

Quantificação Automática de Sinais de MRS do Cérebro in-vivo para a Classificação de Tumores

Sandra Patricia Cuellar Baena

Orientadora: Profa. Dra. Gabriela Castellano

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Mestrado defendida pela aluna Sandra Patricia Cuellar Baena e aprovada pela Comissão Julgadora

Campinas, 02 de Dezembro 2008



Profa. Dra. Gabriela Castellano

Departamento de Raios Cósmicos e Cronologia
Grupo de Pesquisa em Neurofísica

Campinas

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO IFGW - UNICAMP**

C894q Cuelar Baena, Sandra Patricia
Quantificação de sinais de MRS do cérebro in-vivo
para classificação de tumores / Sandra Patrícia Cuellar
Baena. -- Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientador: Gabriela Castellano.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Física "Gleb Wataghin".

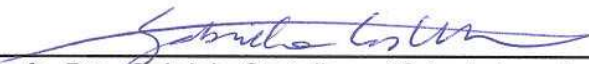
1. Espectroscopia de ressonancia magnetica nuclear.
2. Metabonomica. 3. Tumores intracranianos.
4. Tumores - Classificação. I. Castellano, Gabriela
II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Física "Gleb Wataghin". III. Título.

- **Título em inglês:** Automatic in-vivo MRS signal quantification for the classification of brain tumors
- **Palavras-chave em inglês (Keywords):**
 - 1. Nuclear magnetic resonance spectroscopy
 - 2. Metabonomics
 - 3. Intracranial tumors
 - 4. Tumors - Classification
- **Área de concentração:** Física
- **Titulação:** Mestre em física
- **Banca examinadora:**
 - Profa. Gabriela Castellano
 - Prof. Roberto Covolan
 - Profa. Ana Carolina Zeri
- **Data da defesa:** 10.07.2008

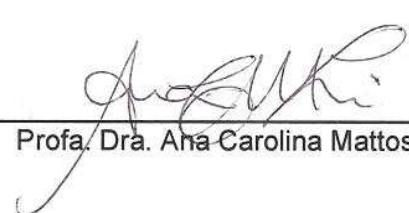


MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE MESTRADO DE **SANDRA PATRICIA CUELLAR BAENA – RA 049324** APRESENTADA E APROVADA AO INSTITUTO DE FÍSICA “GLEB WATAGHIN”, DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, EM 10 / 07 / 2008.

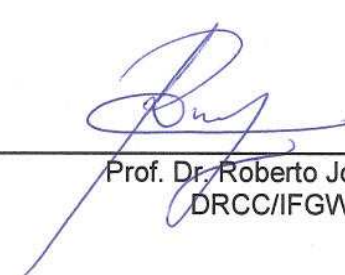
COMISSÃO JULGADORA:



Profa. Dra. Gabriela Castellano (Orientadora da Candidata)
DRCC/IFGW/UNICAMP



Profa. Dra. Ana Carolina Mattos Zeri - LNLS



Prof. Dr. Roberto José Maria Covolan
DRCC/IFGW/UNICAMP

A mis padres Dario y Lilia, les agradezco el ejemplo, la perseverancia, lucha e integridad. A Víctor agradezco la calidez, la motivación constante y la ayuda incondicional. Soy grata por el referencial de vida que recibo de ustedes.

Agradecimentos

À minha orientadora Profa. Dra. Gabriela Castellano, pelo apoio, a iniciativa e pelos ensinamentos neste processo de formação.

Ao Prof. Dr. Roberto Covolan, docente do IFGW e ao Prof. Dr. Li Li Min, docente da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP pelo apoio ao projeto, pela orientação e discussões nos seminários do Laboratório de Neuroimagem e do Grupo de Neurofísica.

À Profa. Dra. Andréia Vasconcellos, docente da Faculdade de Ciências Médicas pela contribuição com discussões e revisão da parte médica da tese.

Aos professores que contribuíram na formação acadêmica através dos cursos de pós-graduação no IFGW.

Ao Prof. Dr. Bernardo Celda-Muñoz e ao Prof. Dr. Daniel Monleon, orientadores do projeto de pesquisa em tumores pediátricos in-vivo e ex-vivo, pela acolhida no seu grupo de pesquisa na Faculdade de Medicina da Universidade de Valência; pela disposição e ensinamentos dados durante o estágio de pesquisa.

Ao José Manuel Morales, técnico do Laboratório de Imagem Molecular e Metabolômica da Universidade de Valência, pelos ensinamentos sobre o manejo do espectrômetro de alta resolução na aquisição de dados ex-vivo, e a preparação e manipulação de amostra biológicas.

Ao Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico (CNPq) e ao Programa de Mobilidade Internacional do Banco Santander- Banespa pelo apoio financeiro.

Resumo

Título: Quantificação automática de sinais de MRS do cérebro in-vivo para a classificação de tumores¹.

Palavras Chaves: classificação de tumores cerebrais, espectroscopia de ressonância magnética nuclear, quantificação automática de metabólitos, AMARES.

Resumo Este trabalho visou o estudo e validação de técnicas de pré-processamento e quantificação de dados provenientes da técnica de Espectroscopia por Ressonância Magnética (MRS, do inglês Magnetic Resonance Spectroscopy), obtidos do cérebro humano in vivo, para a extração de informação que fosse clinicamente relevante para o estudo e diagnóstico de tumores cerebrais. Para isso, foi feito o estudo da técnica com base na literatura, incluindo a revisão dos aspectos físicos envolvidos, estudando os métodos computacionais utilizados para o pré-processamento e quantificação dos dados, e os aspectos bioquímicos dos metabólitos de interesse presentes no cérebro humano, passíveis de serem quantificados através da técnica. Especificamente, foi estudado um método de quantificação de dados de MRS, o método AMARES (Advanced Method for Accurate, Robust and Efficient Spectral fitting of MRS data), aplicado na quantificação de dados de MRS adquiridos de sujeitos controles e pacientes portadores de tumores cerebrais, provenientes de uma base de dados do Laboratório de Neuroimagem (LNI - Hospital das Clínicas - UNICAMP). Isso foi feito utilizando o software de domínio público jMRUI (<http://sermn02.uab.es/mrui/>)[1], que possui o método AMA-

¹Tese de mestrado

RES já implementado. Estes resultados foram comparados com resultados provenientes de uma quantificação manual desses mesmos dados, realizada previamente como parte do projeto de doutorado da Dra. Andréia Vasconcellos (atual docente do Depto. de Radiologia da FCM/UNICAMP)[2]. Foi verificada a concordância entre os dois métodos de quantificação, e também a viabilidade de usar os resultados da quantificação com o método automático para, além de diferenciar entre os grupos de pacientes e controles, realizar a separação dos pacientes com tumores em diferentes grupos. Obteve-se que os resultados obtidos com o método automático foram mais precisos e consistentes que os obtidos com o método manual, e permitiram uma melhor classificação dos tipos de tumores. Adicionalmente, foram incluídos neste trabalho os resultados do estudo de perfis metabólicos ex vivo em tumores cerebrais pediátricos através da técnica HR-MAS (do inglês High Resolution Magic Angle Spinning). Este estudo adicional foi realizado no Laboratório de Imagem Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Valência (Espanha) através do Programa Santander de Mobilidade Internacional e financiado através de uma bolsa do Banco Santander-Banespa.

Abstract

Title: Automatic in-vivo MRS signal quantification for the classification of brain tumors ¹.

Key Words: Human brain tumors classification, Magnetic resonance spectroscopy, Automatic quantification of metabolites, AMARES.

Abstract The aim of this work was to study and validate techniques for pre-processing and quantifying Magnetic Resonance Spectroscopy data, obtained in vivo from the human brain, in order to get information clinically useful for the study and diagnosis of brain tumors. Therefore, a literature-based study of the technique was made, including a review of the Physics concepts involved, the data acquisition process in the scanner and the computational methods used to pre-process and quantificate the spectral data, as well as the biochemical aspects of the metabolites of interest in the human brain that can be detected by this technique. Special attention was given to the AMARES (Advanced Method for Accurate, Robust and Efficient Spectral fitting of MRS data) method for MRS data quantification, which was studied and applied to the quantification of data from control subjects and patients with brain tumors. The data came from a database of the Neuroimaging Laboratory (LNI - Hospital das Clínicas - UNICAMP). The quantification with AMARES was made through the jMRUI software (<http://sermn02.uab.es/mrui/>) [1], a public domain software for processing and quantification of MRS data. These results were compared to the results obtained with a manual quantification of the same data, previously done as part of the PhD thesis work of

¹Master thesis project.

Dr. Andréia Vasconcellos (lecturer from the Radiology Department of the School of Medicine, UNICAMP) [2]. The agreement between the results from both quantification methods was verified, as well as the feasibility of using the automatic quantification results to differentiate among tumor types, besides differentiating between patients and controls. Results obtained by the automatic method were more accurate and consistent than those obtained by the manual method allowing a better classification. Additionally, in this work were included the results of the study of ex vivo and in vivo metabolic profiling in pediatric brain tumors using the HR-MAS (High Resolution Magic Angle Spinning) technique. This study was carried out in the Molecular Imaging Laboratory, School of Medicine at the University of Valência (Spain), within the Santander-Banespa Bank International Exchange Program.

Abreviações

<i>MRS</i>	:	<i>Magnetic Resonance Spectroscopy</i>
<i>MRI</i>	:	<i>Magnetic Resonance Imaging</i>
<i>SVS</i>	:	<i>Single Voxel Spectroscopy</i>
<i>CSI</i>	:	<i>Chemical Shift Imaging</i>
<i>PRESS</i>	:	<i>Point Resolved Echo Spectroscopic Sequence</i>
<i>STEAM</i>	:	<i>Stimulated Echo Acquisition Mode</i>
<i>CHES</i>	:	<i>Chemical Shift Selective pulse</i>
<i>TE</i>	:	<i>Tempo ao Eco</i>
<i>TR</i>	:	<i>Tempo de repetição</i>
<i>RF</i>	:	<i>Pulso de radiofrequência</i>
<i>VOI</i>	:	<i>Volume of interest</i>
<i>SNR</i>	:	<i>Signal to noise ratio</i>
<i>NAA</i>	:	<i>N-Acetylaspartato</i>
<i>Cho</i>	:	<i>Colina</i>
<i>Cre</i>	:	<i>Creatina</i>
<i>mIno</i>	:	<i>Myo-inositol</i>
<i>Glu</i>	:	<i>Glutamato</i>
<i>Gln</i>	:	<i>Glutamina</i>
<i>Glx</i>	:	<i>Grupo Glutamato-Glutamina</i>
<i>Lac</i>	:	<i>Lactato</i>
<i>Lip</i>	:	<i>Lipídeos</i>
<i>FID</i>	:	<i>Free induction decay</i>
<i>HR – MAS</i>	:	<i>High Resolution Magic Angle Spinning Spectroscopy</i>
<i>LDA</i>	:	<i>Linear Discriminant Analysis</i>
<i>ANOVA</i>	:	<i>Analysis of Variance</i>

Índice Geral

1	Introdução	1
2	Referencial Teórico	3
2.1	Conceitos Básicos	3
2.1.1	Núcleos de interesse nos estudos clínicos com MRS	3
2.1.2	Frequência de Larmor	4
2.1.3	Deslocamento Químico	6
2.1.4	Acoplamento-J	8
2.2	Princípios físicos da geração do sinal de MRS	9
2.2.1	Magnetização de uma amostra macroscópica	9
2.2.2	Processo de Excitação	12
2.2.3	Processo de Relaxação	13
2.3	Aspectos técnicos na aquisição de dados de MRS	14
2.3.1	Seqüências de Pulso de Radiofrequência	15

2.3.2	Razão Sinal-Ruído (SNR)	18
2.3.3	Shimming	19
2.3.4	Eddy Currents (Correntes parasitárias)	20
2.3.5	Sinais indesejáveis na MRS	21
2.4	Descrição e espectros dos metabólitos do cérebro humano	22
2.4.1	Colina (Cho)	22
2.4.2	Creatina (Cre)	23
2.4.3	Lactato (Lac)	24
2.4.4	Glutamato (Glu), Glutamina (Gln) e o Grupo Glx	25
2.4.5	N-Acetilaspato (NAA)	26
2.4.6	Myo-inositol (mIno)	27
2.5	Perspectivas futuras da técnica MRS in-vivo	28
3	Métodos de processamento e quantificação de metabólitos	33
3.1	Análise no domínio da frequência	33
3.2	Análise no domínio temporal	36
3.3	LCModel	37
3.4	Método AMARES para quantificação	38
4	Métodos e Aspectos Éticos da Pesquisa	43

4.1	Aspectos Éticos da pesquisa envolvendo seres humanos	43
4.1.1	Sujeitos	44
4.2	Parâmetros da ^1H -MRS	45
4.3	Pós-processamento e quantificação dos sinais de metabólitos	46
4.3.1	Pós-processamento	46
4.3.2	Quantificação	50
4.4	Análise Estatística	52
4.4.1	Análise Discriminatório Linear (LDA)	52
4.4.2	Análise de Variância de única variável (ANOVA)	55
5	Resultados e Discussão	57
5.1	Grupo de Pacientes incluídos no estudo classificatório	57
5.1.1	Grupo I: Tumores Neurogliais de Alto Grau	57
5.1.2	Grupop III: Tumores não Neurogliais	60
5.1.3	Grupo IV: Astrocitoma Pilocítico	62
5.1.4	Grupo Controle (Grupo VI)	63
5.2	Classificação dos Grupos Tumoriais	63
5.2.1	Concentrações dos metabólitos por grupo	63
5.2.2	Teste ANOVA	66

5.3 Tumores não incluídos no estudo classificatório	69
5.3.1 Astrocitoma de baixo grau	69
5.3.2 Metástase	70
5.3.3 Linfoma de Hodgkin Clássico	70
5.3.4 Ependimoma anaplásico	71
5.3.5 Ganglioglioma	72
5.3.6 Linfoma não Hodgkin	73
5.3.7 Cisto Epidérmico	74
5.3.8 Adenoma	75
5.3.9 Meduloblastoma	76
5.3.10 Limitações da técnica de MRS in-vivo	77
6 Conclusões	79
A Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP- UNICAMP)	83
B Artigo submetido para o <i>Journal of Computers in Biology and Medicine</i>	87
C Artigo para ser submetido ao <i>Magnetic Resonance in Medicine</i>	89
Referências	91

Índice de Figuras

2.1	<i>Momento magnético do átomo de hidrogênio no B_0.</i>	5
2.2	<i>Espectro MR do metanol (CH_3OH).</i>	8
2.3	<i>Exemplo de núcleos homonucleares interagindo via acoplamento-J.</i>	9
2.4	<i>Vetor magnetização de uma amostra macroscópica.</i>	10
2.5	<i>População de spins alinhados paralela ou antiparalelamente ao B_0.</i>	10
2.6	<i>Pulso de radiofrequência para excitar o vetor de magnetização M_0.</i>	12
2.7	<i>Variação das componentes transversais da magnetização.</i>	14
2.8	<i>Sinal FID gerado em um experimento de MRS e transformada de Fourier.</i>	14
2.9	<i>Técnicas de localização Chemical Shift Imaging e Single-Voxel.</i>	16
2.10	<i>Diagrama de tempo para uma sequência de pulsos PRESS.</i>	16
2.11	<i>Volume de interesse (VOI).</i>	17
2.12	<i>Diagrama de tempo para uma sequência de pulsos STEAM.</i>	17
2.13	<i>Espectros PRESS e STEAM para uma solução phantom.</i>	18

2.14	<i>Efeitos da variação no tamanho do VOI sobre o sinal e o ruído.</i>	19
2.15	<i>Exemplos de espectros com bom (esquerda) e ruim (direita) shimming.</i>	20
2.16	<i>Corrientes parasitárias ou Eddy-Currents.</i>	21
2.17	<i>Espectro in-vitro da Colina e sua fórmula química.</i>	23
2.18	<i>Espectro in-vitro da Creatina e sua fórmula química.</i>	24
2.19	<i>Espectro in-vitro do Lactato e sua fórmula química.</i>	25
2.20	<i>Espectro in-vitro do Glutamato e sua fórmula química.</i>	26
2.21	<i>Espectro in-vitro do N-Acetilaspártato e sua fórmula química.</i>	27
2.22	<i>Espectro in-vitro do Myo-inositol e sua fórmula química.</i>	28
3.1	<i>Exemplo de quantificação através do LCModel.</i>	38
4.1	<i>Exemplo das aquisições de um indivíduo com 200 nex</i>	46
4.2	<i>Agrupação das aquisições com 200 nex.</i>	47
4.3	<i>Espectro obtido após ao alinhamento e soma.</i>	48
4.4	<i>Espectro de referência da água.</i>	48
4.5	<i>Espectro da água e metabólitos de interesse.</i>	49
4.6	<i>Filtragem do sinal residual da água do espectro de MRS.</i>	49
4.7	<i>Quantificação de metabólitos através do AMARES.</i>	51

5.1	<i>Espectro ^1H-MRS de um tumor neuroglial de alto grau.</i>	58
5.2	<i>Espectro ^1H-MRS de um tumor não neuroglial.</i>	61
5.3	<i>Espectro ^1H-MRS de um tumor astrocitoma pilocítico.</i>	62
5.4	<i>Espectro ^1H-MRS de um indivíduo controle.</i>	63
5.5	<i>Distribuição discriminatória dos grupos tumorais.</i>	66
5.6	<i>Teste ANOVA para o método AMARES.</i>	67
5.7	<i>Teste ANOVA para o método manual.</i>	68
5.8	<i>Espectro ^1H-MRS de um astrocitoma de baixo grau.</i>	69
5.9	<i>Espectro ^1H-MRS de metástase.</i>	70
5.10	<i>Espectro ^1H-MRS de Linfoma Hodgkin Clássico.</i>	71
5.11	<i>Espectro ^1H-MRS de Ependimoma anaplásico.</i>	72
5.12	<i>Espectro ^1H-MRS de Ganglioglioma.</i>	73
5.13	<i>Espectro ^1H-MRS de Linfoma não Hodgkin.</i>	74
5.14	<i>Espectro ^1H-MRS de Cisto Epidérmico.</i>	75
5.15	<i>Espectro ^1H-MRS de um Adenoma.</i>	76
5.16	<i>Espectro ^1H-MRS de um Meduloblastoma.</i>	77

Índice de Tabelas

2.1	<i>Núcleos usados na Espectroscopia de MRS in-vivo</i>	4
2.2	<i>Metabólitos detectáveis com MRS in vivo</i>	31
4.1	<i>Grupos tumorais quanto e grupo controle que foi estudado.</i>	45
4.2	<i>Frequências de cada metabólito quantificado através do AMARES.</i>	51
5.1	<i>Concentrações dos metabólitos quantificados no AMARES.</i>	64
5.2	<i>Concentrações dos metabólitos quantificados no método manual.</i>	64
5.3	<i>Porcentagens de classificação correta entre tumores.</i>	65
5.4	<i>Porcentagens de classificação correta (tumores e controles).</i>	65

Introdução

A Espectroscopia de Ressonância Magnética (1H-MRS) é uma técnica revolucionária e promissora para obter informação do conteúdo bioquímico dos tecidos tanto em condições normais quanto patológicas[3]. No cérebro, onde a 1H-MRS é aplicada freqüentemente, ela serve como complemento à informação proporcionada pelas imagens de ressonância magnética (MRI, do inglês, Magnetic Resonance Image)[4, 5]. A quantificação dos principais metabólitos detectados através da MRS de tempo eco curto e longo pode fornecer informação sobre o papel que desenvolvem estas substâncias nos diferentes processos metabólicos e energéticos no sistema nervoso central (SNC)[6, 7, 8].

Usando os tumores do SNC como o modelo deste estudo, temos, entre outros, os seguintes processos metabólicos alterados na presença destas neuropatologias: mudanças enzimáticas que podem incrementar os níveis de colina, dano neuronal que pode ser refletido no decréscimo do N-Acetilaspártato (NAA) ou alterações na glicólise que conseqüentemente podem aumentar os níveis de lactato. Adicionalmente, outras condições patológicas relacionadas com mudanças energéticas, osmolaridade celular, e proliferação celular que caracterizam o entorno tumoral, podem alterar a concentração destes metabólitos e outros como a creatina e o myo-inositol[2, 3, 4, 8, 9].

Diversas publicações têm reportado os padrões metabólicos dos tumores cerebrais, tentando classificá-los de acordo com as observações de diferentes características tais como diagnóstico

histopatológico, grau tumoral ou agressividade, diagnóstico clínico, etc [6, 7, 9, 10]. Nestes artigos diferentes métodos foram usados para coletar os dados e analisá-los. Alguns estudos foram realizados para obter uma comparação entre diferentes classes de quantificação seja no domínio temporal [11] ou da frequência [12].

O objetivo deste trabalho foi quantificar através do método automático AMARES os sinais dos principais metabólitos detectados a tempo de eco longo, nos grupos de pacientes e controles de uma base de dados do Laboratório de Neuroimagem (LNI-HC, UNICAMP) visando obter uma via de classificação automática desses grupos e compará-la com a classificação feita pelo método de integração direta (manual).

Referencial Teórico

O princípio físico que explica a geração de dados espectrais através da técnica de Espectroscopia de Ressonância Magnética (MRS, do inglês *Magnetic Resonance Spectroscopy*) está baseado na interação entre os spins nucleares numa amostra macroscópica (neste caso, o tecido cerebral) e o campo magnético externo aplicado nela. Nesta seção serão apresentados os conceitos básicos e princípios físicos da técnica de MRS que serão úteis para o entendimento do processo de aquisição dos dados espectrais que foram analisados neste projeto [13], [14], [15], [16], [17], [18].

2.1 Conceitos Básicos

2.1.1. Núcleos de interesse nos estudos clínicos com MRS

A sensibilidade das medições em MRS é determinada por dois fatores [18]:

1. A abundância natural isotópica dos núcleos ativos na ressonância magnética.
2. A sensibilidade específica dos núcleos, determinada por seu momento magnético, já que os núcleos que são detectados via MRS devem ter momento magnético nuclear não nulo.

Na maioria dos estudos clínicos é usado o hidrogênio (chamado de próton) como núcleo de interesse, porque ele é o elemento mais abundante nos tecidos e pela sua maior sensibilidade relativa aos outros núcleos, caracterizada por sua razão giromagnética, parâmetro que será introduzido a seguir.

Isótopo	Spin nuclear (I)	ω a 1.5 T [MHz]	Abundância Natural	Sensibilidade Relativa
^1H	1/2	63.6	99.9	100
^{19}F	1/2	59.8	100	84
^{31}P	1/2	25.7	100	6.6
^7Li	1/2	24.8	92.6	27
^{23}Na	1/2	16.8	100	10
^{13}C	1/2	16.0	1.1	1.6

Tabela 2.1: *Núcleos usados na Espectroscopia de MRS in-vivo*

2.1.2. Freqüência de Larmor

Os núcleos de interesse para a MRS possuem momento magnético μ , que está relacionado com o momento angular J através de

$$\mu = \gamma J, \quad (2.1)$$

onde γ é a razão giromagnética, que no caso de prótons (núcleos de hidrogênio) é de 42.58 MHz/Tesla. Devido à quantização do momento angular, o momento magnético também é quantizado:

$$\mu = \gamma \hbar [I(I + 1)]^{\frac{1}{2}}, \quad (2.2)$$

onde I é o número quântico de spin e $\hbar = (\frac{h}{2\pi})$, onde h é a constante de Planck. A componente do momento magnético na direção do eixo z é dada por

$$\mu_z = \gamma \left(\frac{h}{2\pi} \right) m, \quad (2.3)$$

onde m é o número quântico magnético, e é dado pela equação $m = 2I + 1$ [18].

