simmons ML, Frondoza CG, Coyle JT. Immunocytochemical localization of N-acetyl-aspartate with monoclonal antibodies. *Neuroscience*. 1991;45:37-45.

Sutherland RJ, Whishaw IQ, Kolb B. Contributions of cingulate cortex to two forms of spatial learning and memory. *J Neurosci*; 1988;8:1863-72.

Tedeschi G, Bertolino A, Campbell G, Barnett AS, Duyn JH, Jacob PK, Moonen CT, Alger JR, Di Chiro G. Reproducibility of proton MR spectroscopic imaging findings. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1996a;17:1871-9.

Tedeschi G, Bertolino A, Lundbom N, Bonavita S, Patronas NJ, Duyn JH, Metman LV, Chase TN, Di Chiro G. Cortical and subcortical chemical pathology in Alzheimer's disease as assessed by multislice proton magnetic resonance spectroscopic imaging. *Neurology*. 1996b;47:696-704.

Terry RD. Dementia. A brief and selective review. *Arch Neurol*. 1976;33:1-4.

Terry RD. Where in the brain does Alzheimer's disease begin? *Ann Neurol*. 2000;47:421.

Terry RD. An honorable compromise regarding amyloid in Alzheimer disease. *Ann Neurol.* 2001;49:684.

Urenjak J, Williams SR, Gadian DG, Noble M. Specific expression of N-acetylaspartate in neurons, oligodendrocyte-type-2 astrocyte progenitors, and immature oligodendrocytes in vitro. *J Neurochem.* 1992;59:55-61.

Valenstein E, Bowers D, Verfaellie M, Heilman KM, Day A, Watson RT. Retrosplenial amnesia. *Brain.* 1987;110(Pt 6):1631-46.

Valenzuela MJ, Sachdev P. Magnetic resonance spectroscopy in AD. *Neurology.* 2001;56:592-8.

Vallada Filho HP. Aspectos genéticos da doença de Alzheimer. In: Forlenza OV, Caramelli P. *Neuropsiquiatria geriátrica*. São Paulo: Atheneu; 2000. p.459-65.

Videen JS, Michaelis T, Pinto P, Ross BD. Human cerebral osmolytes during chronic hyponatremia. A proton magnetic resonance spectroscopy study. *J Clin Invest.* 1995;95:788-93.

Vion-Dury J, Nicoli F, Salvan A, Confort-Gouny S, Dhiver C, Cozzzone P. Reversal of brain metabolic alteration with zidovudine detected by proton localised magnetic resonance spectroscopy. *Lancet.* 1995;345:60-1.

Visser PJ, Verhey FR, Hofman PA, Scheltens P, Jolles J. Medial temporal lobe atrophy predicts Alzheimer's disease in patients with minor cognitive impairment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2002;72:491-7.

Vogt BA, Finch DM, Olson CR. Functional heterogeneity in cingulate cortex: the anterior executive and posterior evaluative regions. *Cereb Cortex*. 1992;2:435-43.

Waldman AD, Rai GS. The relationship between cognitive impairment and in vivo metabolite ratios in patients with clinical Alzheimer's disease and vascular dementia: a proton magnetic resonance spectroscopy study. *Neuroradiology*. 2003;45:507-12.

Wardlaw JM, Marshall I, Wild J, Dennis MS, Cannon J, Lewis SC. 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*. 1998;29:1618-24.

Watanabe T, Akiguchi I, Yagi H, Onishi K, Kawasaki T, Shiino A, Inubushi T. Proton magnetic resonance spectroscopy and white matter hyperintensities on magnetic resonance imaging in patients with Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;977:423-9.

Weiss U, Bacher R, Vonbank H, Kemmler G, Lingg A, Marksteiner J. Cognitive impairment: assessment with brain magnetic resonance imaging and proton magnetic resonance spectroscopy. *J Clin Psychiatry*. 2003;64:235-42.

Yukie M. Neural connections of auditory association cortex with the posterior cingulate cortex in the monkey. *Neurosci Res*. 1995;22:179-87.