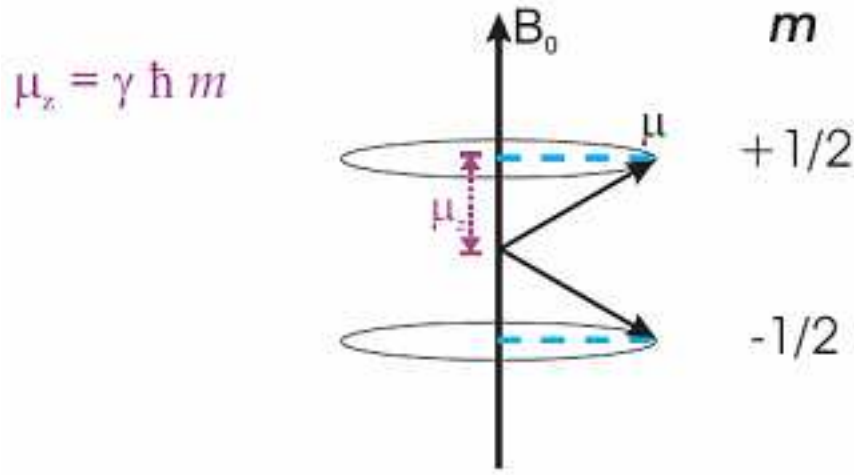


Figura 2.1: *Momento magnético do átomo de hidrogênio na presença de um campo magnético externo B_0 .*

Na presença de um campo magnético externo B_0 , a partícula adquire uma energia magnética dada por

$$E = -\mu_z B_0 = \gamma \left(\frac{h}{2\pi} \right) m B_0. \quad (2.4)$$

No caso particular de uma partícula de spin $I = 1/2$, como o próton do núcleo de hidrogênio, há somente dois níveis de energia ($m = -1/2$ e $m = 1/2$), cuja diferença ΔE é dada por

$$\Delta E = \left(\frac{h}{2\pi} \right) \nu_0. \quad (2.5)$$

O fenômeno de Ressonância Magnética Nuclear (MR) ocorre ao aplicar um campo magnético oscilante perpendicular a μ_z com uma frequência ν_0 sobre a partícula, com energia igual à energia magnética dada pela equação (2.5). A energia da onda eletromagnética será dada por

$$\Delta E = h\nu_0. \quad (2.6)$$

Combinando as equações (2.5) e (2.6) obtém-se a equação de Larmor

$$\nu_0 = \left(\frac{\gamma}{2\pi}\right)B_0, \quad (2.7)$$

onde ν_0 é a frequência de Larmor, que é o parâmetro característico nas medições das substâncias químicas detectadas via MRS. De acordo com a equação anterior, a frequência de Larmor seria a mesma para todas as substâncias químicas presentes numa amostra macroscópica, uma vez definidos o núcleo de interesse e a intensidade do campo magnético externo, e nenhuma informação poderia ser obtida de um espectro de MR. Porém, o fenômeno de blindagem química é definitivo para a obtenção de dados de MRS, como será apresentado a seguir.

2.1.3. Deslocamento Químico

Se todos os núcleos de hidrogênio numa mistura de moléculas tivessem a mesma frequência de Larmor, o espectro de MR seria limitado a um único pico. Porém, os núcleos experimentam diferentes valores de campo magnético devido à blindagem química resultante do meio eletrônico que os rodeia [18]. Desta forma, os núcleos com diferentes grupos químicos vizinhos terão frequências de ressonância diferentes que são dadas pela relação

$$f = \gamma B_0(1 - \sigma), \quad (2.8)$$

onde σ é o fator de blindagem química. Esta pequena mudança é a base da espectroscopia

de ressonância magnética.

É importante esclarecer que apesar de que os dados das frequências num espectro de MR podem ser escritos em Hz, na MR, os espectros são apresentados usando unidades de ppm (partes por milhão). Isso é feito por duas razões principais:

1. Se a unidade utilizada fosse o Hz, o eixo de frequências seria proporcional ao campo magnético externo; conseqüentemente a localização dos picos dependeria do campo usado e não haveria uma forma padrão para comparar dados espectrais.
2. Não existe uma substância natural para representar a frequência zero.

A equação que determina o deslocamento químico para o caso de dados in vivo é:

$$\sigma = \frac{f_s}{f_{\text{transmitter}} \times 10^{-6}} + \text{offset}, \quad (2.9)$$

onde f_s é a frequência da amostra num sistema de referências rotatório, $f_{\text{transmitter}}$ é a frequência do transmissor no sistema de referências do laboratório e *offset* é uma constante que se refere à escala ppm com relação a um padrão in vivo. No caso da espectroscopia de prótons, este padrão é o pico do CH_3 do N-Acetil-aspartato centrado em 2.02 ppm. Uma vez calculado o valor *offset*, este pode ser usado para transformar todas as frequências num espectro da escala Hz para ppm. O deslocamento químico é um parâmetro independente do campo magnético externo aplicado sobre o tecido, tal como pode observar-se na equação (2.9) [18].

Por convenção, os eixos espectrais medem a blindagem, onde os sinais dos núcleos mais fracamente blindados com frequências de ressonância maiores estão à esquerda e os núcleos mais fortemente blindados com frequências de ressonância menores estão à direita.

Na Figura 2.1.3, está esquematizado o espectro de MR do metanol (CH_3OH), com as respectivas ressonâncias para os prótons (núcleos de hidrogênio). Note-se que os prótons unidos ao carbono são detectados a 0.0 ppm enquanto o próton ligado ao oxigênio aparece a 1.5

ppm. A amplitude dos picos difere devido a que na MR a intensidade do sinal depende da quantidade de prótons que contribuem ao sinal, neste caso é maior para o grupo metila (3 hidrogênios) do que para o grupo hidroxila (1 hidrogênio).

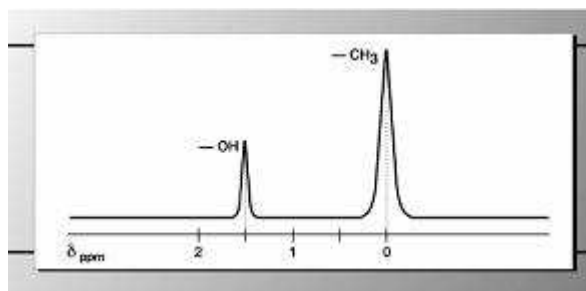


Figura 2.2: *Espectro MR do metanol (CH_3OH).*

2.1.4. Acoplamento-J

Adicionalmente às frequências de ressonância e às amplitudes dos sinais, existe uma outra característica importante nos espectros de NMR, os multipletos. Estes são originados principalmente por um fenômeno conhecido como Acoplamento spin-spin ou Acoplamento-J, que surge da interação entre os núcleos detectáveis via MR que estão dentro de uma molécula.

O Acoplamento-J é independente tanto da orientação molecular, quanto do campo magnético aplicado. Isto pode ser explicado pelo fato de que o momento magnético nuclear interage com o momento magnético dos elétrons nas ligações químicas, levando a diferentes possíveis orientações do momento magnético nuclear: paralela (baixa energia) ou antiparalela (alta energia) ao campo magnético externo. Esta interação fará com que a frequência de ressonância mude devido à mudança do campo efetivo experimentado pelo núcleo.

Para o caso dos núcleos com $spin = 1/2$, há duas possíveis orientações para o momento magnético, resultando em duas possíveis frequências de ressonância. O número de linhas para uma ressonância dependerá do número de vizinhos, enquanto que a intensidade de cada linha espectral é o resultado da probabilidade estatística das possíveis orientações dos momentos magnéticos dos spins vizinhos [18].

O espaço entre as linhas espectrais é chamado constante de acoplamento, e suas unidades são dadas em Hertz (Hz) [13].

Existem dois tipos de Acoplamento-J, o homonuclear ($^1H-^1H$) e o heteronuclear ($^1H-^{13}C$).

Na Figura 2.3, encontra-se um exemplo de Acoplamento-J homonuclear.

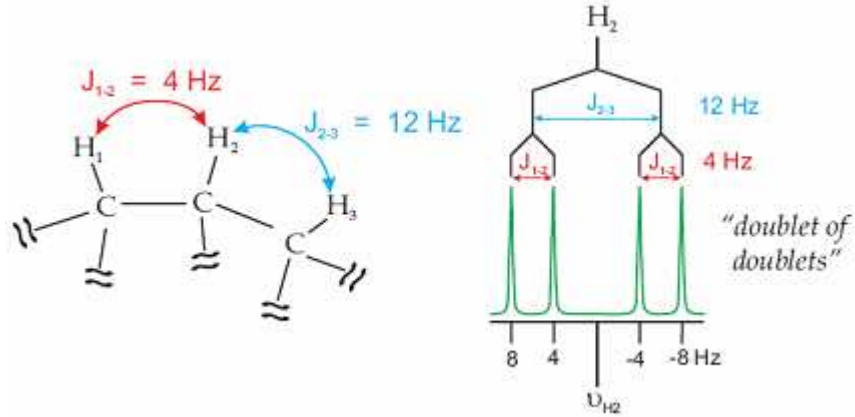


Figura 2.3: Exemplo de núcleos homonucleares ($^1H-^1H$) interagindo via acoplamento-J formando um duplete de dupletos.

2.2 Princípios físicos da geração do sinal de MRS

2.2.1. Magnetização de uma amostra macroscópica

Nos estudos de MRS de amostras macroscópicas, como o caso de estudos do tecido cerebral, a descrição do comportamento individual dos spins nucleares não é tão importante quanto o comportamento coletivo deles. Como consequência disso é preciso introduzir um conceito adicional, a Magnetização [13], [14], [15], [16], [17], [18].

Para núcleos de spin $I = 1/2$ como o hidrogênio, que é o núcleo de interesse neste trabalho, seus momentos magnéticos $m = \pm 1/2$ se distribuem aleatoriamente sobre um ângulo de $\theta = 54,74^\circ$ relativo ao eixo $\pm z$. Devido a que a população de spins de baixa energia (μ paralelo ao B_0) é maior que aquela dos spins de alta energia (μ antiparalelo ao B_0), pode-se

associar uma quantidade física à resultante dos momentos magnéticos individuais μ , chamada Magnetização (M_0).

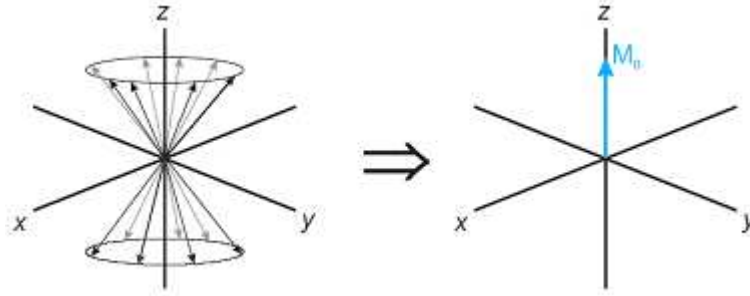


Figura 2.4: Vetor magnetização de uma amostra macroscópica.

A diferença entre a quantidade de spins nos diferentes estados energéticos pode calcular-se através da relação (2.10) obtida a partir da distribuição de Boltzmann

$$n \approx \left(\frac{N\gamma\hbar B_0}{2KT} \right), \quad (2.10)$$

onde N é o número total de spins, K é a constante de Boltzmann e T é a temperatura.

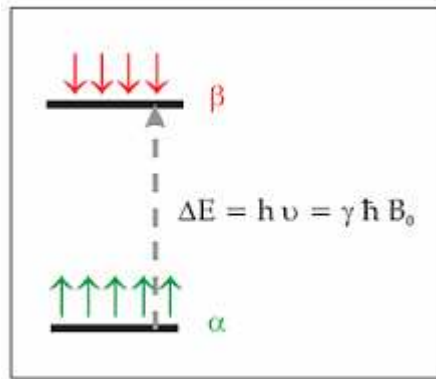


Figura 2.5: Diferença de população de spins alinhados paralela ou antiparalelamente ao campo magnético externo B_0 .

Para uma amostra macroscópica que contém um milhão de spins nucleares a 37°C ($T = 310.15\text{ K}$) em um campo magnético de 18.8 T (atualmente o maior campo magnético disponível para

estudos in vivo em animais) correspondente a uma frequência $\nu = 800MHz$ (para o núcleo de H), a diferença entre as populações de spins α e β é de apenas 31 spins (0.0031 %). Como o sinal final recebido é proporcional à diferença entre as populações, a NMR é uma técnica insensível, comparada com outras formas de espectroscopia.

No equilíbrio térmico, a amplitude do vetor magnetização macroscópico é

$$M_0 = \left(\frac{\gamma h}{2\pi} \right)^2 \left(\frac{nB_0}{4KT} \right), \quad (2.11)$$

onde n é dado pela equação 2.10.

A dependência quadrática de M_0 com a razão giromagnética γ implica que um núcleo ressonando a altas frequências também gerará um sinal de MR relativamente mais intenso. O hidrogênio tem o maior γ entre os núcleos comumente usados, o que permite obter uma maior intensidade relativa do sinal de MR.

A dependência linear de M_0 com a magnitude do campo magnético B_0 implica que em altos campos magnéticos melhora a sensibilidade. É por isso que vêm se incrementando as intensidades do campo magnético estático, que estão atualmente em um intervalo de 1.5 T a 7.0T para estudos in vivo em humanos.

Finalmente, a proporcionalidade inversa de M_0 com a temperatura T indica que a sensibilidade pode melhorar a baixas temperaturas, o qual é inviável em aplicações in vivo, dadas as restrições fisiológicas típicas destes sistemas.

Adicionalmente aos itens mencionados anteriormente, a sensibilidade experimental na MRS é afetada por outros fatores tais como volume da amostra, abundância natural do núcleo estudado e o nível de ruído na amostra.

2.2.2. Processo de Excitação

Devido a que a magnetização alinhada na direção do eixo z não pode ser detectada experimentalmente, é preciso perturbar o sistema e fazê-la rotar no plano transversal x - y .

Isto pode ser feito aplicando um segundo campo magnético oscilante no plano transversal, com frequência no intervalo das radiofrequências (MHz). Este campo é chamado Pulso de RF.

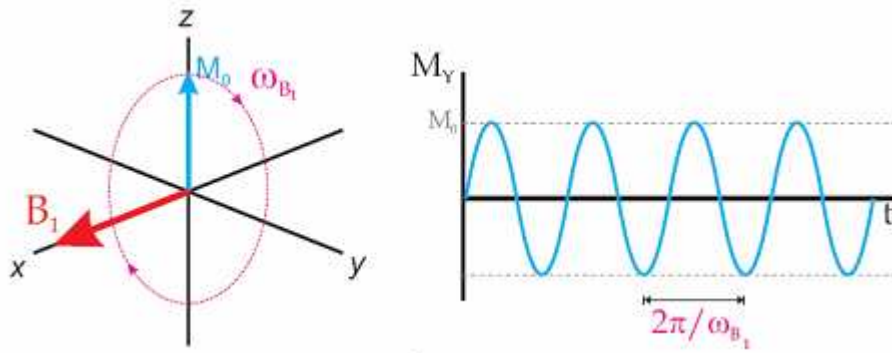


Figura 2.6: (a) Pulso de radiofrequência B_1 usado para excitar o vetor de magnetização macroscópica M_0 que não pode ser detectado no eixo $+z$. (b) Variação da componente y da magnetização M_0 no tempo ignorando processos de relaxação.

Quando se aplica o campo magnético B_1 , ou pulso de RF, por um tempo suficientemente longo, a magnetização pode rotar completamente sobre o plano transversal, ou invertir-se no eixo $-z$, originando os chamados pulsos de RF de 90° e 180° , respectivamente. Após a aplicação do pulso, a magnetização experimentará somente o campo principal B_0 , e precessionará ao redor dele à frequência de Larmor [14].

2.2.3. Processo de Relaxação, as equações de Bloch e a formação do sinal de MRS

Após a magnetização M_0 ser perturbada através do pulso de RF, e este último ser "desligado", a magnetização retorna a seu estado inicial através de um processo conhecido como relaxação [14]. As componentes perpendiculares (M_x e M_y) e paralela (M_z) ao vetor de magnetização se relaxam com diferentes constantes de tempo da seguinte forma:

$$\begin{aligned} M_z &= M_0 (1 - \exp(-t/T_1)) \\ M_x &= M_0 \cos(\omega t) \exp(-t/T_2) \\ M_y &= M_0 \sin(\omega t) \exp(-t/T_2) \end{aligned} \quad (2.12)$$

Onde T_1 é a constante de tempo da relaxação de spin-rede, T_2 é a constante de tempo da relaxação spin-spin, e $\omega = 2\pi\nu$, ν é a frequência de Larmor. A relaxação spin-rede é o processo que determina quão rápido se recompõe a magnetização ao longo do eixo z. Já a relaxação spin-spin é o processo que determina quão rápido se perde a magnetização no plano x-y.

Estas equações são conhecidas como as equações de Bloch e permitem descrever o comportamento macroscópico dos spins num experimento de MR, mostrando como a magnetização retorna ao equilíbrio depois de uma perturbação como a produzida por um pulso de RF.

A Figura 2.7 mostra a variação das componentes transversais da magnetização, sinal conhecido também como FID (do inglês, Free Induction Decay). O FID é o sinal detectado pela bobina geradora dos pulsos RF (que atua também como detector) através da indução de uma voltagem oscilante. Este sinal FID coletado é posteriormente digitalizado e transformado via Transformada de Fourier para obter o espectro propriamente dito, como mostra a Figura (2.8).

Este é o processo que permite a obtenção de dados espectroscópicos de ressonância magnética.

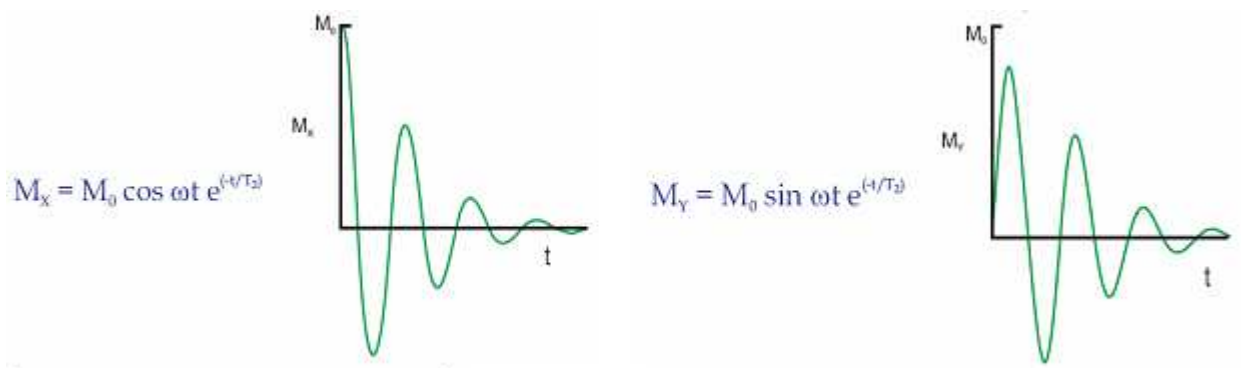


Figura 2.7: *Variação das componentes transversais da magnetização, FID, correspondentes ao sinal de MRS.*

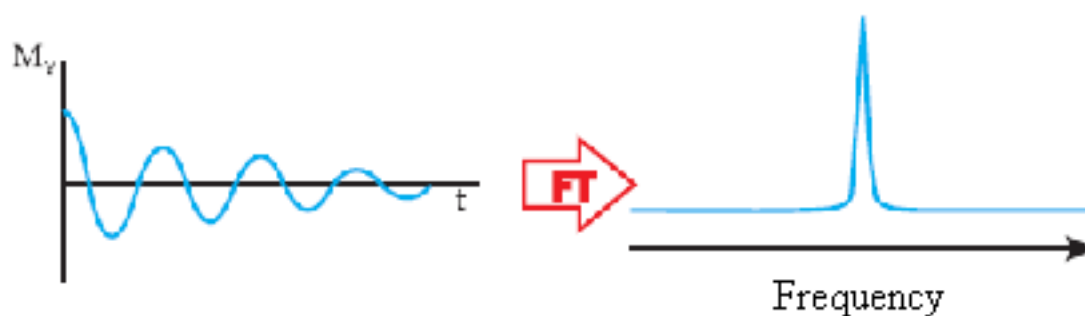


Figura 2.8: *(a) Sinal FID gerado em um experimento de MRS e (b) a transformada de Fourier desse sinal correspondente ao espectro de MRS.*

2.3 Aspectos técnicos na aquisição de dados de MRS

Nesta seção serão apresentados alguns dos aspectos técnicos mais relevantes a serem levados em conta no processo de aquisição de dados de MRS e que garantem melhor resolução espectral, tais como o controle das inhomogeneidades do campo magnético, a compensação das correntes parasitárias (eddy-currents) induzidas pelos pulsos de gradientes de campo magnético, e a supressão de sinais indesejáveis da água e das gorduras mediante pulsos seletivos de radiofrequência. Somado a isso, será incluída uma descrição geral da sequência de pulsos usada na aquisição dos dados experimentais usados neste projeto, conhecida como

PRESS (do inglês Point-Resolved Spectroscopy), resumindo suas características, diagramas de tempo e vantagens frente à outra, não menos usada, seqüência de pulsos STEAM (do inglês Stimulated Echo Acquisition Mode) [13], [18].

2.3.1. Localização do Volume de Interesse (VOI) e as Seqüências de Pulso de Radiofrequência

Existem diferentes técnicas de localização na MRS, as quais permitem definir o volume de interesse ou VOI (do inglês, Volume of interest) onde serão coletados os dados experimentais. Estas técnicas são divididas em dois grandes grupos: as de voxel único ou SVS (do inglês, Single Voxel Spectroscopy) e as de imagens espectroscópicas ou CSI (do inglês, Chemical Shift Imaging). Cada técnica de localização tem suas vantagens e desvantagens. Por exemplo, enquanto a SVS permite uma maior resolução espectral comparada à CSI para cada espectro medido do único voxel, a CSI permite um mapeamento das variações dos metabólitos no cérebro para uma rede de voxels em uma única aquisição (ver Figura(2.9)). A escolha de uma ou outra técnica depende do experimento que se queira realizar e da configuração própria dos scanners de ressonância magnética, já que nem todos permitem colher dados de CSI. A localização propriamente dita dos voxels ou multivoxels é realizada através de seqüências de pulsos de radiofrequência, os quais delimitam a região onde serão adquiridos os espectros de MRS [17].

Devido a que neste trabalho os espectros foram adquiridos através da técnica de SVS, a descrição das seqüências de pulso será restrita às mais comumente usadas na SVS que são a PRESS e a STEAM. Estas duas seqüências usam três pulsos de radiofrequência seletivos com gradientes de campo magnético ortogonais entre si, onde a intersecção das fatias define o VOI.

A seqüência PRESS possui três pulsos RF de 90° , 180° e 180° . A Figura (2.10) mostra o diagrama de tempo para este caso, incluindo um pulso CHESS (do inglês, Chemical-Shift-Selective pulse), usado na supressão do sinal da água (isto será discutido mais adiante nesta



Figura 2.9: Técnicas de localização Chemical Shift Imaging (CSI) e Single-Voxel Spectroscopy (SVS).

seção).

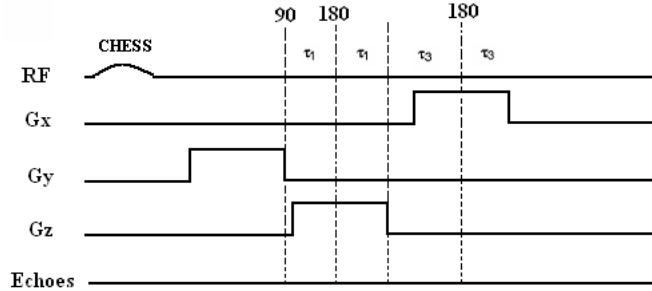


Figura 2.10: Diagrama de tempo para uma sequência de pulsos PRESS.

τ_1 é o tempo entre o primeiro e segundo pulso de RF e $\tau_1 + \tau_3$ é o intervalo de tempo entre o segundo e terceiro pulsos de RF. O tempo ao eco (TE) é $2\tau_1 + 2\tau_3$.

G_x , G_y e G_z são os gradientes de campo magnético, os quais são gerados por bobinas solenoidais supercondutoras nas quais correntes elétricas opostas (em diferentes bobinas) produzem campos magnéticos que se cancelam parcialmente entre si para gerar um gradiente de campo magnético numa única direção (x, y, z). A intersecção resultante da aplicação dos gradientes de campo magnético é o VOI, tal como se mostra na Figura (2.11).

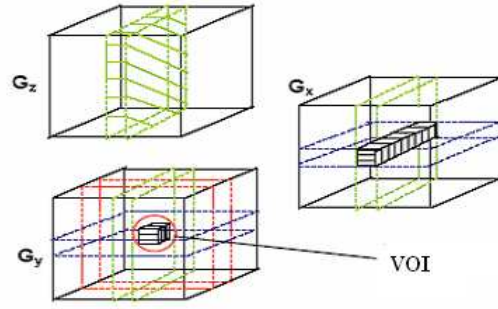


Figura 2.11: *Volume de interesse (VOI) resultante da aplicação dos gradientes de campo magnético G_x , G_y e G_z usados na seqüência de pulsos PRESS.*

A outra seqüência de pulsos mais comumente usada na MRS é a STEAM, que possui três pulsos RF de 90° . A Figura (2.12) mostra o diagrama de tempo para este caso, incluindo um pulso CHES usado na supressão do sinal da água.

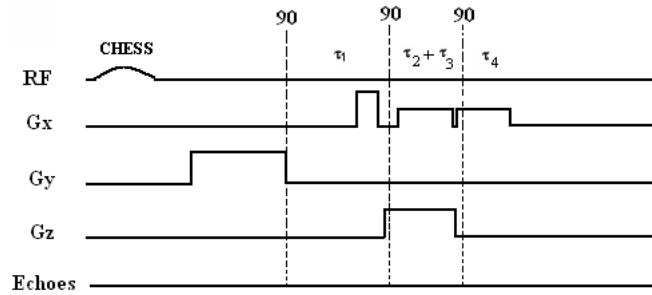


Figura 2.12: *Diagrama de tempo para uma seqüência de pulsos STEAM.*

O τ_1 é igual ao τ_4 , $\tau_1 + \tau_4$ é o tempo ao eco (TE), enquanto $\tau_2 + \tau_3$ é conhecido como o tempo de mistura (TM). Um fato importante na seqüência STEAM é que somente a metade da magnetização transversal obtida pelo primeiro pulso de 90° é transformada em magnetização longitudinal pelo segundo pulso de 90° , diminuindo o sinal/ruído (SNR) por um fator 2. O terceiro pulso leva a magnetização longitudinal armazenada pelo segundo pulso de RF de novo ao plano transversal para formar o STE (do inglês, Stimulated Echo). Na Figura (2.13) são mostrados espectros in vitro obtidos por cada uma das seqüências de pulsos PRESS e STEAM, onde se evidencia o menor SNR no segundo caso.

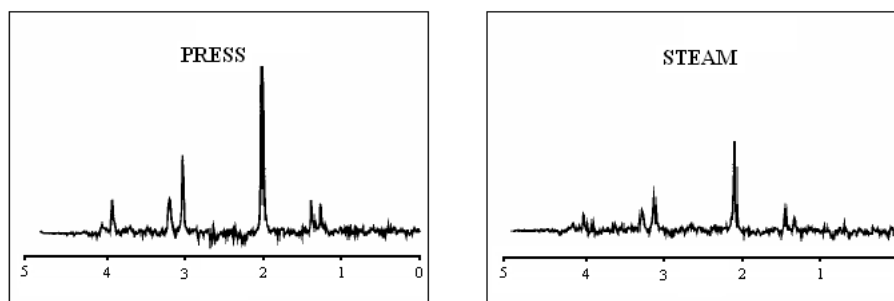


Figura 2.13: Espectros *PRESS* e *STEAM* para uma solução phantom para um *VOI* de 8 ml, $TE = 288\text{ ms}$, $TR = 1500\text{ ms}$ e 32 aquisições. A aquisição *PRESS* tem o dobro de *SNR* que a *STEAM*.

2.3.2. Razão Sinal-Ruído (SNR)

A largura de um pico em um espectro é um indicador da amplitude do sinal, enquanto que o ruído pode avaliar-se medindo o desvio padrão em uma região do espectro que não contenha sinal (p.e. entre -1.0 e -2.0 ppm).

Existem duas definições para a razão sinal/ruído (SNR, do inglês signal-to-noise ratio) na MRS. Uma delas define o SNR como sendo a largura do pico dividida pelo ruído rms (do inglês root mean square). A segunda define o SNR como a razão entre a área do pico e o ruído rms. A segunda definição é mais pertinente para comparar dados in vivo e otimizar a metodologia da MRS. Note-se que as concentrações dos metabólitos são calculadas a partir das áreas dos picos e que a comparação de dois espectros de MRS será válida unicamente se foram usados os mesmos parâmetros na aquisição e pós-processamento dos dados, condições raramente encontradas em espectros coletados em scanners de MR de diferentes fabricantes.

A magnitude do ruído é independente do volume do *VOI*, enquanto que a magnitude do sinal é diretamente proporcional a este (ver Figura (2.14) a seguir). Portanto, quanto maior e melhor delimitado for o voxel, maior será o número de prótons no tecido, o que permitirá um incremento no sinal FID e, conseqüentemente, na amplitude dos picos dos metabólitos de

interesse.

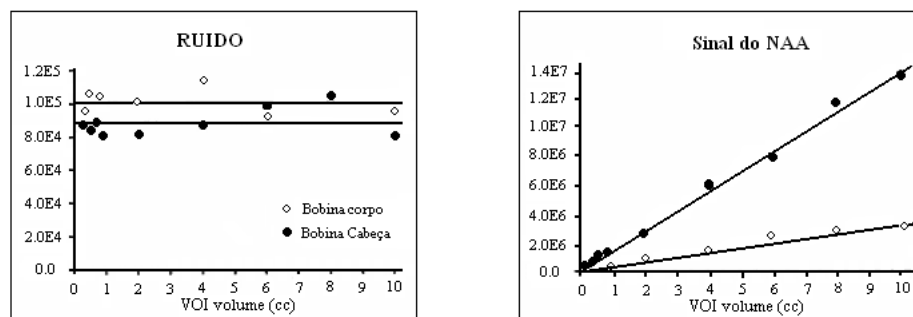


Figura 2.14: *Efeitos da variação no tamanho do VOI sobre o sinal e o ruído. A bobina usada para obter dados de MRS da cabeça tem maior sinal e menos ruído do que a bobina usada para o corpo.*

2.3.3. Shimming

Um dos aspectos experimentais mais importantes para garantir um incremento na sensibilidade e na resolução espectral na MRS é a homogeneidade do campo magnético aplicado ao tecido em estudo, já que o SNR aumenta e a largura dos picos diminui. O processo que permite alcançar uma ótima homogeneidade de campo magnético é conhecido como Shimming. Este já vem implementado nos scanners de MR através de rotinas automáticas onde as variações nos sinais de MRS são monitoradas, seja no domínio temporal ou no domínio das frequências, para compensar variações do campo magnético externo. Exemplos de espectros com Shimming bom e ruim são ilustrados na Figura (2.15).

A correção das inhomogeneidades do campo magnético, permite, portanto, obter espectros com picos de metabólitos melhor definidos, diminuir os efeitos decorrentes das sobreposições de picos, e melhorar a quantificação das amplitudes das ressonâncias de interesse.

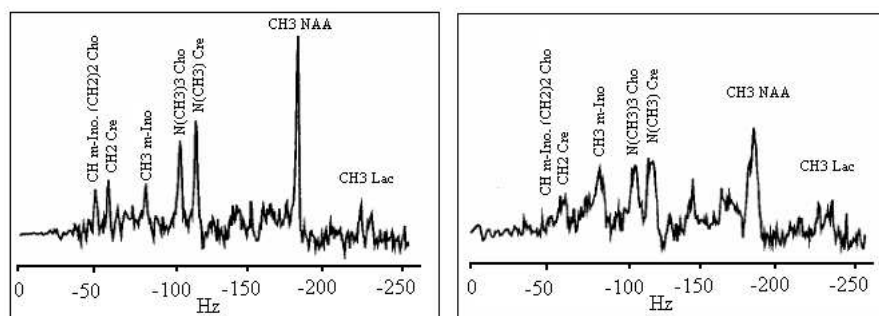


Figura 2.15: Exemplos de espectros com bom (esquerda) e ruim (direita) *shimming*.

2.3.4. Eddy Currents (Correntes parasitárias)

Na aquisição de dados espectroscópicos de MRS, as eddy-currents são induzidas no processo de geração dos gradientes de campo magnético, utilizados para a localização do sinal. Esses gradientes são gerados em forma de pulsos, isto é, as correntes elétricas nas bobinas de gradiente são rapidamente maximizadas ao valor desejado, mantidas nesse valor por um tempo curto e finalmente reduzidas a zero (ver Figura (2.16) a). Idealmente a geração dos gradientes de campo magnético deveria ser instantânea à medida que acontecem as variações nas correntes elétricas, mas na prática, as mudanças abruptas nos gradientes induzem eddy-currents nas bobinas magnéticas (ver Figura (2.16) b), distorcendo os picos e dificultando a quantificação.

As eddy-currents são manifestações da lei de indução de Faraday e podem ser corrigidas, entre outras formas, através de bobinas de compensação (ver Figura (2.16) c e d). Adicionalmente, podem ser corrigidas no pós-processamento dos dados, dividindo o sinal no domínio temporal pelo sinal não suprimido da água, ou usando uma correção de fase ponto a ponto, novamente, usando o sinal não suprimido da água como referência.

Como no caso das correções na inhomogeneidade do campo magnético externo, a correção das eddy-currents na geração dos gradientes de campo melhora a resolução dos picos nos espectros, diminuindo a largura dos picos e evitando efeitos de sobreposição das ressonâncias

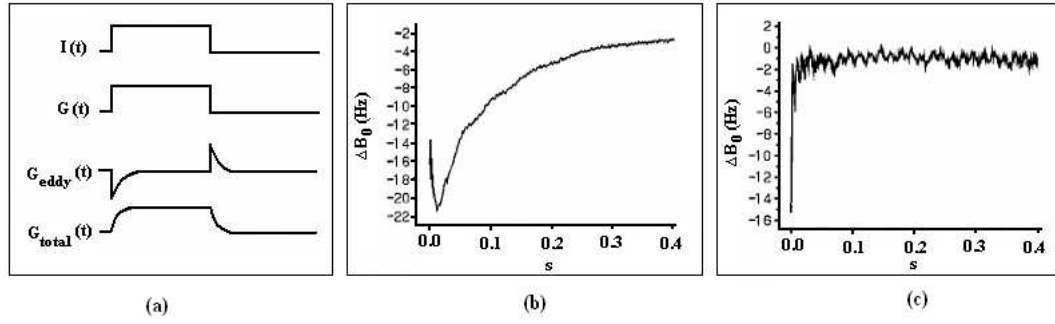


Figura 2.16: (a) Diagrama da formação do gradiente de campo magnético $G(t)$ e a produção de gradiente de eddy-currents $G_{\text{eddy}}(t)$ que distorcem os gradientes totais aplicados ao tecido nas técnicas de localização. (b) Exemplo de distorção por eddy-currents (B_0 em Hz) vs tempo (s) sobre um magneto sem gradientes de compensação e (c) Correção das eddy-currents usando gradientes de compensação.

de interesse.

2.3.5. Sinais indesejáveis na MRS: Água, Lipídeos e Macromoléculas

A supressão do sinal da água na 1H -MRS in vivo é fundamental já que sua concentração no cérebro é aproximadamente de 70 % e o sinal produzido pelos prótons dessa molécula é muito maior que os sinais dos prótons dos metabólitos de interesse, presentes no cérebro a baixas concentrações, obstruindo sua visualização e quantificação.

A supressão do sinal da água é feita através de um pulso CHESS (do inglês, Chemical Shift Selected pulse), seguido pelos correspondentes gradientes de campo magnético das seqüências de pulso PRESS ou STEAM. A qualidade e o grau de supressão do sinal da água dependerão do shimming in vivo, da estabilidade e linearidade do amplificador de RF, da presença de eddy-currents e do número de pulsos CHESS empregados. O sinal remanescente da água deve filtrar-se através de métodos de pós-processamento como será mencionado no Capítulo 3.

Um fator associado à contaminação dos sinais espectrais é a presença de picos de lipídeos devida a pulsos seletivos não ideais que permitem a detecção destes sinais provenientes do conteúdo lipídico da epiderme que envolve o crânio. Da mesma forma que o sinal da água, os sinais destes lipídeos não filtrados se sobrepõem aos sinais dos metabólitos de interesse.

2.4 Parâmetros, descrição e espectros in vitro dos principais metabólitos do cérebro humano

Nesta seção serão apresentados alguns parâmetros dos diferentes metabólitos observáveis no cérebro humano com a técnica de 1H -MRS, e cuja relevância clínica é maior nos estudos de pacientes portadores de tumores cerebrais. Serão incluídos os deslocamentos químicos, as constantes de acoplamento, uma descrição geral das funções conhecidas de cada metabólito, assim como as fórmulas químicas e um exemplo do espectro in vitro individual de cada um deles [18],[19].

2.4.1. Colina (Cho)

Através de estudos com MRS nos tecidos, tem-se observado o sinal da colina total, principalmente como um proeminente singlete a 3.2 ppm, que inclui contribuições de colina livre, glicerfosforilcolina (GPCho) e fosforilcolina (PCho).

A concentração total observável de colina no cérebro é aproximadamente 1-2 mmol/kg e não está distribuída uniformemente, a sua concentração na substância branca é ligeiramente maior do que na substância cinzenta. A contribuição da colina livre no cérebro normal é pequena, menor que 0.03 mmol/kg, mas aumenta significativamente na presença de tumores.

A colina é necessária para a síntese do neurotransmissor acetilcolina e da fosfadilcolina, o maior constituinte das membranas. A interpretação bioquímica das alterações no sinal da colina com MRS in vivo é difícil pela incerteza na contribuição dos metabólitos ao sinal. A colina

reflete o metabolismo celular e está aumentada em processos que produzem hiper celularidade [20]. Tem-se relacionado seus níveis com o potencial de proliferação tumoral, determinado pela análise imunohistoquímica de biópsias utilizando o índice Ki-67 para gliomas [21]. Isto serviria como suporte à idéia de que a colina está relacionada diretamente com o grau de malignidade [22]. Note-se, entretanto, que os meningiomas podem apresentar níveis de colina superiores aos gliomas de maior grau. As mudanças nos níveis de colina estão geralmente associadas com alterações na composição da membrana. O sinal aumentado está presente na maioria das neoplasias sólidas do sistema nervoso central (SNC), sendo que seus níveis aparecem diminuídos em resposta ao tratamento do tumor. Em processos necróticos, há redução ou desaparecimento deste pico (assim como de todos os outros), dificultando a classificação dos tumores pelo grau de agressividade tumoral [23].

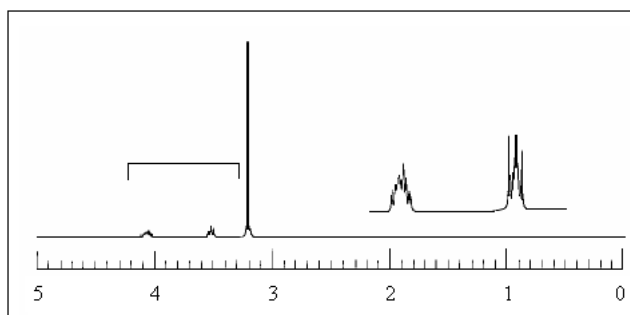


Figura 2.17: *Espectro in-vitro da Colina e sua fórmula química.*

2.4.2. Creatina (Cre)

A Creatina e Fosfocreatina (PCr) estão presentes no cérebro, músculos e no sangue, e sua síntese tem lugar nos rins e no fígado. A fosfocreatina atua como reservatório para a geração de ATP e está relacionada com a capacidade energética do cérebro. A creatina total pode ser um indicativo da atividade tumoral [24], já que indica o estado energético da célula.

Medições com ^1H -MRS in vivo permitem detectar o pico combinado da creatina e fosfocreatina como um proeminente singlete em 3.03 ppm proveniente de seus prótons metil.

Adicionalmente a este pico, pode-se detectar outros em 3.90 ppm devido aos prótons do grupo metileno, e em 6.6 ppm devido ao próton do grupo NH.

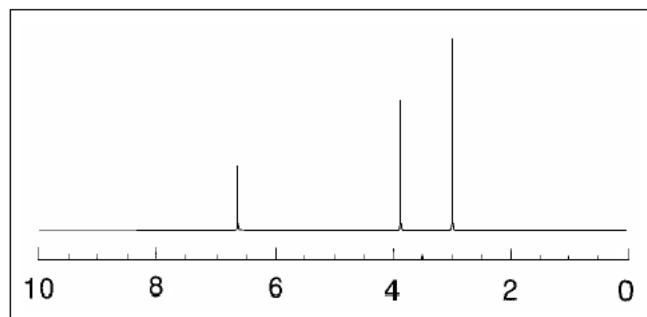


Figura 2.18: *Espectro in-vitro da Creatina e sua fórmula química.*

As concentrações no cérebro humano são aproximadamente 4.0-5.5 mmol/kg para a fosfo-creatina, e 4.8-5.6 mmol/kg para a creatina. O pico da creatina é relativamente estável e não apresenta mudanças com a idade e nem em uma grande variedade de doenças, por isso algumas vezes a creatina tem sido usada como concentração de referência interna em estudos envolvendo câncer cerebral [25]. No entanto, esta prática não pode ser generalizada devido às variações deste pico dentro de uma mesma patologia, para cujos casos é mais conveniente usar a referência interna da água.

2.4.3. Lactato (Lac)

O Lactato é o produto final da glicólise anaeróbica, está presente no cérebro normalmente a baixas concentrações e geralmente não é observado em estudos de MRS in vivo. Proporciona informação sobre o grau de metabolismo aeróbico-anaeróbico do tecido. Sua presença indica que a respiração oxidativa normal no metabolismo celular encontra-se alterada e que os carboidratos estão sendo catabolizados anaerobicamente. Esta situação ocorre em lesões altamente celulares e metabólicas que têm crescido acima do que o seu aporte vascular lhes permite.

Altas concentrações ocorrem rapidamente depois da hipóxia e sua detecção é de grande

interesse nos estudos clínicos sobre trauma e tumores, especialmente em tecido necrótico. É um dos metabólitos mais facilmente detectados nos tumores e, apesar de controvérsias, tem sido considerado marcador da agressividade tumoral [26], já que também tem sido detectado em tumores de baixa agressividade.

No espectro de ^1H -MRS o pico do lactato consiste num dubleto do grupo metil localizado em 1.32 ppm. Este está comumente sobreposto a um pico de lipídeos na presença de tumores cerebrais, o que dificulta sua quantificação isolada. O quarteto do grupo metino (chegar esta palavra) em 4.09 ppm não é observado in vivo devido à sua proximidade com o grande pico da água.

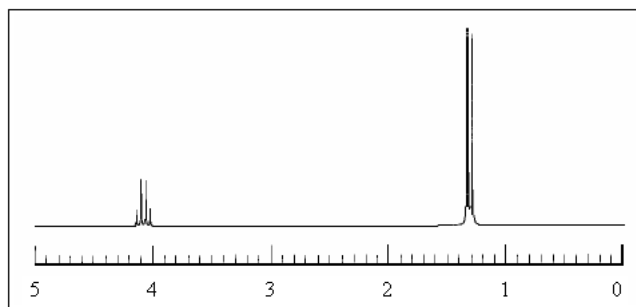


Figura 2.19: *Espectro in-vitro do Lactato e sua fórmula química.*

2.4.4. Glutamato (Glu), Glutamina (Gln) e o Grupo Glx

O Glutamato é o aminoácido mais abundante encontrado no cérebro humano com uma concentração de 12 mmol/kg e ele atua como um neurotransmissor excitatório. A Glutamina é um aminoácido precursor e armazenador do glutamato localizado nos astrócitos. Ela é similar estruturalmente ao glutamato e seu padrão de acoplamento é o mesmo. O composto que apresenta maior correlação com os processos patológicos é a glutamina que tem sido considerado marcador glial, no entanto, o nível aumentado do Glx é encontrado principalmente nos meningiomas (tumores não neurogliais).

No espectro o glutamato e a glutamina têm dois grupos metilenos e um grupo metino que

estão acoplados fortemente formando um espectro complexo que resulta em baixas intensidades de picos individuais. O próton do grupo metina aparece no espectro dos dois metabólitos como um dubleto de dubletos centrado em 3.74 ppm, enquanto que os quatro prótons dos dois grupos metilenos estão agrupados no intervalo de 2.04 - 2.35 ppm para o glutamato e no intervalo de 2.12 - 2.46 ppm para a glutamina. A superposição das ressonâncias do Glu e Gln com as ressonâncias do GABA (2.28 ppm) e NAA (2.03 ppm) dificulta a identificação das contribuições *in vivo* dos sinais individuais destes metabólitos. A baixas magnitudes de campo (menores que 3 T), os multipletos do Glu e da Gln colapsam numa única ressonância conhecida como Glx, levando a uma aparente melhora em sua observação e permitindo sua quantificação *in vivo*. Porém tem-se demonstrado que estes metabólitos podem ser identificados separadamente *in vivo* acima de 4 T.

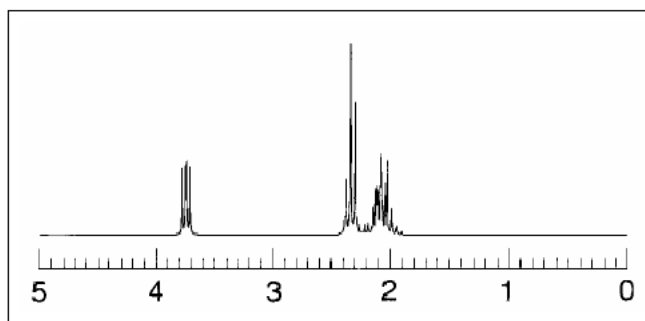


Figura 2.20: *Espectro in-vitro do Glutamato e sua fórmula química.*

2.4.5. N-Acetilaspártato (NAA)

O NAA é um aminoácido livre presente no cérebro a relativamente altas concentrações, está localizado principalmente no sistema nervoso central e periférico. Sua função não é muito conhecida, mas acredita-se que atua como um reservatório de aspartato e um precursor do N-acetil-aspartil-glutamato (NAAG). É considerado um marcador da densidade neuronal, ainda que não seja conhecido como variam as concentrações de NAA entre os diferentes tipos de neurônios [27].

No espectro, a observação de um singlete proeminente em 2,01 ppm facilita o estudo do NAA com MRS in vivo. Em baixas magnitudes de campo magnético ($\leq 3T$), este singlete pode conter contribuições do NAAG. O NAA também tem três dubleto-de-dubletos centrados em 2,49, 2.67 e 4.38 ppm, correspondentes aos prótons dos grupos CH₂ e CH, enquanto o próton do grupo amido NH aparece como um dubleto longo em 7.82 ppm [28].

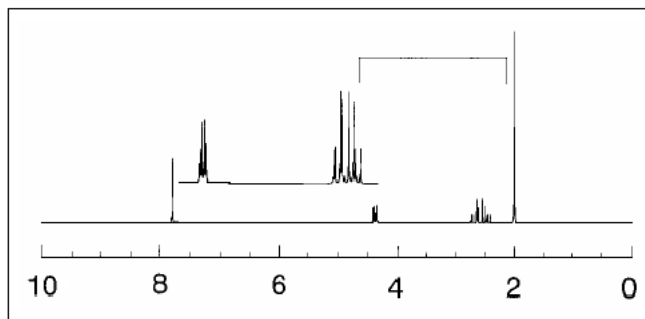


Figura 2.21: *Espectro in-vitro do N-Acetilaspártato e sua fórmula química.*

As concentrações do NAA no cérebro humano normal variam num intervalo de 7 - 16 mmol/kg. Porém, estas concentrações se vêem drasticamente diminuídas nos diferentes tipos de tumores cerebrais, indicando uma perda ou disfunção neuronal das regiões afetadas.

2.4.6. Myo-inositol (mIno)

O Myo-inositol é o isômero do inositol mais encontrado em tecidos. A função do Myo-inositol não é bem entendida, mas acredita-se que é um requerimento essencial para o crescimento celular e um armazenador de glicose, e tem sido proposto como marcador de astrócitos. O Myo-inositol se encontra aumentado em astrocitomas de baixo grau e diminuído ou ausente em tumores não gliais [29], [30]. O intervalo normal de suas concentrações é de 4 - 8 mmol/kg.

No espectro podem identificar-se quatro ressonâncias correspondentes a um dubleto-de-dubletos centrado em 3.52 ppm e a um tripleto em 3.61 ppm, cada multipletto com dois prótons. O tripleto em 3.27 ppm usualmente aparece sobreposto com o pico da colina e aquele em 4.05 ppm não aparece devido à supressão da água.

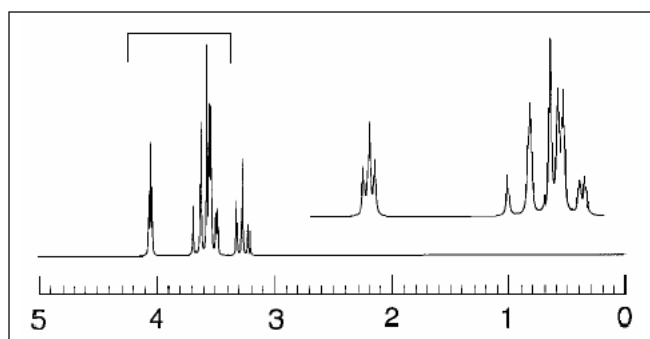


Figura 2.22: *Espectro in-vitro do Myo-inositol e sua fórmula química.*

Níveis alterados na sua concentração estão associados à doença de Alzheimer, encefalopatia hepática e dano cerebral em tumores malignos.

Na Tabela 2.4.6 estão resumidas as informações sobre os deslocamentos químicos, as constantes de acoplamento e a multiplicidade, das ressonâncias dos grupos que contribuem ao espectro de 1H -MRS, de cada um dos metabólitos estudados neste projeto.

2.5 Importância do estudo de tumores cerebrais através da MRS in-vivo e perspectivas futuras da técnica

O diagnóstico do tipo de tumor e o grau de agressividade do mesmo, é muito importante para o tratamento e prognóstico dos pacientes portadores de tumores cerebrais. A MR de imagens pode proporcionar, não invasivamente, um diagnóstico inicial das massas cerebrais com uma precisão diagnóstica entre 30-90 % dependendo do tipo de tumor [30].

A histopatologia, considerada o método padrão para determinar o diagnóstico definitivo, requer a biópsia do tumor, procedimento cirúrgico que carrega complicações pós-operatórias ou, em casos particulares, põe em risco a vida do paciente. No estudo realizado por Yu et al. em 550 pacientes dos quais foram obtidas biópsias cerebrais, encontraram que o 8 % apresentavam processos inflamatórios ou abscessos, o 2,2 % apresentavam outro tipo de lesões, 3,4 % foram

biopsias que não permitiram o diagnóstico definitivo, e 8% padeceram complicações pós-operatórias [3], [31].

A técnica de 1H -MRS in-vivo, é um método não invasivo que permite predizer o diagnóstico de diversos tipos de tumores do SNC, evitando assim, a realização de processos cirúrgicos preliminares como as biopsias [32]. Aliás, a técnica poderia evitar biópsias em processos não tumorais ou ajudar no diagnóstico de tumores pouco acessíveis tratáveis com radioterapia ou quimioterapias mais do que com a recessão cirúrgica do tumor [33], [34], [35], [36], [37].

A 1H -MRS in-vivo oferece informação completamente diferente ao compará-la com as técnicas de imagens, no entanto, pode-se realizar na maioria dos scanners de MRI usados na radiologia clínica [5],[38],[39]. Particularmente, a espectroscopia de imagens vem tomando um papel mais importante na determinação da extensão tumoral, e o grau de infiltração no tecido normal, permitindo uma ajuda adicional na delimitação da lesão [22],[40],[89],[42],[43].

Adicionalmente a MRS in-vivo permite compilar maior informação sobre a bioquímica tumoral tanto em pacientes adultos quanto em pediátricos [3],[9],[10],[44]. Isto permitirá, junto a informação fornecidas por outras técnicas, como DNA microarrays e espectroscopia de alto campo multivoxel, ter uma visão geral e realista dos mecanismos de desenvolvimento e propagação dos tumores cerebrais.

Muitos trabalhos têm usado a MRS in-vivo visando a classificação automática de tumores a partir dos padrões metabólicos, com a finalidade de desenvolver uma plataforma tecnológica simples que permita um diagnóstico imediato da doença e permita a radiologistas e neurocirurgiões decidirem as melhores diretrizes a serem tomadas para tratar o paciente [45],[46],[47],[48].

Esse foi o objetivo colocado no projeto conhecido como INTERPRET-EU [49], o qual criou uma ferramenta de suporte e decisão para o diagnóstico de tumores a qual usou o diagnóstico histopatológico e dados de MRS in-vivo como base para a classificação final.

Posteriormente, um outro projeto foi lançado, o eTUMOUR [50], com a finalidade de melhorar

o diagnóstico automático de tumores incorporando à informação proporcionada pela MRS in-vivo de SVS e de imagens espectroscópicas, dados da genômica (DNA e RNA microarrays) e metabolômica de alto campo ex-vivo.

Ainda que tenha-se avançado neste campo, falta um caminho longo por percorrer, já que a confiança no diagnóstico automático via dados espectroscópicos in-vivo não atinge os 100 %. Particularmente, tumores atípicos (p.e. teratomas) ou a classificação de tumores de diferentes sub-tipos (p.e. meningiomas típicos e atípicos) dificultam essa tarefa.

Metabólitos	Grupo	Shift (ppm)	Multipletes	J (Hz)
NAA	2CH_3	2.0080	s	
	2CH	4.3817	dd	3.861
	3CH_2	2.6727	dd	9.821
	3CH_2	2.4863	dd	-15.59
	NH	7.8205	d	6.400
Colina	$N(CH_3)_3$	3.1850	s	
	1CH_2	4.0540	m	3.140
	2CH_2	3.5010	m	6.875
Creatine	$N(CH_3)$	3.0270	s	
	2CH_2	3.9130	s	
	NH	6.6490	s	
Glutamato	2CH	3.7433	dd	7.331
	3CH_2	2.0375	m	4.651
	3CH_2	2.1200	m	-14.849
	4CH_2	2.3378	m	8.406
	4CH_2	2.3520	m	6.875
Myo-inositol	1CH	3.5217	dd	2.889
	2CH	4.0538	t	9.998
	3CH	3.5217	dd	3.006
	4CH	3.6144	t	9.997
	5CH	3.2690	t	9.485
	6CH	3.6144	t	9.482
Lactato	2CH	4.0974	q	6.933
	3CH_3	1.3144	d	

Tabela 2.2: Metabólitos detectáveis com MRS *in vivo*, incluindo seus deslocamentos químicos (utilizando como referência a ressonância do singlete do DSS-trimethyl em 0.0000 ppm), multiplicidade e constantes de acoplamento- J . As definições da multiplicidade são: s, singlete; d, dubleto; t, tripleto; q, quarteto; m, outro multiplete. A multiplicidade reportada foi observada num espectro unidimensional medido a 500 ou 600 MHz.

Métodos de processamento de dados espectrais e quantificação de metabólitos: Método AMARES

Existem uma variedade de métodos disponíveis para a quantificação de sinais espectroscópicos de ressonância magnética, seja no domínio temporal ou da frequência. Um ponto chave na quantificação destes sinais é decidir qual dos métodos é o mais plausível de ser utilizado. Neste capítulo será apresentada uma breve resenha dos métodos de processamento e quantificação de metabólitos das ressonâncias de interesse no espectro in vivo de MRS, suas diferenças, vantagens e desvantagens. Finalmente, o método de quantificação AMARES será abordado com maior detalhe, já que foi este método de análise de espectros no domínio temporal o escolhido para o processamento dos sinais de MRS deste trabalho [11],[12],[51].

3.1 Análise no domínio da frequência

Os sinais de MRS, conhecidos como FIDs (do inglês Free Induction Decay), são adquiridos no domínio temporal. A conversão destes sinais ao domínio da frequência realiza-se através da transformada de Fourier discreta, DFT (do inglês, Discret Fourier Transform). A quantificação pode ser obtida com o método de integração do espectro ou mediante o uso de métodos de modelamento dos picos. O método de integração do espectro de MRS é o caminho mais fácil já que implica a integração direta dos picos no espectro. Este método ainda é empre-

gado apesar do fato de que pode introduzir um viés nos resultados devido ao operador e às técnicas aplicadas para a correção da linha de base, fazendo com que os resultados sejam altamente variáveis e conseqüentemente pouco reproduzíveis. Os dados de MRS in vivo oferecem diversas limitações na aplicação deste método direto, principalmente devido à superposição dos sinais de interesse, ao baixo SNR e às marcadas distorções da linha de base. Nas condições anteriormente citadas, é quase impossível obter uma ótima quantificação dos picos de metabólitos de interesse e se faz preciso recorrer a métodos de ajuste computacionais. Um aspecto importante na introdução de erros nos resultados de quantificação de sinais através da integração direta é o fato dessas integrações dependerem fortemente dos limites das frequências de ressonância dos picos, através dos quais as áreas são calculadas, levando a uma estimativa errônea da área do pico. Devido a estas limitações é quase imperativo o uso de métodos computacionais para o cálculo das áreas dos picos de metabólitos de interesse nas aplicações in vivo através de funções modelo. Um pré-requisito essencial para uma quantificação confiável de ressonâncias sobrepostas através de funções modelo, é a possibilidade de incluir conhecimento prévio do sistema [12].

Idealmente, o FID pode expressar-se como uma soma de senóides que decaem exponencialmente. Aplicando a transformada de Fourier a estes sinais no domínio temporal obtém-se o espectro de MRS consistindo da soma de linhas Lorentzianas complexas puras. É por isto que no modelo de ajuste da forma de linha nos espectros experimentais de MRS, as funções modelo são Lorentzianas. Tanto a parte real quanto a imaginária da linha complexa Lorentziana podem usar-se nos parâmetros de estimação, mas por simplicidade a função modelo $F_{calc}(\nu, P)$ expressa-se através da parte real da Lorentziana:

$$F_{calc}(\nu, P) = \sum_{i=1}^m \left[\frac{a_i^2 I_i}{a_i^2 + 4(\nu - \nu_i)^2 \cos \varphi_i} + \frac{2a_i I_i (\nu - \nu_i)}{a_i^2 + 4(\nu - \nu_i)^2} \sin \varphi_i \right], \quad (3.1)$$

onde a_i é a metade da largura de linha, I_i a amplitude, ν_i a frequência de ressonância e φ_i o ângulo de fase da linha i . m representa o número de linhas usado para construir o espectro e P denota o vetor de parâmetros estimados (p.ex. frequências, larguras de linha, intensidades, fases). Para levar em conta a possível contribuição da linha de base, o termo

$B(\nu)$, um polinômio comum, se adiciona à equação anterior:

$$B(\nu) = \sum_{p=1}^n c_p \nu^p. \quad (3.2)$$

Devido à inomogeneidade da amostra e aos artefatos introduzidos pelo equipamento, a forma de linha ideal dos sinais de MR se distorce, é por isso que precisam-se incorporar funções modelo adicionais como a Gaussiana para obter uma função modelo total que represente uma melhor aproximação dos dados experimentais:

$$F_{calc}(\nu, P) = \sum_{i=1}^m [w_L L_i(\nu) + w_G G_i(\nu)] + B(\nu), \quad (3.3)$$

onde L_i e G_i denotam as formas de linha Lorentziana e Gaussiana, respectivamente, w_L e w_G são os fatores de ponderação usados na mistura das formas de linha, e ν é a frequência de cada ponto nos dados [12].

PERCH e TLS

O TLS (do inglês, Total LineShape), é um programa incorporado no software PERCH NMR usado para a análise de dados de MRS in vivo no domínio da frequência. Permite estimar valores das frequências, intensidades, largura de pico e fase dos metabólitos de interesse através do uso de conhecimento prévio introduzido pelo usuário, sendo portanto, um método interativo de análise. O TLS foi desenhado para a análise de dados de espectroscopia de alta resolução, mas também pode ser aplicado na análise de MRS in vivo. Este programa usa como função modelo a forma de linha Lorentziana para cada ressonância individual com a possibilidade de detectar distorções na forma de linha individual dos sinais. A função modelo pode resumir-se como:

$$L(\nu, P) = \sum_{i=1}^S [w_1 L_i(\nu) + w_2 Dist_i] + B(\nu), \quad (3.4)$$

onde S é o número de linhas usado para modelar o espectro experimental. Os fatores w_1 e w_2 definem as respectivas contribuições da forma de linha Lorentziana $L_i(\nu)$ e o termo de distorção $Dist_i$ à função modelo. Estes fatores cumprem a relação $w_1 + w_2 = 1$, podendo os w_1 e w_2 ter valores negativos.

3.2 Análise no domínio temporal

A função modelo no domínio do tempo freqüentemente utilizada para representar o FID é a seguinte:

$$y_n = \hat{y}_n + e_n = \sum_{k=1}^K a_k \exp(j\phi_k) \exp[(-d_k + j2\pi f_k)t_n] + e_n; n = 0, 1, \dots, N - 1, \quad (3.5)$$

onde K representa o número de diferentes freqüências de ressonância e $j = (-1)^{1/2}$ é a unidade imaginária, a_k é a amplitude proporcional ao número de núcleos contribuintes à componente espectral com freqüência f_k , d_k é o fator de decaimento (ou damping), que fornece informação sobre a mobilidade ou o ambiente molecular do núcleo. $t_n = nt + t_0$, onde t é o intervalo de amostragem (sampling interval) e t_0 é o tempo do primeiro ponto da série temporal a ser incluído na análise. A quantidade $2\pi f_k t_0$ é conhecida como a fase de primeira ordem. A fase ϕ_k consiste do termo de fase de ordem zero e um fator adicional de fase k que representa os graus extra de liberdade que podem apresentar-se sob certas condições experimentais (quase sempre os ϕ_k são zero). Finalmente, e_n é um termo (complexo) de ruído branco gaussiano. O circunflexo no y indica que esta é a função modelo que estamos tentando ajustar aos dados medidos, representados por y sem o circunflexo.

Apesar de que os sinais individuais dos metabólitos podem ser representados por exponenciais amortecidas complexas, na prática dificilmente se consegue obter um campo magnético perfeitamente homogêneo através da amostra. Por isso, as formas de linha vêem-se afetadas dando como resultado desviações da função modelo ideal. Uma função modelo alternativa para o ajuste de dados de MRS in vivo é a Gaussiana:

$$y_n = \hat{y}_n + e_n = \sum_{k=1}^K a_k \exp(j\phi_k) \exp[(-g_k t_n + j2\pi f_k)t_n] + e_n; n = 0, 1, \dots, N-1, \quad (3.6)$$

onde g_k é o fator de decaimento gaussiano. Recentemente vem sendo usada a função modelo de Voigt, uma função que combina o modelo de Lorentz e Gauss:

$$y_n = \hat{y}_n + e_n = \sum_{k=1}^K a_k \exp(j\phi_k) \exp[(-d_k - g_k t_n + j2\pi f_k)t_n] + e_n; n = 0, 1, \dots, N-1. \quad (3.7)$$

Diversos trabalhos têm mostrado que a função Voigt permite obter resultados iguais ou melhores que aqueles obtidos através do ajuste com funções lorentzianas ou gaussianas individuais [11],[51].

3.3 LCModel

Um método automático de quantificação comumente usado é o LCModel. Este método é, diferentemente do AMARES (tratado na seção 3.4), não interativo ou "black-box". Ele usa uma base de dados de espectros *in vitro* para obter as concentrações dos metabólitos de interesse e seus respectivos desvios-padrão. Usando um espectro modelo completo no lugar de simples ressonâncias individuais, logra incorporar maior informação na análise. Ele permite obter tanto as concentrações absolutas dos metabólitos, quanto as razões relativas ao pico da creatina. Devido a que é um método totalmente automático (somente requer o FID *in vivo* e o sinal da água sem suprimir), evita erros provenientes da subjetividade introduzida pelo usuário, e maximiza a reprodutibilidade e comparação de resultados. O LCModel permite estimar as concentrações de metabólitos presentes em baixas quantidades com alta precisão, o que pode ser útil nos estudos fisiológicos e clínicos [52].

No LCModel, a parte real do espectro no domínio da frequência é contrastada com o espectro estimado calculado pelo software (veja Figura 17). O resíduo corresponde aos valores iniciais

no espectro menos os valores estimados. A linha de base é o suficientemente flexível para levar em conta uma variedade de complicações imprevisíveis, como por exemplo: artefatos nos dados, substâncias não presentes na base de dados que modela os espectros dos metabólitos, imprecisão na simulação devido a sinais variáveis dos lipídeos e macromoléculas ou uma supressão incompleta da água.

Para que a análise seja feita pelo software, é preciso o espectro com a supressão do sinal da água (raw file) e o arquivo separado do sinal da água sem suprimir. O software permite escolher a região do espectro a ser processada, assim como a correção de eddy-currents.

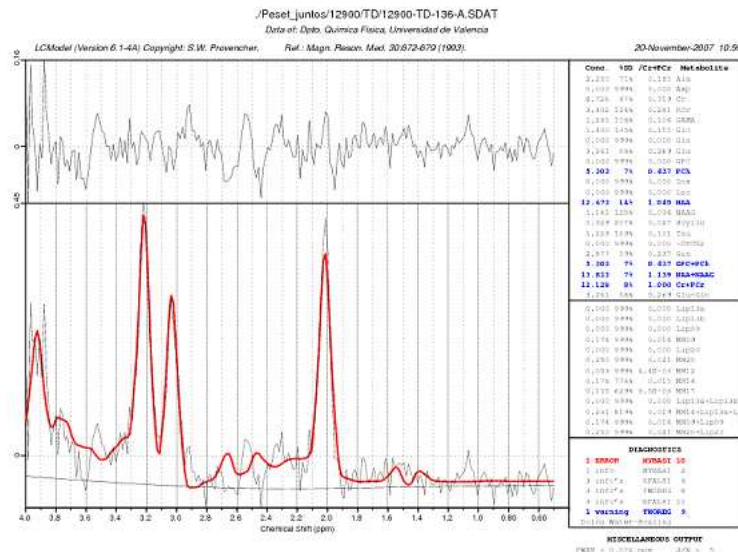


Figura 3.1: Exemplo de quantificação através do LCModel. A linha vermelha representa o espectro estimado, enquanto que o resíduo aparece na parte superior do espectro. Os metabólitos estatisticamente significativos aparecem na cor azul.

3.4 Método AMARES para quantificação

A função modelo no domínio do tempo mais comumente utilizada para o ajuste de dados de MRS contendo N pontos experimentais medidos y_n é uma soma de senóides que decaem

exponencialmente [53], e que resultam em formas de linha Lorentziana no espectro (domínio da frequência), dada pela equação 3.5.

Isso é feito minimizando o funcional

$$\begin{aligned} G(\mathbf{a}, \mathbf{d}, \mathbf{f}, \boldsymbol{\phi}, t_0) &= \sum_{n=0}^{N-1} \left| y_n - \sum_{k=0}^K a_k e^{j\phi_k} e^{(-d_k + j2\pi f_k)t_n} \right|^2 \\ &= \|\mathbf{y} - \Psi \mathbf{l}\|^2, \end{aligned} \quad (3.8)$$

onde $\mathbf{y} = [y_0, \dots, y_{N-1}]^T$ é o vetor com as amostras temporais do sinal, $\mathbf{l} = [a_1 e^{j\phi_1}, \dots, a_K e^{j\phi_K}]^T$, e $\mathbf{a}$, $\mathbf{d}$, $\mathbf{f}$, e $\boldsymbol{\phi}$ são os vetores das amplitudes, dampings, frequências e fases respectivamente. O índice superescrito T denota transposta, o símbolo $\|\cdot\|$ denota a norma euclideana, e

$$\Psi = \begin{bmatrix} e^{(-d_1 + j2\pi f_1)t_0} & \dots & e^{(-d_K + j2\pi f_K)t_0} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ e^{(-d_1 + j2\pi f_1)t_{N-1}} & \dots & e^{(-d_K + j2\pi f_K)t_{N-1}} \end{bmatrix} \quad (3.9)$$

é uma matriz $N \times K$ de característica completa (full rank).

O método AMARES minimiza o funcional dado pela Eq. 3.8, para ajustar os dados experimentais a uma função modelo levemente modificada em relação à Eq.3.5:

$$\begin{aligned} y_n &= \hat{y}_n + e_n = \sum_{k=1}^K a_k e^{j\phi_k} \exp(-b_k^2(1 - g + gt_n)t_n) \exp(j2\pi f_k)t_n + e_n, \\ n &= 0, 1, \dots, N-1. \end{aligned} \quad (3.10)$$

Ao contrário da função dada pela Eq. 3.5, que permite apenas formas de linha Lorentzianas para todos os picos, a função dada pela Eq. 3.10. permite escolher entre uma forma de linha

Lorentziana ($g_k = 0$) ou Gaussiana ($g_k = 1$) para cada pico do espectro separadamente, o que pode ser bastante vantajoso [53].

A escolha da função modelo para o ajuste dos dados é determinante para a obtenção de bons resultados. Devido a que os dados de MRS são adquiridos no domínio temporal, é natural processar esses dados diretamente nesse domínio. O mais antigo e ainda usado método de quantificação no domínio da frequência baseado na integração direta da área dos picos tem como principal desvantagem a baixa estimativa nas concentrações e a pouca precisão nos resultados. Essa precisão depende de um faseamento apropriado (o qual esta longe de ser um procedimento simples) e da escolha acertada da largura da área de integração; especialmente, vê-se afetada naqueles casos onde os picos não estão bem separados ou onde apresentam-se ressonâncias que distorcem a linha de base no domínio da frequência. Porém, métodos de ajuste no domínio da frequência baseados no modelamento dos picos através de funções senoidais ou exponenciais são totalmente equivalentes, desde um ponto de vista teórico, aos métodos de ajuste no domínio temporal, sempre e quando sejam usadas funções modelo tipo lorentzianas.

Caso outro tipo de funções modelo (Gauss ou Voigt) forem usadas, obter uma expressão analítica exata para a transformada de Fourier direta delas não é possível. Ainda que sempre seja possível calcular numericamente estas funções modelo no domínio da frequência tomando a DFT da função modelo no domínio temporal, isto requer um aumento no tempo de processamento computacional, que pode ser poupado usando o ajuste no domínio temporal diretamente.

Tem sido argumentado que a quantificação seletiva na frequência, por exemplo, na análise de certas regiões no espectro, é mais fácil no domínio da frequência. Porém, isto não é completamente certo, já que as extensões dos picos que não são incluídas na análise se sobrepõem com a região de interesse, o que precisa do modelamento das extensões desses picos com uma linha de base adicional, procedimento que complica o ajuste.

Em resumo, as funções matemáticas modelo dos dados de MRS têm uma forma mais simples

no domínio temporal e são mais eficientes para computar, mas a interpretação visual dos sinais medidos de MRS pode ser útil na hora de definir os valores iniciais para os métodos interativos nesse domínio.

Métodos e Aspectos Éticos da Pesquisa

Nesta seção serão apresentados os aspectos éticos da pesquisa envolvendo seres humanos, assim como todas as características dos grupos de pacientes e sujeitos controle estudados, os conceitos estatísticos aplicados no estudo classificatório e o detalhamento dos processos de pós-processamento e quantificação dos espectros de MRS in-vivo envolvidos neste projeto.

4.1 Aspectos Éticos da pesquisa envolvendo seres humanos

Os espectros analisados neste estudo in vivo, foram provenientes de uma base de dados do Laboratório de Neuroimagem (LNI, Hospital das Clínicas /UNICAMP). Esta base de dados foi criada para um estudo de doutorado em Medicina [2], cujo projeto já passou pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-Unicamp) em 2002 (Processo No 147-2002), sendo que todos os indivíduos participantes foram devidamente esclarecidos quanto às finalidades da pesquisa e assinaram o respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). É importante mencionar que o processo de aquisição de dados in vivo não envolveu riscos biológicos ou à saúde para os indivíduos participantes nele [54].

Nesse estudo anterior, os dados de MRS foram quantificados através de um método manual. No presente trabalho, apresentamos a re-quantificação destes mesmos dados através do método automático AMARES [53].

O presente estudo de quantificação automática de metabólitos do cérebro in vivo para classificação de tumores cerebrais foi aprovado pelo CEP-Unicamp. O projeto recebeu a identificação 0215.0.146.000-07 pelo SISNEP (Sistema Nacional de Informação sobre Ética em Pesquisa, <http://portal.saude.gov.br/sisnep/pesquisador/>) e protocolo No 289/2007 pelo CEP da Unicamp, e foi aprovado em reunião do CEP-Unicamp de 26/6/2007. Uma cópia da folha de aprovação encontra-se na seção de anexos.

4.1.1. Sujeitos

O exame de 1H MRS in vivo foi realizado em um total de 44 pacientes com idades entre 4 e 80 anos, 30 dos quais entraram no grupo de tumores comparados com o trabalho da Dra. Andreia Vasconcellos; e num total de 24 sujeitos controles, com idades entre 18 e 55 anos [2].

O diagnóstico de tumor do sistema nervoso central foi indicado pelo quadro clínico e exames de imagem (tomografia computadorizada e ressonância magnética) e, posteriormente, confirmado por análise histopatológica da peça cirúrgica ou do fragmento obtido por biópsia aberta [2]. Os tipos de tumores que foram estudados são: adenoma, astrocitoma pilocítico, astrocitoma anaplásico, ependimoma, glioblastoma, linfoma Hodgkin e não Hodgkin, meningioma, metástase, ganglioglioma, oligoastrocitoma e meduloblastoma.

A localização tumoral preponderante foi encefálica, na substância branca. Isto contribuiu para a homogeneidade dos grupos tumorais já que alterações metabólicas poderiam ter sido encontradas devido à composição celular particular de outras regiões. No entanto, isto não ocorreu nem mesmo nos casos particulares de tumores de fossa posterior, o que indica que os perfis metabólicos encontrados caracteriam muito mais o tecido tumoral que o possível tecido encefálico subjacente, mesmo nos tumores infiltrativos [2].

Os 30 pacientes com tumores foram divididos em 5 grupos de acordo ao tipo histológico. Na 4.1.1 estão incluídos tanto os grupos tumorais quanto o grupo controle que foi estudado e comparado.

Grupo	Tipo Histológico	Quantidade
I	Neurogliais alto grau	12
II	Neurogliais baixo grau	3
III	Não Neurogliais	7
IV	Astrocitoma Pilocítico	7
V	Metástase	1
VI	Controles	24

Tabela 4.1: *Grupos tumorais quanto e grupo controle que foi estudado.*

Porém, devido à sua baixa significância estatística, os grupos II e V, foram excluídos do estudo estatístico classificatório de tumores. As Figs. 5.1 - 5.4 e 5.8 - 5.16 mostram exemplos de espectros de cada um dos tipos de tumores quantificados. Todos os espectros dos pacientes não incluídos no estudo classificatório correspondente às patologias adenoma, linfoma Hodgkin e meduloblastoma, foram analisados individualmente de acordo às suas variações metabólicas.

4.2 Parâmetros da ^1H -MRS

Os dados da MRS foram adquiridos a 2.0 T usando uma head-coil implementada num scanner de ressonância magnética Elscint Prestige. A sequência de localização usada foi a PRESS com tempo de repetição $\text{TR} = 1500 \text{ ms}$, tempo ao eco $\text{TE} = 136 \text{ ms}$, largura espectral $\text{SW} = 1000 \text{ Hz}$ and 1024 pontos (amostras complexas).

Os voxels para os indivíduos controle foram localizados dentro da substância branca, o tálamo ou nas regiões temporais, enquanto que os voxels dos pacientes foram posicionados dentro do volume tumoral. O tamanho de todos os voxels foi de $2 \times 2 \times 2 \text{ cm}^3$.

Foram seguidos todos os procedimentos padrões usados em estudos de MRS em cada um dos espectros adquiridos, tais como shimming automático, filtrado do sinal da água através do pulso CHESSE e compensação de eddy-currents. Além disso, foram adquiridas imagens de MR

ponderadas em T_1 nos planos axial, sagital e coronal, com a finalidade de visualizar a área afetada do cérebro.

4.3 Pós-processamento e quantificação dos sinais de metabólitos

4.3.1. Pós-processamento

O protocolo de MRS usado especificava 200 aquisições ou nex (número de excitações para a obtenção dos espectros). Na prática, porém, devido ao decréscimo do SNR com o tempo do sinal mostrado no display do console do scanner, as aquisições foram interrompidas pelos técnicos em qualquer momento, fazendo com que a nossa base de dados não tenha uniformidade neste aspecto.

A variabilidade dos nex vai de 23 - 200 nex. Este truncamento nas aquisições dos sinais de ressonância magnética não é conveniente para o processo de quantificação de metabólitos, já que se perde informação que pode ser relevante para obter as concentrações de ditos metabólitos. Sugere-se portanto, que estas interrupções não devem ocorrer em futuros estudos.

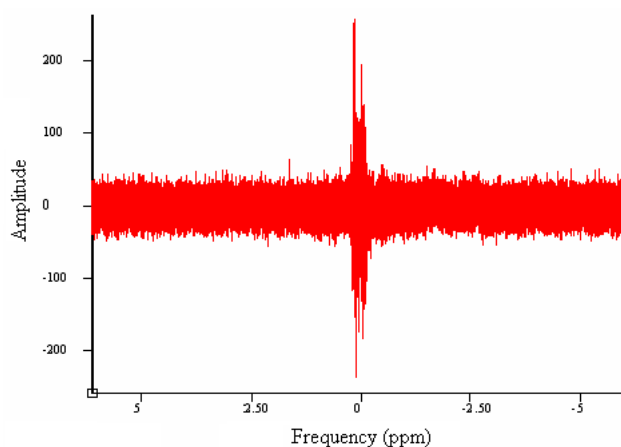


Figura 4.1: *Exemplo das aquisições de um indivíduo controle com 200 nex (superpostas).*

Na Figura 4.1 encontra-se um exemplo das aquisições de um indivíduo controle com 200

nex (superpostas). Estas aquisições são agrupadas e somadas a cada 40 nex para obter os espectros que serão usados no processo de pós-processamento. Um exemplo deste resultado da agrupação dos sinais encontra-se na Figura 4.2.

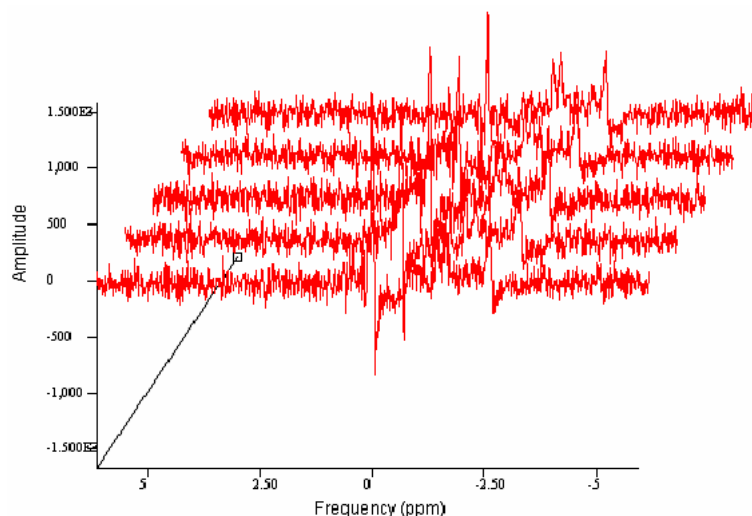


Figura 4.2: Agrupação das aquisições com 200 nex.

Depois de que se tem estes espectros, procede-se ao alinhamento automático (frequency shift - align automatically) deles. Esta etapa é importante, já que em nosso caso, há um pequeno drift de frequência variável no scanner que pode ser corrigido através deste procedimento permitindo obter um espectro com maior SNR. Após o alinhamento somam-se os espectros para obter um único espectro [55]. Veja Figura 4.3.

Este espectro ainda tem que ser faseado, isto é a sua fase deve ser corrigida (hard-phase). Este hard-phase se faz usando um espectro de referência adquirido sem supressão do sinal da água. Um exemplo de espectro de referência da água encontra-se na Figura 4.3.

Após o faseamento usando o sinal da água como referência o espectro fica tal como se vê na Figura 4.4. Nela, é possível observar tanto o pico proeminente da água quanto os picos menores dos metabólitos. Devido a esta marcada diferença nas amplitudes destes picos, o da água e os metabólitos, é preciso fazer a filtragem do sinal residual da água. Este procedimento, pode ser pulado, já que o software permite a quantificação dos metabólitos, mesmo estando presente o sinal da água. No entanto, a filtragem dos resíduos é recomendável, já que

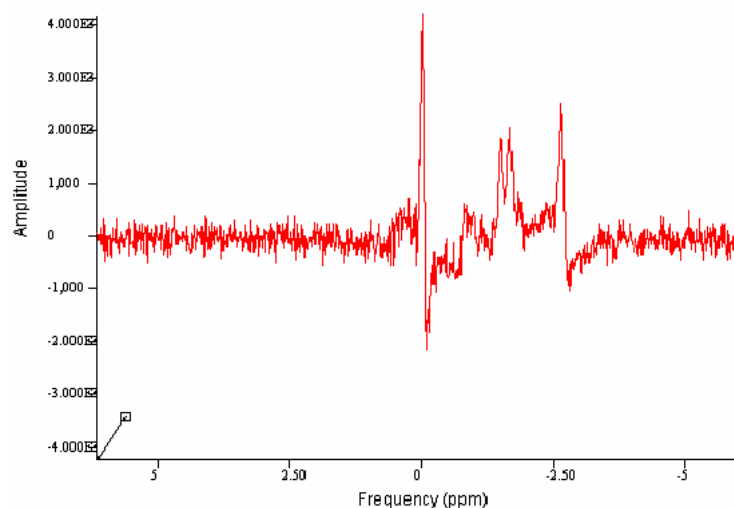


Figura 4.3: *Espectro obtido após ao alinhamento e soma.*

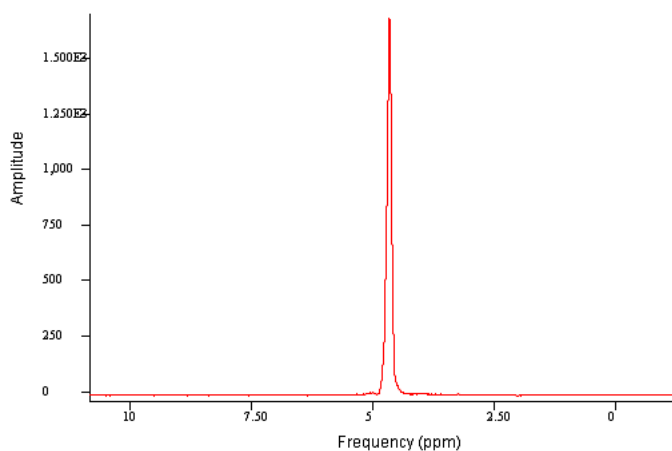


Figura 4.4: *Espectro de referência da água.*

estes sinais residuais da água podem alterar bastante a linha de base, introduzindo erros na posterior quantificação [55]. Por tanto neste estudo, foram filtrados todos os sinais residuais da água, tanto no grupo controle quanto no grupo de tumores.

A filtragem do sinal da água é realizada no jMRUI através da aplicação do filtro de Hankel Lanczos singular Values Decomposition Filter (HLSVD), já que este filtro permite suprimir certas componentes de um sinal no domínio temporal. Para isto, é preciso escolher um intervalo de frequências próximas à frequência central da água, neste caso, o intervalo médio de

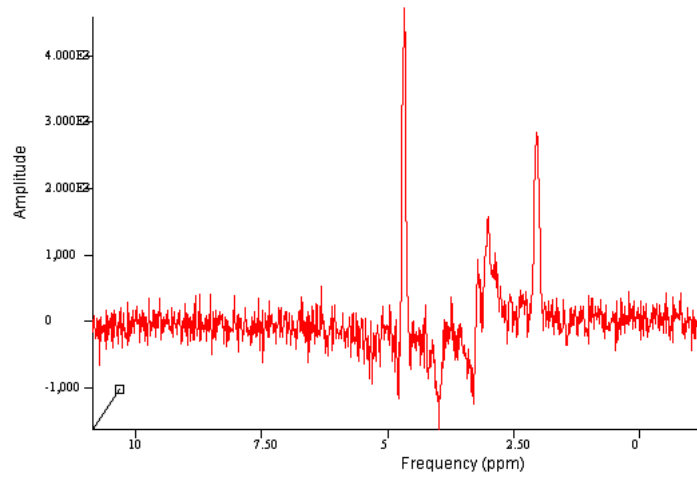


Figura 4.5: *Espectro da água e metabólitos de interesse.*

freqüências foi de $4,68 \pm 0,8$ ppm. Na figura 4.6, encontra-se uma ilustração da filtragem do sinal residual da água do espectro de MRS de um indivíduo controle.

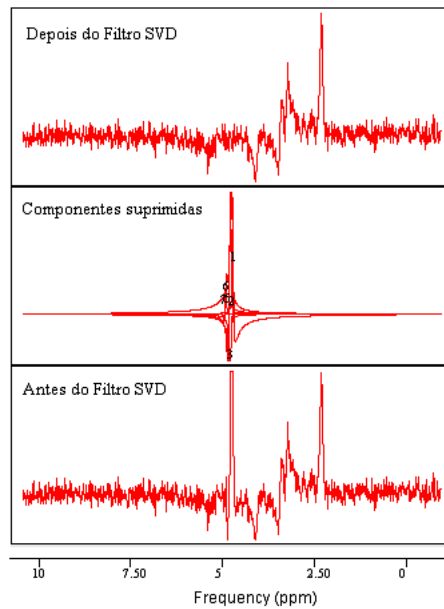


Figura 4.6: *Filtragem do sinal residual da água do espectro de MRS.*

Devido a que o sinal da água foi filtrado, deve-se escolher uma freqüência de referência interna. No caso dos espectros provenientes de indivíduos controle, escolhe-se o pico do N-acetilaspártato (NAA), centrado em 2.02 ppm, já que é o metabólito com maior amplitude

detectado no espectro, sempre é detectado e sua variabilidade é pouca em tecido normal. No caso dos espectros provenientes de indivíduos portadores de tumores, escolhe-se em geral, o pico da creatina (Cre) centrado em 3.01 ppm. Porém, este metabólito vê-se diminuído em amplitude em tumores tais como metástase e glioblastomas, onde praticamente predominam os sinais do lactato e lipídeos.

Além do pós-processamento mencionado anteriormente (faseamento e filtragem do sinal residual da água), não foi usado nenhum outro procedimento como truncamento de pontos ou apodização nos espectros. A finalidade disto é que quanto menor seja a manipulação dos dados espectrais no domínio temporal, maior será a quantidade de informação que se mantenha inalterada no processamento e quantificação dos espectros.

4.3.2. Quantificação

No processo de quantificação foi usado o método de quantificação no domínio temporal AMARES [53], implementado no software jMRUI [1] e descrito no capítulo anterior. Para fazer a quantificação de metabólitos no AMARES, é possível fazer uso de conhecimento prévio. Foram incluídos os intervalos de frequência dos 6 metabólitos citados na seção 2.4 e usados como marcadores no processo classificatório de tumores. O intervalo de largura dos picos foi escolhido entre 2-8 Hz e a fase relativa do Lactato (Lac) foi fixada em 180 graus. As formas de linha escolhidas para todos os metabólitos foram Lorentzianas. As fases dos outros metabólitos, assim como suas amplitudes, foram estimadas pelo software. Na Tabela 4.3.2 encontram-se os intervalos de frequência para cada metabólito [6],[19].

Após a inclusão dos intervalos de frequência, de largura de pico e da fase do lactato, o AMARES calcula as amplitudes dos metabólitos de interesse, reportando também os desvios padrão em cada caso. Para isso, o software faz o faseamento do espectro, detecta os sinais proeminentes achados nos intervalos de frequências especificados no conhecimento prévio e calcula o espectro estimado somente incluindo esses sinais procurados. Os sinais de ruído são subtraídos do espectro original e reportados como o resíduo. Na figura 4.7, encontra-se o

Metabólito	Abreviatura	Intervalo de frequência (ppm)
Lípido	Lip	0.85-1.0
Lactato-Alanina-Lípidos	Lac-Lip	1.15-1.55
N-acetilaspártato	NAA	1.98-2.08
Glutamina-Glutamato	Glx	2.31-2.6
Glutamina-Glutamato	Glx_2	3.65-3.75
Creatina	Cre	2.98-3.08
Creatina	Cre_2	3.83-3.93
Colina	Cho	3.16-3.26
Myo-inositol	mIno	3.36 -3.61

Tabela 4.2: *Intervalos de frequência para cada metabólito quantificado através do AMARES.*

exemplo dos passos seguidos numa quantificação de metabólitos através do método AMARES [53].

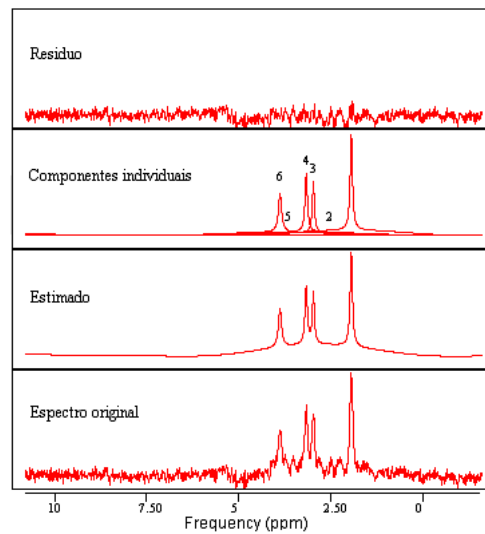


Figura 4.7: *Exemplo de quantificação de metabólitos através do método AMARES do espectro de um sujeito controle.*

Os resultados da quantificação automática e manual de metabólitos, incluindo os valores médios das amplitudes e desvios padrão para cada grupo de tumores e o grupo controle

encontram-se na Tabela 5.2.1 e na Tabela 5.2.1. Na análise classificatória de tumores foram usadas as amplitudes relativas de cada metabólito. Estas são obtidas dividindo a amplitude calculada para dito metabólito pela soma total das amplitudes de todos os metabólitos.

4.4 Análise Estatística

A análise estatística da significância das amplitudes relativas dos principais metabólitos (NAA, Creatina, Colina, Lactato, Lipídeos e Myo-inositol) em cada um dos grupos foi realizada usando o teste de Análises de Variância de única variável (ANOVA) [56].

A Análise Discriminatória Linear (LDA, do inglês Linear Discriminant Analysis) foi usado para obter as porcentagens de acerto na classificação dos grupos. Os grupos tumorais incluídos na análise discriminatória foram aqueles com maior significância estatística, ou seja, os tumores neurogliais de alto grau (Glioblastomas, 13 casos), não neurogliais (meningeomas, 9 casos) e astrocitoma pilocítico (7 casos). Os outros grupos de tumores, neurogliais de baixo grau (Astrocitoma anaplásico, 3 casos) e metástase (4 casos) foram analisados comparando-os aos controles através da média de seus valores de amplitude de cada metabólito [57],[58],[59].

Tanto os testes ANOVA, quanto o LDA foram realizados no software Systat 12.0 [60].

4.4.1. Análise Discriminatório Linear (LDA)

A análise discriminatória, LDA (do inglês Linear Discriminant Analysis) é usada para classificar casos entre os valores de uma dependência categórica [57],[58],[59],[61]. Há diversos usos do LDA, entre eles:

- Classificar casos em grupos usando equações de predição discriminatória.
- Testar uma teoria pela observação da classificação dos casos preditos corretamente.

- Investigar diferenças entre grupos.
- Determinar a porcentagem de variância nas variáveis dependentes explicadas pelas variáveis independentes.
- Avaliar a importância relativa das variáveis independentes na classificação de variáveis dependentes.
- Desconsiderar variáveis que estejam fracamente relacionadas na discriminação dos grupos.
- Interpretar os resultados do análise discriminatório entre grupos através dos gráficos (ou loading plots).

A análise discriminatória tem duas etapas:

1. O teste-F é usado para saber se o modelo discriminatório como um todo é significativo.
2. Se o teste-F mostra significância, então as variáveis individuais independentes são revisadas para saber qual delas difere significativamente em valor médio por grupo e essas são usadas para classificar as variáveis dependentes.

A análise discriminatória é uma alternativa anterior à regressão logística, a qual é atualmente mais usada do que o LDA já que ela requer um mínimo de suposições (as variáveis independentes não precisam estar distribuídas normalmente, nem relacionadas linearmente nem ter a mesma variância entre grupos), é um procedimento robusto, manipula variáveis categóricas e contínuas e tem coeficientes de interpretação mais simples.

A regressão logística também é preferida ao LDA quando o tamanho dos grupos é muito irregular. Porém, o LDA é preferido quando os supostos da regressão linear são atingidos, já que o LDA tem maior poder estatístico que a regressão lógica (menor é o risco de obter erro de aceitar uma falsa hipótese nula é menor).

A seguir, serão descritos brevemente alguns conceitos chaves do análise discriminatório linear [57],[58],[59],[61]:

- Variáveis discriminantes: são variáveis independentes também conhecidas como preditores. Neste projeto estas variáveis correspondem aos valores das amplitudes relativas dos metabólitos quantificados.
- Variável de grupo: esta é a variável dependente, neste caso representou os 3 grupos de tumores e o grupo controle.
- Função discriminante: Uma função discriminante, também conhecida como raiz canônica, é uma variável criada como a combinação linear das variáveis discriminantes (independentes), tal que $L = b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_nx_n + c$, onde os b 's são os coeficientes discriminantes, os x 's as variáveis discriminantes e c é uma constante.
- Número de funções discriminantes: para uma análise discriminante de dois grupos há uma função discriminante, mas para ordens maiores de LDA, o número de funções é o menor entre o $g - 1$ (onde g é o número de categorias na variável de grupo) ou o p (o número de variáveis independentes). Cada função discriminante é ortogonal às outras.
- Valor Próprio: também chamado de raiz característica de cada função discriminante, reflete a importância das dimensões que classificam os casos das variáveis dependentes. Há um valor próprio por cada função discriminante. A razão dos valores próprios indica o poder discriminante relativo das funções discriminantes. Se a razão de dois valores próprios é 1.4, por exemplo, então a primeira função discriminante conta em 40 % a mais do que a segunda na variância entre grupos nas variáveis dependentes.
- A porcentagem relativa de uma função discriminante é igual ao valor próprio da função dividido pela soma de todos os valores próprios de todas as funções discriminantes no modelo. Assim, a porcentagem relativa é o poder discriminante para o modelo associado com uma função discriminante dada.

- O coeficiente de correlação canônica, R , é uma medida da associação entre os grupos formados pelas funções dependentes e discriminantes. Quando R é zero, não há correlação entre os grupos e a função. Quando é um valor grande, há uma alta correlação entre as funções discriminantes e os grupos. Um valor de $R = 1,0$, indica que toda a variabilidade nos valores discriminantes pode contar para essa dimensão.
- Valor discriminante: é o valor resultante da aplicação da formula de uma função discriminante aos dados para um caso particular.
- Coeficientes padrão discriminantes: também chamados, coeficientes canônicos padrão discriminantes, são usados para comparar a relativa importância das variáveis independentes. A adição ou subtração de variáveis no modelo pode mudar marcadamente os coeficientes discriminantes. Em LDA, haverá tantos coeficientes como número de funções discriminantes.
- A análise discriminante de dois grupos tem centróides, um para cada grupo. Espera-se que as médias das funções discriminantes estejam bem separados, para mostrar que efetivamente a função discriminante está separando-os. Quanto mais próximas as médias
- Gráficos das funções discriminantes, ou gráficos canônicos: os eixos são funções discriminantes, e círculos dentro do gráfico localizados nos centróides representam cada categoria sendo classificada.

4.4.2. Análise de Variância de única variável (ANOVA)

A análise de variância (ANOVA do inglês, Analysis of variance) é usada para obter os efeitos principais e de interação de variáveis independentes categóricas (chamadas 'fatores') sobre um intervalo de variáveis dependentes. Um efeito principal é o efeito direto de uma variável independente sobre outra dependente. Um efeito de interação é o efeito conjunto de duas ou mais variáveis independentes sobre a dependente [57],[58],[59],[61].

O ponto chave da estatística em ANOVA é o Teste-F da diferença das médias dos grupos, testando se as médias dos grupos formados por valores da variável independente (ou combinações de valores de múltiplas variáveis independentes) são o diferentes suficiente como para não ter ocorrido por acaso.

Se as médias não diferirem significativamente, se infere que a(s) variável (eis) não tem nenhum efeito sobre a variável dependente. Após determinada a correlação entre as variáveis, determina-se quais das variáveis independentes são as que mais contribuem no estabelecimento dessa correlação. Parecida com a regressão, a ANOVA é um procedimento paramétrico no qual se assume que a variável dependente tem uma distribuição normal para cada categoria das variáveis independentes.

A ANOVA testa as diferenças nos valores as médias dos grupos ou variáveis analisado a variância (Veja Equação 4.1 que define a variância), isto é, partindo a variância total na componente que se deve ao erro aleatório e as componentes que são devidas às diferenças entre os valores médios. Estas últimas componentes da variância são testadas para conhecer a sua significância estatística, e se houver dita significância, é rejeitada a hipótese nula de que não há diferenças entre os valores médios, aceitando assim a hipótese alternativa de que ditos valores médios permitem distinção entre grupos ou variáveis já que são diferentes.

$$S = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \quad (4.1)$$

onde N é o número total de , x_i é , S é a variância e $\bar{x}$ é a média.

Resultados e Discussão

Nesta seção serão apresentados os resultados do estudo classificatório de tumores cerebrais tanto pelo método automático quanto pelo método manual, as principais características de cada grupo de tumores assim como dos seus espectros de MRS in-vivo, e os valores das amplitudes relativas dos metabólitos analisados para ambos os métodos de quantificação. Além disso, espectros dos tipos de tumores não incluídos no estudo classificatório também serão apresentados. Também serão apresentadas uma análise e discussão detalhadas dos principais achados neste estudo, incluindo reflexões críticas sobre a utilidade da técnica e suas limitações como ferramenta complementar ao diagnóstico clínico de tumores cerebrais.

5.1 Grupo de Pacientes incluídos no estudo classificatório

5.1.1. Grupo I: Tumores Neurogliais de Alto Grau

Os tumores neurogliais de alto grau incluídos neste estudo foram glioblastomas, astrocitomas anaplásicos e oligoastrocitomas anaplásicos. São tumores anaplásicos de crescimento rápido que tem tendência a invadir tecido adjacente [63]. Eles se caracterizam por extensas áreas de necroses e hipóxia e geralmente reaparecem após a extração cirúrgica. O glioblastoma, também conhecido como glioblastoma multiforme, gera-se a partir de um astrocitoma difuso

ou de um astrocitoma anaplásico. Os glioblastomas são os tumores cerebrais mais frequentes representando entre o 12 - 15 % dos tumores cerebrais e entre 50 - 60 % de todos os tumores astrocíticos [2],[62]. Encontram-se entre as neoplasias humanas mais agressivas, com uma sobrevida média do paciente inferior a um ano.

Neste estudo, 12 indivíduos eram portadores desta patologia. O espectro de ^1H -MRS deste grupo é caracterizado principalmente por decréscimo na amplitude do pico do NAA e da Creatina e pela presença de um proeminente sinal dos picos do Lactato e Lipídeos, tal como se encontra na Figura 5.1. A quantificação de metabólitos com o método automático permitiu classificar corretamente 78 % dos casos pelo método automático e 75 % pelo método manual (veja Tabela 5.2.1).

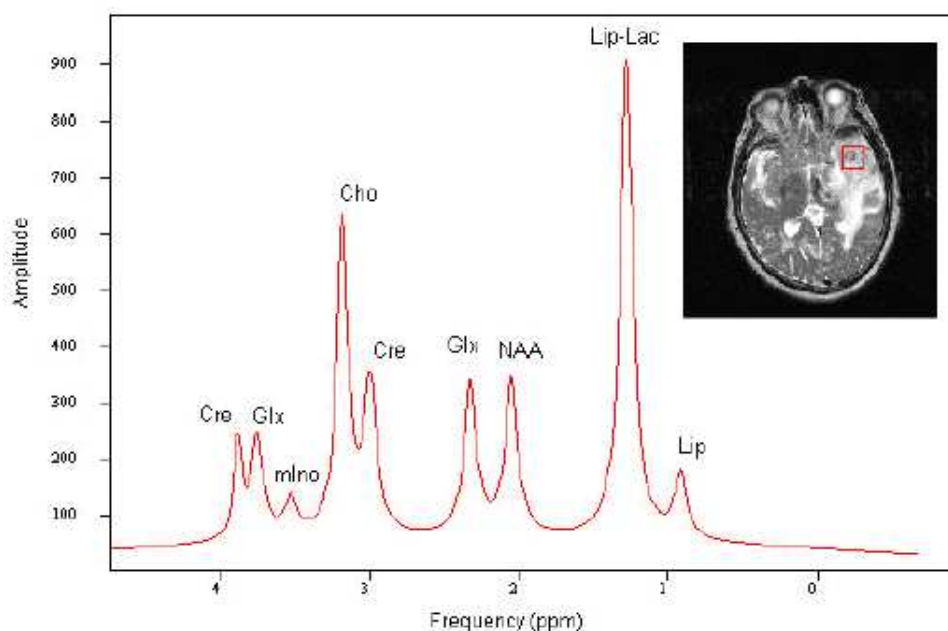


Figura 5.1: Espectro ^1H -MRS de um paciente portador de um tumor neuroglial de alto grau (glioblastoma).

Devido às extensas áreas de necrose e à indiferenciação celular, os metabólitos marcadores de tecido cerebral normal geralmente apresentam níveis reduzidos nestes tumores [64],[65],[66]. Lactato e Lipídeos são metabólitos comumente encontrados. Estes dois metabólitos estão estreitamente ligados ao diagnóstico de tumores altamente agressivos, entretanto, não pode-

se tomar esta afirmação como uma generalidade.

A justificativa do aumento de lactato com o grau tumoral estaria relacionada a que o aumento da atividade metabólica deslocaria o metabolismo celular à via anaeróbica, provocando o acúmulo deste metabólito. Porém, a variabilidade nas quantidades de lactato nos diferentes tipos de tumores poderia dever-se à incapacidade de drenagem do mesmo e seu acúmulo em áreas císticas de baixa irrigabilidade sanguínea [2],[30]. Aliás, encontram-se na literatura estudos onde é reportada a presença de lactato em tumores de baixa agressividade e em lesões não neoplásicas [10],[67],[68].

A presença de lipídeos no tecido cerebral sugere uma a degradação da membrana celular, característica de processos necróticos [26].

Ainda que a detecção de altos níveis de Lactato e Lipídeos seja relevante na classificação de tumores neuroglicais de alto grau, tem-se reportado a dificuldade da sua classificação automática, principalmente ao tentar diferenciá-los das metástases, que apresentam um espectro semelhante, como exemplificado nas Figuras 5.1 e 5.9 [73],[74],[75]. Uma possibilidade é agrupar estes dois tipos tumorais num novo grupo denominado GLIO-MET (Glioblastoma-Metástase). Apesar de histologicamente diferentes, esta similaridade espectral pode ser explicada pelo seu comportamento evolutivo marcado pela agressividade e infiltração tecidual adjacente, o que suporta classificá-los em um mesmo grupo [70],[71],[72].

Neste estudo, foi possível ver o decréscimo paulatino com o grau tumoral das quantidades de lactato e lipídeos nos grupos tumorais e a não detecção deles no tecido de sujeitos normais. Em tumores gliais de alto grau e tumores não neuroglicais foi detectada o dobro da quantidade de lactato e lipídeos que no grupo tumoral de menor agressividade, o astrocitoma pilocítico.

Múltiplos estudos têm analisado a capacidade da MRS in-vivo para distinguir entre diferentes graus tumorais em astrocitomas e tem proposto o NAA a Cretina e a Colina como marcadores metabólicos [76],[77],[78]. Tem-se afirmado que há uma correlação direta entre a concentração do pico da Colina e o grau tumoral em tumores astrocíticos. No entanto, este incremento linear com o grau não tem sido reproduzível em todos os estudos [16].

Geralmente, os níveis de Colina em astrocitomas anaplásicos (tumores de grau III) é maior do que em astrocitomas de baixo grau (tumores de grau I ou II) [16]. Ao contrário, encontrou-se em alguns casos que os níveis de Colina em glioblastomas (tumores de grau IV, de maior agressividade) estão reduzidos ao compará-los com o astrocitoma anaplásico, isto talvez devido à localização do voxel predominantemente em áreas necróticas mais do que em áreas celulares proliferativas.

Outro metabólito de importância na classificação de tumores é o Myo-inositol [29], [30], [65], [80]. Observou-se um decréscimo do Myo-inositol com relação ao grau tumoral [79], fato corroborado neste estudo, onde, os tumores neuroglicais de alto grau possuíam maior quantidade deste metabólito respeito aos outros dois grupos de menor grau de agressividade, e conseqüentemente, do grupo controle onde é quase imensurável o Myo-inositol.

5.1.2. Grupop III: Tumores não Neuroglicais

Os Meningeomas ou tumores não neuroglicais são os tumores cerebrais benignos mais comuns (95 % dos tumores benignos). Porém, eles podem ser malignos também [81], [82], [83]. Os meningeomas surgem das células cap-aracnoidais das meninges e representam aproximadamente o 15 % de todos os tumores cerebrais primários. Eles são mais comuns em mulheres do que em homens (2:1) e as idades de maior incidência são entre os 60 - 70 anos [2], [16], [62]. Neste estudo, 7 dos pacientes eram portadores de meningeomas. A característica principal no espectro destes pacientes foi o proeminente sinal da Colina (veja Figura 5.2). Sinais do NAA e mIno deveriam não ser detectados nesta patologia, mas detecto-se dobrada a presença do grupo Glx e da Cre. 70 % dos casos foram classificados corretamente pelo método automático e 55 % pelo método manual (veja Tabela 5.2.1).

Os meningeomas, constituem um grupo de tumores que têm características metabólicas específicas. A seguir serão resumidas algumas das explicações fisiológicas que as respaldam [30], [62].

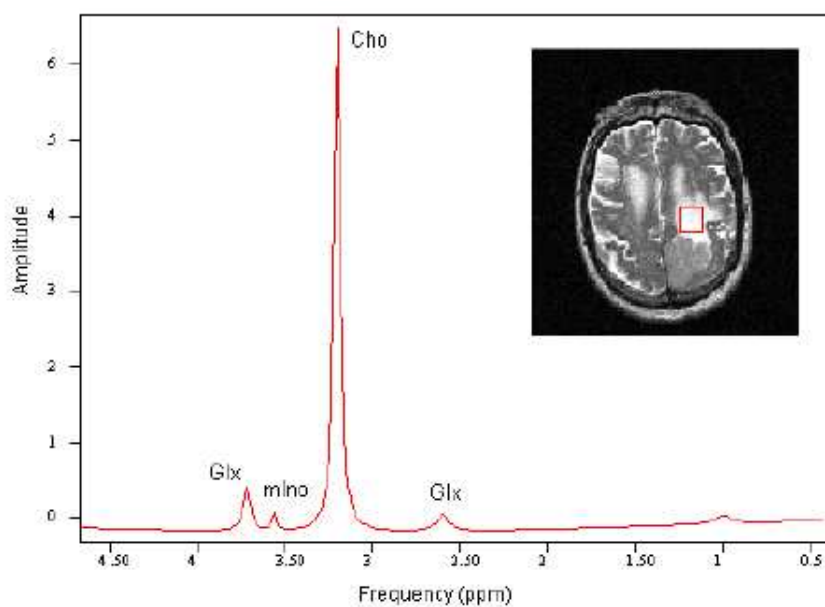


Figura 5.2: Espectro ^1H -MRS de um paciente portador de um tumor não neuroglial (meningioma).

Teoricamente, devido a que os meningiomas se originam fora do parênquima neuronal, não deveriam conter o metabólito N-acetilaspartato (NAA), considerado marcador de células neuronais. Porém na prática clínica é frequente observar esta ressonância nos espectros de MRS in-vivo [84]. Similarmente o mIno encontra-se ausente em tumores não gliais. Porém, neste estudo foram quantificadas pequenas quantidades deste metabólito. Diversos argumentos tentam explicar este fato generalizado, entre eles a possível contaminação de tecido não meningeo no voxel de aquisição, mas ainda não é claro o por que da presença do NAA em meningiomas.

Além do proeminente aumento na Colina, o aumento do grupo Glx também tem-se detectado em extrato de meningiomas, achado útil para diferenciar entre meningiomas e astrocitomas [30],[85],[86]. Neste estudo, esse aumento é corroborado nas duas ressonâncias quantificadas desse metabólito.

5.1.3. Grupo IV: Astrocitoma Pilocítico

O astrocitoma pilocítico é um tumor completamente circunscrito, de crescimento lento, usualmente cístico que se manifesta principalmente em crianças e adultos jovens. Este tumor é o glioma mais comum em crianças e representa 10 % dos tumores astrocíticos cerebrais e 85 % dos cerebelares [62]. O grupo dos Astrocitomas Pilocíticos estava constituído por 7 pacientes neste estudo.

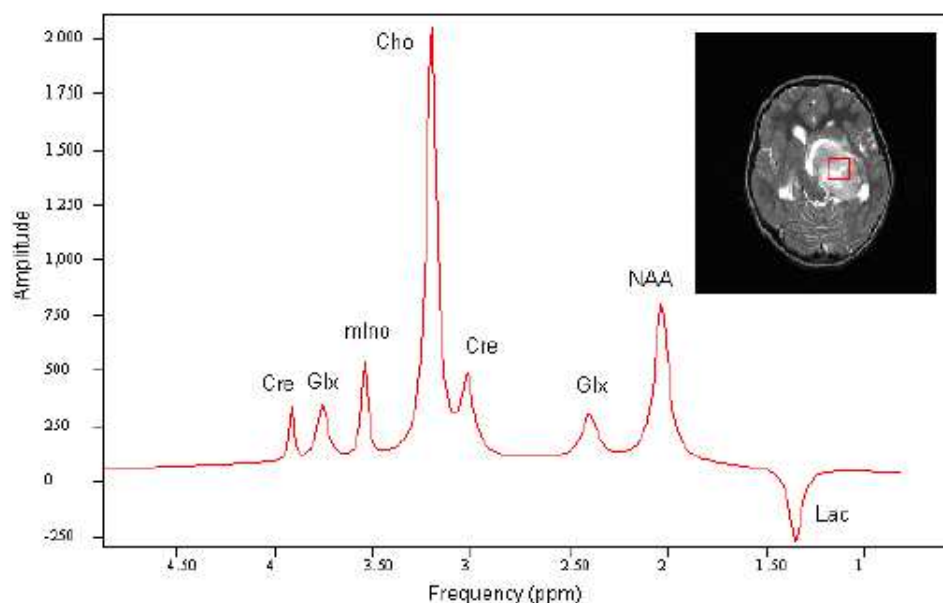


Figura 5.3: Espectro ^1H -MRS de um paciente portador de um tumor astrocitoma pilocítico.

As concentrações de NAA e Cre são maiores neste grupo comparado aos outros grupos tumorais. Foram detectáveis os sinais de LAs e Lip, por em, em quantidades menores do que nos outros grupos de tumores (Veja Figura 5.3). Para este grupo a análise discriminatória classificou corretamente 98 % dos casos pelo método automático e 56 % pelo método manual (Veja Tabela 5.2.1) [87].

5.1.4. Grupo Controle (Grupo VI)

O grupo controle caracteriza o grupo dos indivíduos que não são portadores de nenhuma neuropatologia. O espectro deste grupo é altamente homogêneo entre os diferentes indivíduos, apresentado unicamente sinais de NAA, Creatina e Colina. O grupo controle foi o único grupo totalmente discriminado, obtendo-se 100 % de classificação correta com ambos os métodos. Um exemplo do espectro de ^1H -MRS de um indivíduo controle, encontra-se na Figura 5.4 [88].

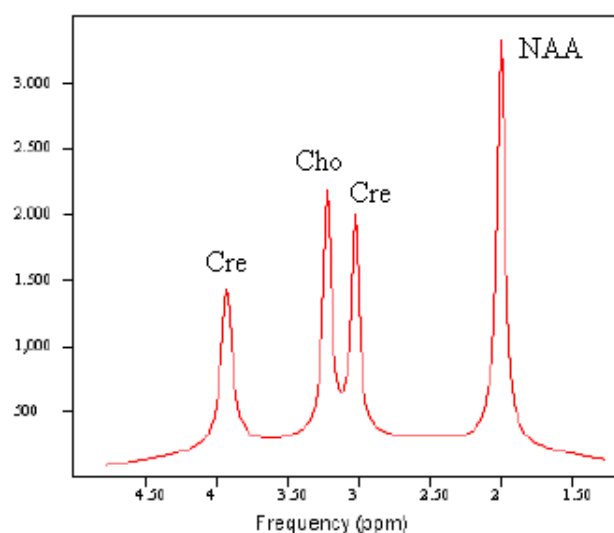


Figura 5.4: *Espectro ^1H -MRS de um indivíduo controle.*

5.2 Classificação dos Grupos Tumoriais

5.2.1. Concentrações dos metabólitos por grupo

Nas Tabelas 5.2.1 e 5.2.1 encontram-se os valores médios calculados para cada metabólito, seus respectivos desvios padrão tanto para o método automático AMARES quanto para o método manual.

Metabólitos	Neurogliais de Alto Grau	Não Neurogliais	Astrocitoma Pilocítico	Controles
Lip	0,222 ± 0,313	0,276 ± 0,631	0,177 ± 0,245	0
Lac	0,358 ± 0,405	0,335 ± 0,612	0,260 ± 0,270	0
NAA	0,175 ± 0,143	0,085 ± 0,118	0,211 ± 0,206	0,412 ± 0,122
Glx	0,098 ± 0,064	0,093 ± 0,089	0,100 ± 0,073	0,062 ± 0,032
Cre	0,187 ± 0,075	0,106 ± 0,107	0,223 ± 0,111	0,266 ± 0,045
Cho	0,425 ± 0,200	0,539 ± 0,315	0,398 ± 0,168	0,265 ± 0,084
mIno	0,048 ± 0,080	0,043 ± 0,043	0,038 ± 0,057	0,012 ± 0,014
<i>Glx</i> ₂	0,080 ± 0,053	0,089 ± 0,064	0,084 ± 0,070	0,040 ± 0,035
<i>Cre</i> ₂	0,0131 ± 0,083	0,063 ± 0,072	0,061 ± 0,082	0,173 ± 0,099

Tabela 5.1: *Valores médios e desvio padrão dos metabólitos quantificados no AMARES.*

Diferentemente do método automático que permitiu quantificar 9 metabólitos, o método manual detectou somente 6 deles, mostrando isto uma das vantagens no uso da quantificação automática dos espectros de MRS in-vivo. A manipulação mínima dos sinais foi o ponto chave neste caso, já que o método manual utilizou o procedimento de apodização que faz com que muitos dos sinais de baixa intensidade (como o caso do grupo Glx) se superponham aos de metabólitos próximos detectáveis mais facilmente.

Metabólitos	Neurogliais de Alto Grau	Não Neurogliais	Astrocitoma Pilocítico	Controles
Lip	0,133 ± 0,262	0	0	0
Lac	0,079 ± 0,109	0,056 ± 0,072	0,150 ± 0,185	0
NAA	0,072 ± 0,073	0,101 ± 0,105	0,190 ± 0,111	0,282 ± 0,117
Cre	0,114 ± 0,070	0,154 ± 0,143	0,114 ± 0,094	0,251 ± 0,173
Cho	0,427 ± 0,192	0,580 ± 0,269	0,401 ± 0,178	0,242 ± 0,107

Tabela 5.2: *Valores médios e desvio padrão dos metabólitos quantificados no Método Manual.*

As Tabelas 5.2.1 e 5.2.1 ressumem os resultados da análise discriminatório linear (LDA) tipo

leave-one-out que foi aplicada a cada um dos grupos tumorais. Como seu nome o indica, neste procedimento, se realiza a LDA e se obtém as porcentagens de acerto para todo o conjunto de dados excluindo um de cada vez. A análise atua como um procedimento de validação dos dados, já que o conjunto de dados que se mantém serve como conjunto de treinamento enquanto que os dados do paciente que se retiram do grupo seria o conjunto de validação.

Grupo Tumoral	N	Método AMARES	Método Manual
I-Neurogliais de Alto Grau	12	78 %	75 %
III-Não Neurogliais	7	70 %	55 %
IV-Astrocitoma Pilocítico	7	98 %	56 %

Tabela 5.3: *Porcentagens de classificação correta obtidas através da LDA entre os diferentes grupos de tumores no Método Manual e automático AMARES testadas através do método Leave-one-out.*

Os resultados indicaram, de acordo ao esperado, uma melhoria na classificação de tumores vinda da quantificação com o método automático AMARES. Aliás, corroborou a também esperada diferenciação entre tecido normal e tecido tumoral, testada através da unificação dos dados dos tumores versus o conjunto de dados dos sujeitos normais.

Grupo	N	Método AMARES	Método Manual
Tumores	26	92 %	92 %
Controles	24	100 %	100 %

Tabela 5.4: *Porcentagens de classificação correta através da LDA para diferenciar entre o grupo de controles e o de tumores quantificados com o Método Manual e automático AMARES testadas através do método Leave-one-out.*

A Figura 5.5 mostra as distribuições discriminantes dos grupos de tumores por ambos os métodos. Os fatores 1 e 2 nos gráficos correspondem às funções discriminantes, resultantes da combinação linear das concentrações dos metabólitos analisados (Veja Seção 4.4.1).

Como pode-se ver o método automático teve melhores resultados apresentando menor varia-

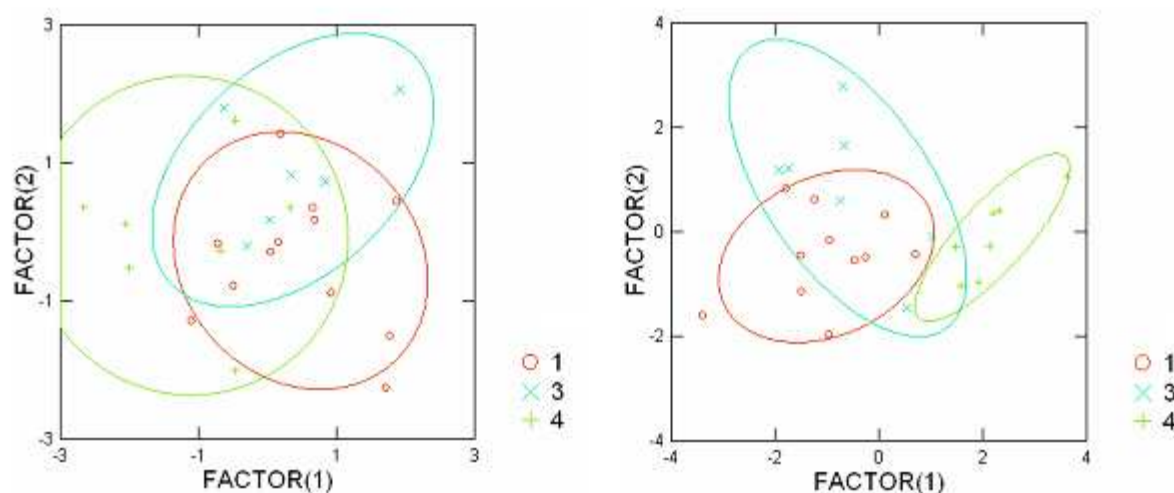


Figura 5.5: Distribuição discriminatória dos grupos tumorais pelo método manual (esquerda) e o método AMARES (direita). A cor vermelha corresponde ao grupo de tumores neurogliais de alto grau, a cor azul corresponde aos tumores não neurogliais e a cor verde aos astrocitomas pilocíticos.

bilidade entre os grupos, portanto maior separação entre eles. Particularmente, o grupo dos astrocitomas pilocíticos separou-se quase completamente dos outros grupos.

Por outro lado, o método manual apresentou uma distribuição mais superposta entre os grupos, consequência da quantificação pouco precisa dos metabólitos discriminantes de cada grupo tumoral.

5.2.2. Teste ANOVA

O teste de análise de variância de única variável (ANOVA), foi realizado para cada um dos metabólitos detectados neste estudo, comparando os valores médios de cada um deles em relação aos diferentes grupos de tumores. Nas Tabelas 5.2.1 e 5.2.1, encontram-se os valores médios calculados para cada metabólito, seus respectivos desvios padrão. As Figuras 5.6 e 5.7, permitem visualizar as variações destes valores médios de concentração de metabólitos

respeito a os quatro grupos estudados (três grupos de tumores e um controle).

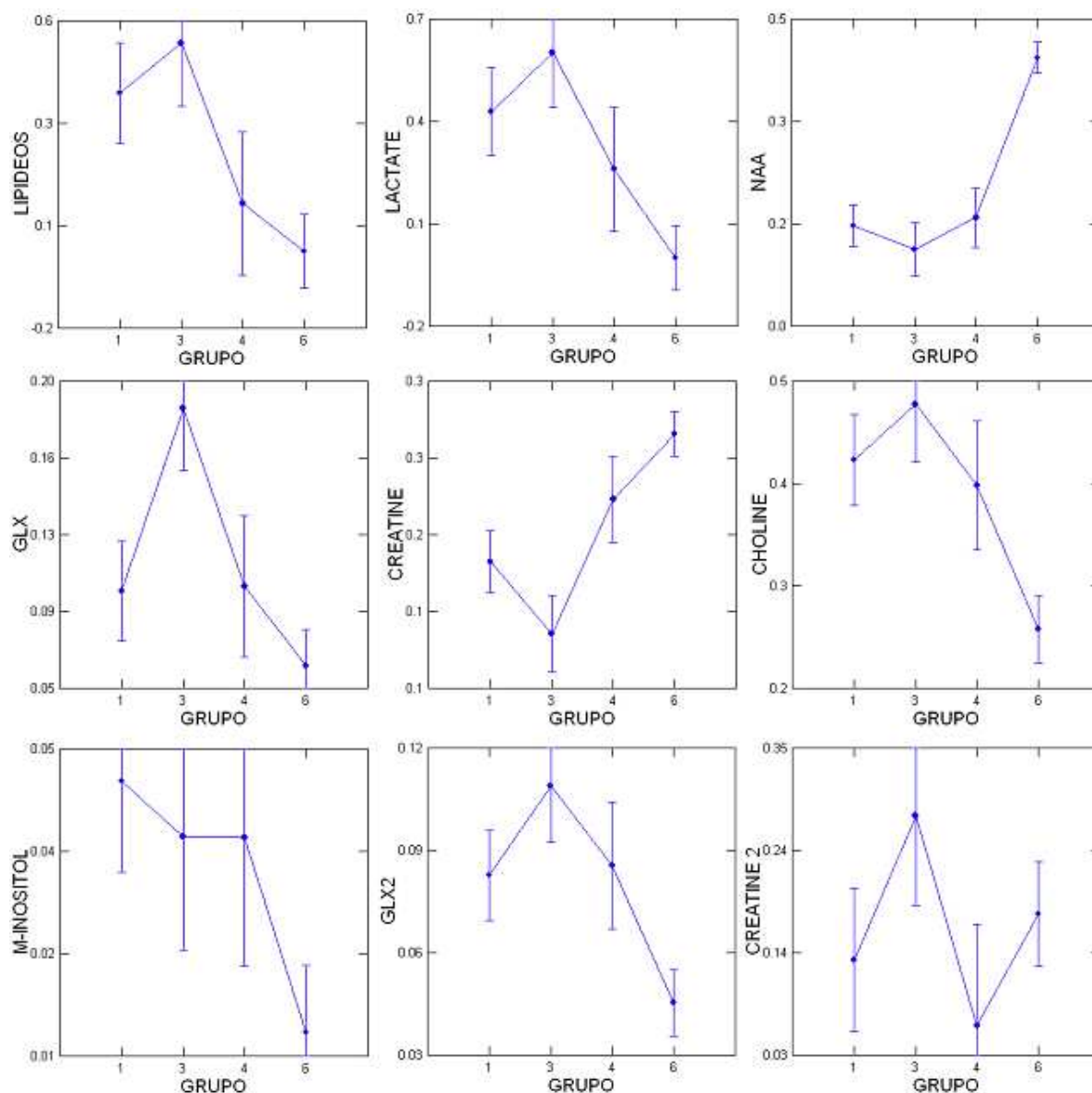


Figura 5.6: Gráfico para visualizar os resultados do teste ANOVA de única variável para as variações dos metabólitos quantificados através do método AMARES. Lipídeos (Lip), Lactato (Lac), N-acetilaspártato (NAA), Creatina (Cre e Cre2), Colina (Cho), Glutamina-Glutamato (Glx e Glx2) e Myo-inositol (mIno), em relação aos diferentes grupos tumorais (1: Tumores neurogliais de alto grau, 3: Tumores não neurogliais e 4: Astrocitoma Pilocítico) e o grupo controle (Grupo 6).

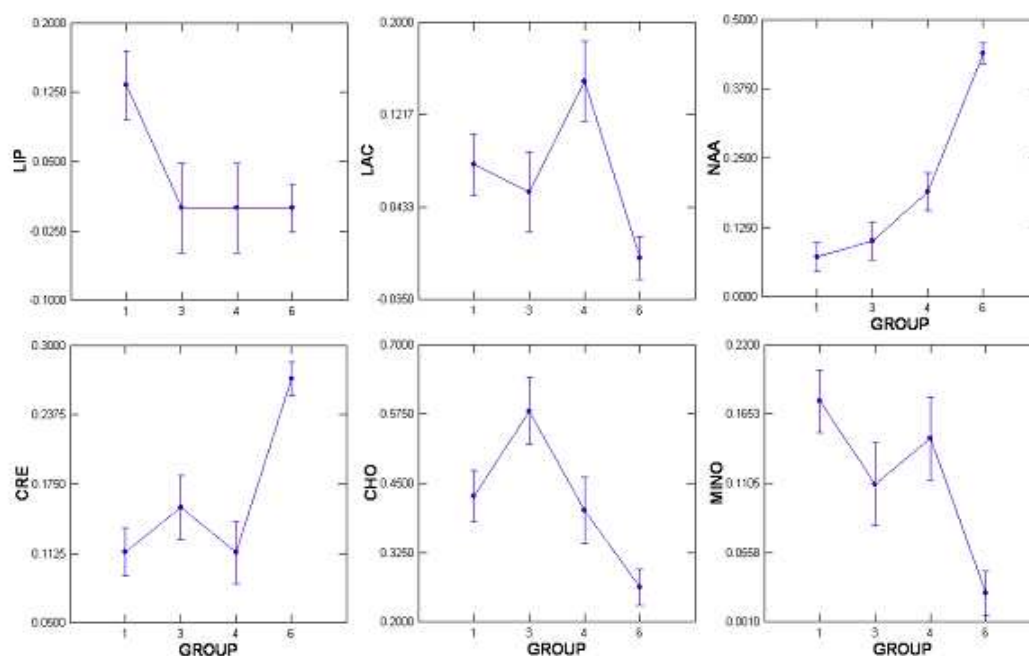


Figura 5.7: Gráfico para visualizar os resultados do teste ANOVA de única variável para as variações dos metabólitos quantificados pelo método manual. Lipídeos (Lip), Lactato (Lac), N-acetilaspártato (NAA), Creatina (Cre e Cre2), Colina (Cho), Glutamina-Glutamato (Glx e Glx2) e Myo-inositol (mIno), em relação aos diferentes grupos tumorais e o grupo controle.

Foi possível encontrar uma diferença de significância estatística entre as quantidades de metabólitos entre os diferentes grupos tumorais e o grupo controle ($p \leq 0,005$).

Os tumores apresentaram exclusivamente Lactato e Lipídeos e concentrações de Myo-inositol e Colina elevadas com relação ao grupo controle, enquanto que apresentavam níveis inferiores de NAA e Creatina.

Previu-se que os valores médios do Myo-Inositol, Creatina e Glx encontram-se afetados devido à sua proximidade com o pico da água que foi suprimido e posteriormente filtrado, processo que pode ter envolvido supressão parcial do sinal deste metabólito.

5.3 Tumores não incluídos no estudo classificatório

5.3.1. Astrocitoma de baixo grau

Neoplasia glial de baixa celularidade, constituída por astrócitos fibrilares. Os núcleos são pequenos, com escassas atipias, e os prolongamentos celulares se entrelaçam, formando o fundo fibrilar característico dos gliomas em geral.

Os astrocitomas difusos ditos de baixo grau quase sempre contêm atipias. Por isso, preenchem um critério (dos quatro em que se baseia a classificação) e são classificados como grau II (que é a graduação mais baixa para astrocitomas difusos). Os outros critérios para a graduação de tumores são mitoses, proliferação vascular e necrose [62].

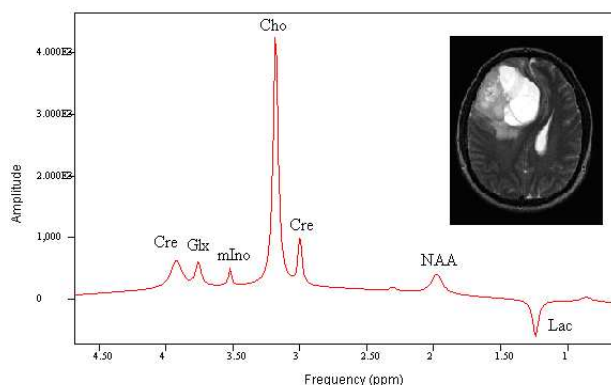


Figura 5.8: *Espectro ^1H -MRS de um paciente portador de um tumor astrocitoma.*

O espectro de ^1H -MRS dos astrocitomas de baixo grau é caracterizado principalmente por baixos sinais de Cre e NAA assim como da presença do dubleto do lactato. Também se observa o proeminente sinal da colina. Neste estudo, tinham-se 3 pacientes portadores desta patologia.

5.3.2. Metástase

Os tumores metastásicos comprometem o Sistema Nervoso Central (SNC) e se originam de neoplasias sistêmicas primárias. Os cânceres primários mais comuns que se disseminam ao cérebro são o câncer pulmonar (50 %), de mama (15-20 %), câncer de sítio primário desconhecido (10-15 %). Melanoma (10 %) e câncer de colon (5 %). Em mais do 70 % dos casos, se dissemina ao cérebro por metástases múltiplas, ainda que sejam possíveis metástases solitárias [62].

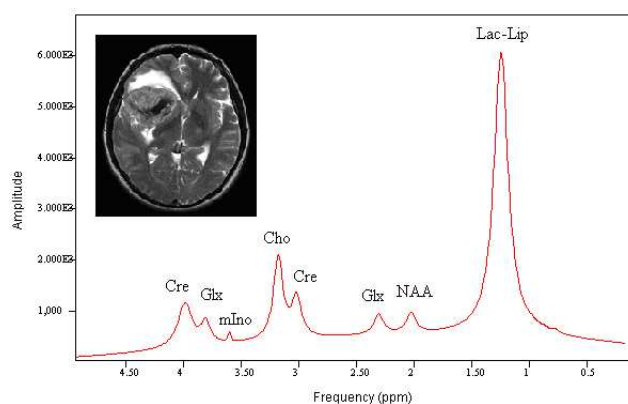


Figura 5.9: *Espectro ^1H -MRS de um paciente portador de metástase.*

O espectro de ^1H -MRS deste grupo é caracterizado principalmente por decréscimo na amplitude da maioria dos metabólitos e pela presença de um proeminente sinal dos picos do Lactato (refletindo presença de tecido necrótico) e Lipídeos, tal como se encontra na Figura 5.9. Foi observada uma similaridade entre os espectros dos pacientes portadores de glioblastoma e metástase [71],[89],[90].

5.3.3. Linfoma de Hodgkin Clássico

Inicia-se mais frequentemente em linfonodos cervicais, progredindo topograficamente no organismo por contigüidade. A localização do tumor primário é praticamente sempre nos linfonodos. Acometimentos extra-nodais significam tumor secundário. As células neoplásicas são a

minoria (menor que 1 %) em um fundo de células reativas (linfócitos, plasmócitos, eosinófilos), na maioria dos casos [62].

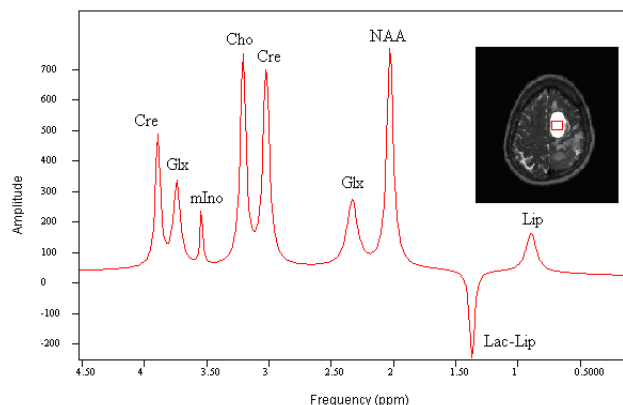


Figura 5.10: *Espectro ^1H -MRS de um paciente portador de Linfoma Hodgkin Clássico.*

A distribuição etária possui um pico de acometimento em crianças e adultos jovens e um pico menor nas faixas etárias mais avançadas. O espectro de ^1H -MRS do Linfoma de Hodgkin é caracterizado principalmente por baixos sinais de NAA assim como pela presença elevada de lactato e pelos lipídeos em baixas quantidades. Observa-se também a presença de mIno e uma elevação no sinal do grupo Glx. Neste estudo, tinha-se um único paciente portador desta patologia.

5.3.4. Ependimoma anaplásico

O ependimoma anaplásico é um glioma maligno de origem ependimário com crescimento acelerado. Podem originar-se nos ventrículos laterais ou no IV^o ventrículo. A distribuição etária é ampla, indo de crianças até a idade adulta [62].

Macroscopicamente, os ependimomas formam massas acinzentadas, bem delimitadas, que podem ter aspecto em couve-flor (papilífero), e fazer saliência no interior do ventrículo, mas infiltram o tecido cerebral adjacente.

Os ependimomas têm tendência a repetidas recidivas pós-cirúrgicas e o prognóstico final

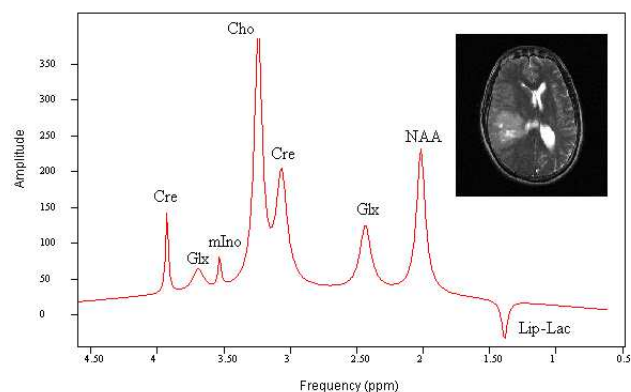


Figura 5.11: *Espectro ^1H -MRS de um paciente portador de Ependimoma anaplásico.*

é sombrio. Ependimomas comuns são grau II e há ependimomas anaplásicos, considerados grau III.

O espectro de ^1H -MRS do único ependimoma anaplásico incluso neste projeto, é caracterizado principalmente pelo decréscimo no sinal da creatina, baixos sinais de NAA assim como presença em pequenas quantidades do lactato, mIno, e Glx.

5.3.5. Ganglioglioma

Gangliogliomas, embora raros, são os tumores glio-neuronais mais comuns do SNC, podendo corresponder a 20 % das lesões ressecadas para tratamento de epilepsia. A maioria ocorre nos hemisférios cerebrais, especialmente no lobo temporal, e manifestam-se com convulsões em cerca de 90 % dos casos. A idade média é 20 anos, e a duração média dos sintomas é 5 anos. Não ocorrem em facomatoses ou doenças hereditárias mas podem estar associados a anomalias do desenvolvimento e desordens de migração neuronal (displasia cortical) [62].

Podem ser sólidos, constituídos por cisto único, ou multicísticos. O tecido entre os cistos é cinzento e granuloso. Necrose ou hemorragias não ocorrem, nem efeito de massa, porque o crescimento do tumor é lento. Microscopicamente, há uma mistura heterogênea de neurônios atípicos e glia neoplásica. Pode haver áreas só de glia. Os neurônios dismórficos são distri-

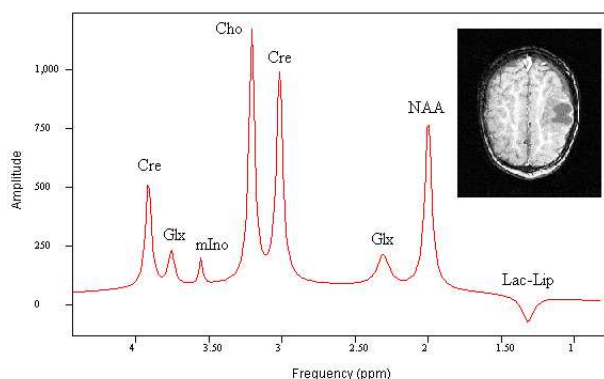


Figura 5.12: *Espectro ^1H -MRS de um paciente portador de Ganglioglioma.*

buídos irregularmente, isolados ou em grupos. Há grande variação na forma e tamanho dos neurônios e formas binucleadas são comuns.

O espectro de ^1H -MRS do único ganglioglioma deste trabalho é caracterizado principalmente pelo decréscimo no sinal do NAA, pequenas quantidades de Lactato, mIno, e Glx. A Colina e a Creatina têm sinais comparáveis em tamanho neste caso.

5.3.6. Linfoma não Hodgkin

Ao contrário dos Linfomas de Hodgkin, a progressão da doença não se faz necessariamente por contigüidade, sendo mais freqüentes os casos com acometimento sistêmico ao diagnóstico, inclusive com leucemização. Não é infreqüente o acometimento primário de órgãos extra-nodais, os sítios extra-nodais mais freqüentes são o estômago, o anel de Waldeyer e a pele [62].

As células neoplásicas distribuem-se por todo o tecido acometido, com poucas células inflamatórias reativas, na maioria dos casos. Distribuem-se por todas as faixas etárias, com predomínio de diferentes subtipos histológicos nas diversas idades.

O espectro de ^1H -MRS do Linfoma não Hodgkin é caracterizado principalmente pelo decréscimo no sinais de quase todos os metabólitos detectáveis neste estudo, com exceção dos sinais

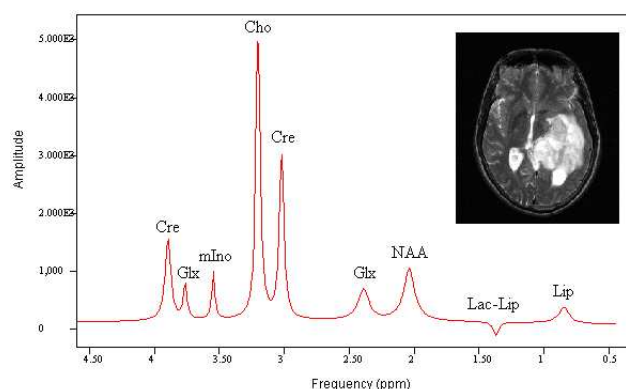


Figura 5.13: *Espectro ^1H -MRS de um paciente portador de Linfoma não Hodgkin.*

da Colina e Creatina, que estão elevados.

5.3.7. Cisto Epidérmico

Conhecidos popularmente por “cistos sebáceos”, os cistos encontrados com maior frequência são os epidérmicos e os pilares. O conteúdo de ambos não é sebo e sim queratina, a substância que forma a camada mais superficial da pele.

Os cistos epidérmicos são os mais frequentes e resultam da proliferação de células da epiderme dentro da derme, o que pode ser devido a uma tendência genética.

Os cistos pilares são menos frequentes e se originam do folículo piloso, ocorrendo principalmente no couro cabeludo. Antigamente eram chamados de cistos sebáceos [62].

As lesões são esféricas, geralmente móveis, indolores, de consistência elástica ou endurecida. Podem variar de pequenos cistos (menores de 1cm) até lesões com vários centímetros de tamanho. A cabeça, pescoço e tronco são as regiões mais afetadas. Os cistos são assintomáticos mas, se localizados sobre extremidades ósseas do tronco ou no couro cabeludo, podem causar incômodo ao deitar ou se encostar.

Em caso de inflamação secundária por ruptura da cápsula e/ou infecção, o cisto torna-se aver-

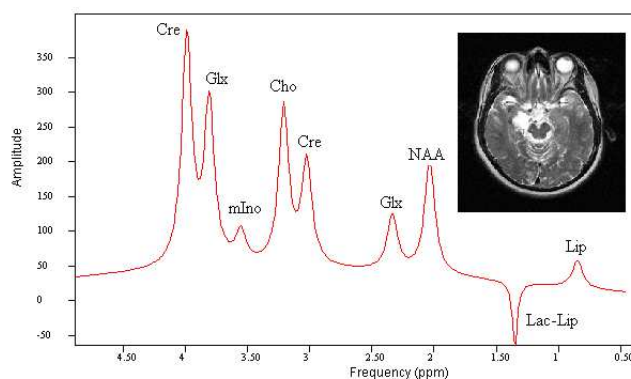


Figura 5.14: *Espectro ^1H -MRS de um paciente portador de Cisto Epidérmico.*

melhado, quente e doloroso. O tratamento dos cistos é cirúrgico. Dependendo do tamanho, tipo e localização da lesão, o procedimento poder ser apenas a incisão, drenagem do conteúdo do cisto e destruição da cápsula com cáusticos [62].

O espectro de ^1H -MRS do único cisto epidérmico deste trabalho, tem proeminente sinal do grupo Glx e da segunda ressonância da Creatina, além da presença de baixas quantidades de NAA, Lactato, Creatina e Colina. A presença do Lactato e Lipídeos permitiu a sua identificação.

5.3.8. Adenoma

O espectro de ^1H -MRS do adenoma incluso neste estudo, é caracterizado principalmente pelo proeminente sinal do Myo-inositol e da colina, e a suposta não detecção ou superposição da Creatina com o pico largo da Colina. Aliás, há detecção de Lactato e Lipídeos em pequenas quantidades [62].

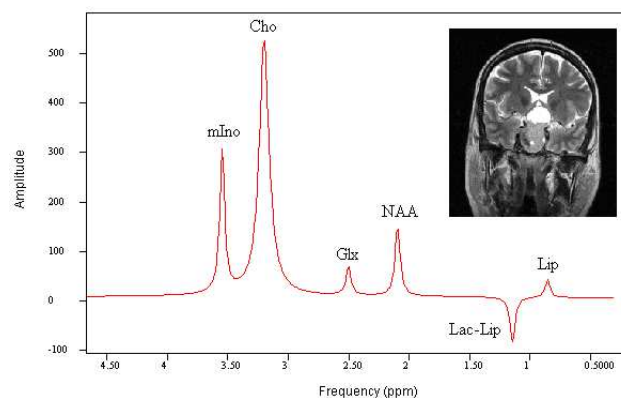


Figura 5.15: *Espectro ^1H -MRS de um paciente portador de Adenoma.*

5.3.9. Meduloblastoma

São tumores de origem neuroectodérmica, mas não derivam de células da glia e sim de neurônios imaturos presentes em uma fase do desenvolvimento do cerebelo. A incidência é maior na infância, com pico na primeira década. Porém podem ocorrer em adolescentes e adultos jovens [62].

Os Meduloblastomas têm localização cerebelar exclusiva, isto é, não são encontrados fora do cerebelo. Isto se deve a que suas células de origem existem apenas no cerebelo.

Eles formam massas relativamente bem delimitadas, em geral na linha média (vermis) do cerebelo. Comprimem o IV^o ventrículo, obstruindo o fluxo liquórico, causando hidrocefalia e hipertensão intracraniana. Esta é a situação mais comum na infância. Em pacientes de mais idade, a tendência é a localização em um hemisfério cerebelar [91],[94],[92],[93],[93].

O tumor é branco ou róseo-acinzentado, homogêneo. Geralmente não há necrose nem hemorragias. Apesar de aparentemente bem delimitado, o tumor é altamente infiltrativo e apresenta forte tendência à disseminação pelas leptomeninges de todo o neuro-eixo, em especial do próprio cerebelo e da medula espinhal.

O espectro de ^1H -MRS do meduloblastoma correspondente a um paciente pediátrico incluso

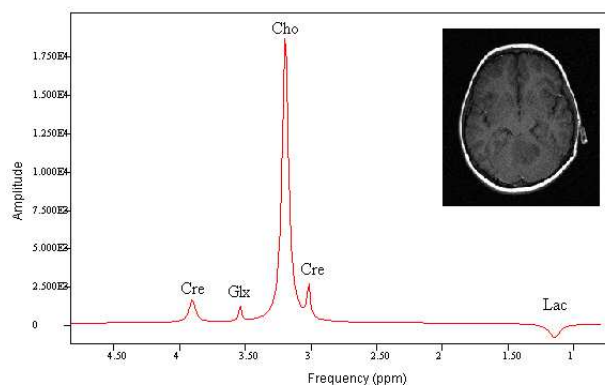


Figura 5.16: *Espectro ^1H -MRS de um paciente portador de Meduloblastoma.*

neste estudo, foi caracterizado principalmente pelo decréscimo na amplitude da maioria dos metabólitos e pela presença de um proeminente sinal da colina, característica típica neste tipo de patologia.

5.3.10. Limitações da técnica de MRS in-vivo

As principais limitações da técnica de MRS in-vivo estão relacionadas basicamente ao processo de aquisição dos dados. O uso de alto ou baixo campo magnético na aquisição dos espectros é determinante na boa resolução dos picos, especialmente dos multipletos e outras ressonâncias de baixa intensidade que terminam-se por se superpôr a outras maiores, dificultando a quantificação apropriada do metabólito, variável que será determinante nos estudos classificatórios.

Outra limitação da técnica está relacionada ao posicionamento do voxel. Os tumores podem ser muito heterogêneos e o espectro resultante deles pode conter informação de múltiplos compartimentos: tecido tumoral, áreas de necrose, áreas císticas, tecido infiltrado pela lesão. Cada um desses tecidos encerrados pelo voxel, traz informação que poderia alterar os resultados da classificação final do tumor em estudo.

Também pode-se ter o caso em que no mesmo voxel há células com distinto grau tumoral,

então o espectro não se correlaciona com o diagnóstico determinado pelas análises histopatológicas. Esta limitação é própria das técnicas de localização de voxel único e se corrige em grande parte ao usar técnicas de multi-voxel, já que a totalidade do tumor é estudada, ainda que com menor resolução espacial do que em voxel único.

Apesar das limitações citadas acima, a técnica espectral MRS in-vivo para diagnóstico e classificação de tumores cerebrais tem mostrado uma correlação boa ao compará-la com os resultados vindos do diagnóstico da MR de imagens ou da análise histopatológico, por isso, é importante seguir avançando e aperfeiçoando os processos de aquisição e pós-processamento de dados para a melhor quantificação dos sinais dos principais metabólitos detectáveis no cérebro humano.

Conclusões

Este trabalho de tese teve por objetivo estudar a técnica de Espectroscopia de MR in-vivo, e aplicá-la para o estudo e classificação de tumores cerebrais. As principais conclusões atingidas através deste estudo foram:

- A espectroscopia de MRS in-vivo permite identificar e quantificar os padrões metabólicos de diferentes tipos de tumores cerebrais e fornece informação que poderia ser aplicada no diagnóstico clínico da doença, já que os resultados da classificação de tumores mostraram resultados satisfatórias.
- A MRS in-vivo é uma ferramenta útil na diferenciação de tecido normal e patológico. Neste estudo ela permitiu por ambos os métodos obter uma porcentagem de acerto de 100 % ao distinguir indivíduos controles de pacientes com tumores cerebrais, e em média 82 % ao distinguir entre tumores neurogliais de alto grau, tumores não neurogliais e astrocitomas pilocíticos com o método automático AMARES e 62 % com o método manual.
- As concentrações estimadas obtidas com dados de MRS in-vivo não são susceptíveis a artefatos como a degradação do tecido ou mudanças nas quantidades de metabólitos de interesse devido à manipulação das amostras como no caso das técnicas alternativas ex-vivo de alta resolução ou outras técnicas invasivas. Portanto a estimativa das concentrações dos metabólitos de interesse detectados e quantificados com a técnica MRS

in-vivo, permite obter uma análise realista do estado fisiológico do tecido cerebral e da patologia estudada. Entretanto, uma limitação da técnica está relacionada com a resolução dos espectros obtidos a baixo campo magnético no ambiente clínico (1.5 - 3.0 T) e o conseqüente decréscimo na quantidade de biomarcadores metabólicos detectados devido à superposição de sinais com frequências de ressonância próximas.

- As principais limitações da técnica de MRS in-vivo estão relacionadas basicamente ao processo de aquisição dos dados. Para obter concentrações confiáveis com dados de MRS in vivo, é preciso considerar métodos adequados de aquisição e processamento. O processo de aquisição de dados vê-se influenciado por uma profusão de parâmetros, entre eles, os tempos de relaxação, as eddy-currents, a homogeneidade do campo magnético na amostra estudada etc. Particularmente, neste estudo, a variabilidade no número de espectros adquiridos por paciente foi determinante na qualidade final do espectro in vivo dificultando o processo de classificação entre os grupos de tumores.
- Neste estudo, foi possível ver a diminuição paulatina com o grau tumoral das quantidades de Lactato e lipídeos nos grupos tumorais e a não detecção deles no tecido de sujeitos normais. Em tumores gliais de alto grau e tumores não neurogliais foi detectado o dobro da quantidade de lactato e lipídeos que no grupo tumoral de menor agressividade, o astrocitoma pilocítico.
- Outro metabólito de importância na classificação de tumores é o Myo-inositol, já que tem-se reportado um decréscimo deste metabólito com relação ao grau tumoral, fato corroborado neste estudo, onde, os tumores neurogliais de alto grau possuíam maior quantidade deste metabólito com relação aos outros dois grupos de menor grau de agressividade, e conseqüentemente, ao grupo controle onde o Myo-inositol. é quase imensurável.
- Os meningeomas apresentaram a maior quantidade de Colina com relação aos outros grupos tumorais, e contrário ao esperado, apresentaram quantidades detectáveis de NAA.
- Diferentemente do método automático que permitiu quantificar 9 ressonâncias de 6

metabólitos, o método manual detectou somente 6 delas, mostrando isto uma das vantagens no uso da quantificação automática dos espectros de MRS in-vivo. A manipulação mínima dos sinais foi o ponto chave neste caso, já que o método manual utilizou o procedimento de apodização que faz com que muitos dos sinais de baixa intensidade (como o caso do grupo Glx) se superponham aos de metabólitos próximos detectáveis mais facilmente.

- A 1H -MRS in-vivo fornece informação completamente diferente ao compará-la com as técnicas de imagens, no entanto, pode-se realizar na maioria dos scanners de MRI usados na radiologia clínica. Ela permite compilar maior informação sobre a bioquímica tumoral, esta informação junto à fornecida por outras técnicas como DNA microarrays e espectroscopia de alto campo ex-vivo e espectroscopia de multi-voxel permitiria ter uma visão geral e realista dos mecanismos de desenvolvimento e propagação dos tumores cerebrais.
- Apesar das limitações da técnica, a MRS in-vivo para diagnóstico e classificação de tumores cerebrais tem mostrado uma correlação boa ao compará-la com os resultados vindos do diagnóstico da MR de imagens ou da análise histopatológico, por isso, é importante seguir avançando e aperfeiçoando os processos de aquisição e pós-processamento de dados para a melhor quantificação dos sinais dos principais metabólitos detectáveis no cérebro humano visando no futuro o diagnóstico automático de tumores cerebrais.

Anexos **A**

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa
(CEP- UNICAMP)

**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP: 26/06/07.
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 289/2007 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0215.0.146.000 -07

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "QUANTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS NO CÉREBRO HUMANO *IN VIVO* ATRAVÉS DE SINAIS ESPECTROSCÓPICOS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Sandra Patrícia Cuellar Baena

INSTITUIÇÃO: HC/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 11/05/2007

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 26/06/08 (O formulário encontra-se no site acima)

II - OBJETIVOS

Quantificar de forma automatizada, utilizando software computacional específico, dados já coletados em pesquisa anterior aprovada por este comitê de ética em 2002 (147-2002), na qual os sujeitos da pesquisa já haviam concordado e assinado termo de consentimento livre e esclarecido. O atual projeto visa somente re-quantificar os dados coletados manualmente na época utilizando software computacional, garantindo a confidencialidade dos dados pessoais dos pacientes.

III - SUMÁRIO

Trata-se de estudo retrospectivo utilizando dados já coletados por outro pesquisador do laboratório de neuroimagem da FCM Unicamp a partir de estudo aprovado por este comitê em 2002 (147-2002). O atual projeto não visa nenhum procedimento de coleta de novos dados ou inclusão de novos pacientes, objetivando somente análise dos dados já obtidos de forma automática e não manualmente como foi feito anteriormente. Solicita para tanto a dispensa da assinatura de novo termo de consentimento livre e esclarecido por parte dos pacientes cujos dados irá utilizar na análise.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Não me parece haver razão objetiva para a necessidade de novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido no presente projeto.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e

**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 26 de junho de 2007.


Prof. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 24/06/08.
(PARECER CEP: Nº 289/2007)

PARECER

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “QUANTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS NO CÉREBRO HUMANO *IN VIVO* ATRAVÉS DE SINAIS ESPECTROSCÓPICOS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Sandra Patrícia Cuellar Baena

II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP aprovou o Relatório Final, apresentado em maio de 2008, do protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

III - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 24 de junho de 2008.


Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Artigo para ser submetido ao “Journal of BMC
Medical Imaging”

**Automatic and manual quantification of in vivo ^1H -MRS data for classification of human
brain tumors**

Cuellar, S.¹ : Sandra Patricia Cuellar Baena **e-mail:** spcbaena@ifi.unicamp.br
Morais, L.T.²: Livia Tavares de Moraes **e-mail:** liviamtms@yahoo.com.br
Cendes, F.²: Fernando Cendes **e-mail:** fcendes@unicamp.br
Faria, A.V.²: Andreia Vasconcellos Faria **e-mail:** andreia@fcm.unicamp.br
Castellano, G.¹: Gabriela Castellano **e-mail:** gabriela@ifi.unicamp.br

¹ Instituto de Física “Gleb Wataghin”, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil

² Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil

Address: Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP.

Cidade Universitária Zeferino Vaz, 13083-970

Campinas, São Paulo, Brasil

Phone: +55(19) 3521 5297

Fax: +55(19) 3521 4147

Abstract

Aim: The main goal of our work was to corroborate the usefulness of proton magnetic resonance spectroscopy (^1H -MRS) for the classification of brain tumors through a pilot study comparing results obtained by manual and automatic quantification of the metabolites.

Materials and Methods: In-vivo single-voxel 2 Tesla ^1H -MRS at an echo time of 136 ms was performed in 24 control subjects and 30 patients with brain neoplasms that included meningiomas, high and low grade neuroglial tumors, pilocytic astrocytomas and metastases. Time domain fitted areas of seven metabolites (Lactate, Lipids, N-acetylaspartate, Glutamate and Glutamine group, Creatine, Choline, Myo-inositol) were evaluated in all spectra using two methods: the AMARES (Advanced Method for Accurate, Robust and Efficient Spectral fitting) quantification method implemented into the jMRUI software (<http://www.mrui.uab.es>) and the manual method consisting of integration of manually defined peak areas.

Results: Both automatic and manual analyses showed differences in metabolite amounts among tumor groups and controls ($p < 0.005$). The accuracy was 78% for high grade neuroglial tumors, 70% for meningiomas, 98% for pilocytic astrocytomas and 100% for control subjects in the automatic method and 75% for high grade neuroglial tumors, 55% for meningiomas, 56% for pilocytic astrocytomas and 100% for control subjects in the manual method.

Conclusions: This study confirmed that MRS is useful on differentiating normal and tumoral brain tissue and confirmed the superiority of the automatic quantification method. A better model to classify tumors according to histological type is expected, once the sample size is expanded.

1. Introduction

In-vivo Proton Magnetic Resonance Spectroscopy (^1H -MRS) is a revolutionary and promising approach to assess biochemical content and pathways developed in normal and pathological tissue [1]. In the brain, where ^1H -MRS is frequently applied, it complements the information given by magnetic resonance (MR) images [2, 3]. Quantification of the principal metabolites

detected by MRS at long or short echo times can provide quantitative information about these substances, which are involved in different processes in the nervous system. In brain tumors, biochemical pathways as glycolisys can increase lactate levels, enzymatic abnormal activation can increase choline levels and neuronal damage can decrease N-acetylaspartate (NAA) levels. Also, many other known and unknown pathological conditions related to genetic, osmotic, nutritional and energetic stresses change the concentrations of these metabolites, as well as the concentrations of other detectable metabolites such as creatine and lipids.

Several studies have been aimed at assessing the metabolic patterns of brain tumors, attempting to classify them according to histological diagnosis, aggressiveness, clinical outcome etc [4-10]. Some studies have been directed towards the comparison between different kinds of spectral fitting methods, either in the time [11] or frequency domain [12]. The aim of our work was to perform the quantification of a control and tumor MRS brain database, using an automatic method (AMARES) [13], and verify whether this showed any improvement over the manual one. The more accurate measurement of these metabolites concentrations can contribute to the improvement of diagnosis and treatment, and increase our knowledge about brain tumors metabolism.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Subjects

The ^1H -MRS spectral data used in this study were provided by the Clinical Hospital and Neuroimage Laboratory (LNI), State University of Campinas, Campinas, Brazil. It consisted of spectra acquired from 24 normal subjects (control group) and 30 patients with different brain tumor types. This study was approved by the Ethical Committee of our University and all subjects signed an Informed Consent. Subject ages ranged from 4 to 80 years old.

Patients with tumors were divided into 5 groups according to histological type: 1) high grade

neuroglial (12 patients), 2) low grade neuroglial (3 patients), 3) non-neuroglial (7 patients), 4) pilocytic astrocytoma (7 patients), and 5) metastases (1 patient). However, due to the small number of patients in groups 2 and 5, only the remaining three groups (1, 3 and 4) and the control group (group 6) were used to perform the statistical classification. Patients were not receiving any kind of treatment (clinical or surgical) since the scans in question were the first step of the clinical investigation. Figures 1 to 4 show examples of spectra from these groups.

2.2 ^1H -MRS Parameters

The MRS data was acquired at 2.0 T using a head coil in an Elscint Prestige Scanner (Haifa, Israel), using a PRESS sequence with repetition time $TR = 1500$ ms, echo time $TE = 136$ ms, spectral width $SW = 1000$ Hz and 1024 complex data points. Voxels for the control subjects were localized in the white matter, thalamus or temporal regions, whereas for the patients the voxels were positioned inside the tumor volume. All voxels were $2 \times 2 \times 2 \text{ cm}^3$. Common procedures used in MRS studies, such as automatic shimming, water suppression through CHESS pulses and eddy-currents compensation, were performed for all acquisitions. T_2 -weighted MR images were also acquired in order to visualize the affected area of the brain.

2.3 Post-processing and quantification of the signals

2.3.1 Automatic method

Automatic post-processing of spectral signals was done using the jMRUI software. In order to compensate for a small frequency drift of our equipment, we first phased the water peak in all the signals for each acquisition using a reference signal (acquired without water suppression), then frequency-aligned those signals based on the water peak, and finally averaged the signals to obtain a higher Signal to Noise Ratio (SNR) spectrum. Next the residual water signal, centered at 4.68ppm, was filtered using the Hankel Lanczos singular value decomposition (HLSVD) routine.

Neither truncation nor apodization procedures were applied to the data. Finally, the metabolite peaks of interest were quantified using the AMARES method of time-domain quantitation [13]. Prior knowledge was used in the quantification process [14], selecting the frequency ranges shown in Table 1 for each of the metabolite resonances used as markers in the classification scheme. The name of the resonance range was given according to the metabolite with largest contribution.

Values for the linewidth ranges were set to 2 – 8 Hz, and no assumptions were made for metabolite peak amplitudes or phases, with exception of the relative phase of the Lactate peak which was fixed to 180 degrees. Finally, Lorentzian lineshapes were imposed for spectral fitting.

The AMARES method is a time-domain quantification procedure used to calculate the amplitudes of the metabolites in noisy MR spectra. This method uses the following model function to fit each metabolite peak:

$$y_n = \hat{y}_n + e_n = \sum_{k=1}^K a_k e^{j\phi_k} e^{(-d_k + j2\pi f_k)t_n} + e_n, \quad n = 0, 1, \dots, N-1, \quad (1)$$

where a_k is the amplitude, ϕ_k is the phase, d_k is the damping factor, and f_k is the frequency of the k -th sinusoid ($k = 1, \dots, K$); $t_n = \Delta t + t_0$ with Δt the sampling interval, t_0 is the time between the effective time origin and the first data point to be included in the analysis, and e_n is complex white Gaussian noise. $\hat{y}$ represents the model function, while the actual measurements are represented by y [13].

The AMARES method provided estimates for the peak frequency, amplitude, phase, and linewidth of the aforementioned resonances (Table 1). We normalized the peak area of each metabolite by the sum of all peaks areas. This is more trustworthy than using the Creatine peak amplitude as a reference, since the concentration of this metabolite varies in unpredictable ways in tumors.

2.3.2 Manual method

The manual post-processing of spectral signals consisted in the use of apodization, varying from 2 to 3Hz, and manual phasing of the spectra. Truncation of initial points of the FID and zero-filling (by a factor of 2) was also used, when necessary. The quantification of metabolites consisted in integrating peak areas, which was done by manually defining the center frequency and the initial and final points of each peak. This procedure was performed directly on the scanner console by a neuroradiologist, and only the main metabolite resonances for each group were quantified: LIP, LAC, NAA, CRE (3.03 ppm), CHO and MINO (see Table 1).

Main metabolite	Frequency range (ppm)
Lipids (LIP)	0.85–1.0
Lactate (LAC)	1.15–1.55
N-acetylaspartate (NAA)	1.98–2.08
Glutamate and Glutamine (GLX and GLX ₂)	2.31–2.60 and 3.65–3.81
Creatine (CRE and CRE ₂)	2.98–3.08 and 3.83–3.93
Choline (CHO)	3.16–3.26
Myo-inositol (MINO)	3.36–3.61

Table 1: Resonance frequency ranges used as prior knowledge in the AMARES quantification method. Ranges were centred in values found in [15] and [6].

2.3.3 Histological analysis

Patients underwent surgery or biopsy for the treatment or diagnosis of brain tumors. The tissue specimens were processed for routine histopathology. Diagnosis was performed on 10 mm thin cryostat sections after hematoxylin–eosin staining and followed the World Health Organization (WHO) classification system [16].

2.4 Statistics

We tested the significance of the main metabolites (NAA, Creatine, Choline, Lactate, Lipid and Myo-Inositol) in each group using Analysis of Variance (ANOVA). Linear Discriminant Analysis (LDA) was used to obtain a classification model for the groups using combinations of metabolites amounts [17,18].

3 RESULTS

3.1 Patients Groups

3.1.1 Group 1: High Grade Neuroglial Tumors

This group, composed of 12 subjects, contained the most aggressive parenchyma type of tumor. It was characterized by NAA and Creatine decreased peak amplitudes, metabolic changes usually correlated to neuronal damage and abnormalities in energetic metabolism, respectively. The presence of Lactate is consistent with the tumoral aggressiveness. A lipid peak was detected correlating with necrotic tissue, usually present in these tumors (Figure 1). The manual method correctly classified 75% of the patients for this group, against 78% correct classification achieved with the automatic method (see Table 2).

3.1.2 Group 3: Non-neuroglial Tumors

This group contained extra parenchyma originated tumors. In our study, it was composed of 7 meningiomas (tumors that arise from the arachnoidal cap cells of the meninges). The main characteristic of these spectra was the prominent Choline signal (Figure 2). Peaks that characterize brain tissue, such as NAA and Creatine, were decreased. The manual method obtained 55% and the automatic method 70% of correct classified patients (see Table 2).

	Metabolites	1- High Grade Neuroglial	3- Non-neuroglial	4- Pilocytic Astrocytoma	6- Control
Automatic method	Lipids	0.222±0.313	0.276±0.631	0.177±0.245	0
	Lactate	0.358±0.405	0.335±0.612	0.260±0.270	0
	NAA	0.175±0.143	0.085±0.118	0.211±0.206	0.412±0.122
	Glx	0.098±0.064	0.093±0.089	0.100±0.073	0.062±0.032
	Creatine	0.187±0.075	0.106±0.107	0.223±0.111	0.266±0.045
	Choline	0.425±0.200	0.539±0.315	0.398±0.168	0.265±0.084
	mInositol	0.048±0.080	0.043±0.043	0.038±0.057	0.012±0.014
	Glx 2	0.080±0.053	0.089±0.064	0.084±0.070	0.040±0.035
	Creatine 2	0.0131±0.083	0.063±0.072	0.061±0.082	0.173±0.099
Manual method	Lipids	0.133±0.262	0	0	0
	Lactate	0.079±0.109	0.056±0.072	0.150±0.185	0
	NAA	0.072±0.073	0.101±0.105	0.190±0.111	0.282±0.117
	Creatine	0.114±0.070	0.154±0.143	0.114±0.094	0.251±0.173
	Choline	0.427±0.192	0.580±0.269	0.401±0.178	0.242±0.107
	mInositol	0.175±0.099	0.110±0.113	0.146±0.151	0.225±0.250

Table 2: Metabolites means and SD calculated with the automatic (top) and the manual (bottom) quantification methods for the selected tumor groups.

3.1.3 Group 4: Pilocytic Astrocytoma

The Pilocytic Astrocytoma group, which is a benign neuroglial tumor type, was composed of 7 subjects in our study. Similarly to the high grade neuroglial group, spectra in this group were characterized by the decreased signal of NAA and Creatine and the presence of Lactate (Figure 3). For this group, the manual method achieved a classification rate of 56%, and the automatic method a rate of 98% (see Table 2).

3.1.4 Group 6: Control subjects

This group is primarily characterized by prominent signals of N-Acetylaspartate, Choline and Creatine, and by the absence of metabolites like Lactate or lipids (see Figure 4). The control group was correctly discriminated by both methods in 100% of the subjects (see Tables 4).

3.2 One-Step Classification of Groups

Figures 5 and 6 show the ANOVA [19] results for the automatic and manual methods respectively, which are also summarized in Table 2. The graphs in these figures show the mean values of relative peak areas for each resonance range within each tumor group (1, 3, 4 and 6, where 6 is the control group). We can see that both automatic and manual analyses show differences in metabolite amounts among tumor groups and controls ($p < 0.005$). The manual analysis presented larger standard deviation (SD) for the measurement of Choline, Creatine and Myo-inositol peaks. Note that in Figures 5 and 6, as well as in Table 2, the manual method shows results for less resonances than the automatic one: this is one of the limitations of the former method, since due to the post-processing techniques used such as apodization, peaks are enlarged and fewer resonances remain detectable.

3.2.1 Manual and Automatic Method

Tables 3 and 4 show the results of the leave-one-out Linear Discriminant Analysis (LDA) [20]. The automatic method obtained a larger classification rate for all tumor groups as expected. Differentiation between normal and tumoral tissue was confirmed as expected.

Tumor Group	N	Automatic Method	Manual Method
1 - Neuroglial	12	78%	75%
3 - Non neuroglial	7	70%	55%
4 - Pilocytic Astrocytoma	7	98%	56%

Table 3: Percentage of correct classification obtained by Linear Discriminant Analysis tested by the Leave-one-out method.

Groups	N	Automatic Method	Manual Method
Tumors	26	92%	92%
Controls	24	100%	100%

Table 4: Percentage of correct classification obtained by Linear Discriminant Analysis tested by the Leave-one-out method to differentiate normal from tumoral tissue.

Figure 7 displays discriminant distributions of tumor groups for both methods. The factors 1 and 2 in those graphs indicate main numerical characteristics calculated by LDA that are able to discriminate among groups. We can see with these graphs that the automatic method had best results for tumor groups: it showed less variability within groups and better separation among groups. In particular, Group 4 (Pilocytic Astrocytoma) was well separated from the other tumor types by this method. The manual method presented broader and more overlapped distributions.

4 DISCUSSION

Several limitations can interfere in the classification of brain tumors using 136ms echo time metabolite markers from ^1H -MRS in vivo signals. Inherent to the technique are: the low to medium magnitude (1-3 Tesla) of the magnetic fields used in clinical applications, together with the low sensibility of the technique (due to low concentrations of studied metabolites in the human body), which result on low SNR; the impossibility of controlling the sample's temperature which results in different chemical shifts from the expected values; magnetic field

inhomogeneities arising from a number of different factors (such as eddy-currents) that contribute to the uncertainty of the measurements; the residual signals from water and fat that modify the baseline: all these problems combine to result in a measured MRS signal of low SNR. These limitations may have influenced our results independently of the quantification method used.

Also, we agree with Lukas et al. [6] in that the limited number of patients per group makes it difficult to build a classifier with a high generalization capacity. In addition, noise due to artifacts, as aforementioned, can reduce the quality of spectral data and consequently difficultate the calculation of metabolite concentrations, even using an automatic method. This partially explains the fact that we have a pronounced overlap between the spectra of different tumor groups.

Even with this limitation, we found, using both (manual and automatic) analyses, a metabolic pattern in tumors and controls that is in agreement with previous and recent studies [3, 4, 6, 7, 21-25]. Tumors were marked by NAA and Creatine reduction, Choline increase and by the presence of Lactate and Lipid peaks in some groups. It is important to notice that both methods classified all controls correctly, proving the efficiency of the MRS technique on discriminating between normal and pathological tissue. The most evident difference between automatic and manual analyses was the better classification of high grade tumors obtained by the first one. We attribute this improvement mainly to constancy of the automatic method in the measurement of the Creatine and Choline peaks. Due to the apodization used in the manual procedure, these peaks were very often overlapped, causing a large variation in the manual determination of peaks limits. This is confirmed by the larger standard deviations found for these measurements. This was particularly true in high grade neuroglial tumors, where the cellular heterogeneity and the microscopic areas of necrosis can cause a global decrease in peak amplitudes and damage resolution. Also, in general, the manual method has more sources of error than the automatic one, mainly due to dependency on the analyst subjectivity, particularly in the phasing procedure.

5 CONCLUSION

We confirmed that manual and automatic analyses of MR spectra were able to differentiate normal from tumoral tissue. Automatic analysis was more accurate in classifying all tumor groups. The automatic method was acceptable enough to build a model for classifying tumors studied in this work by their histological diagnosis and, despite the small number of subjects used in the study, the automatic and manual method were in agreement, confirming the superiority of the first one. We believe a better classification of brain tumors according to clinical parameters will be possible by expanding our sample database.

REFERENCES

- [1] Preul MC, Caramanos Z, Collins DL et al. Accurate, noninvasive diagnosis of human brain tumors by using proton magnetic resonance spectroscopy. *Nature Med* 1996; 2(3):323-325.
- [2] Del Sole A, Falini A, Ravasi L et al. Anatomical and biochemical investigation of primary brain tumours. *Eur J Nucl Med* 2001; 28(12):1851-72.
- [3] Nakaiso M, Uno M, Harada M et al. Brain abscess and glioblastoma identified by combined proton magnetic resonance spectroscopy and diffusion-weighted magnetic resonance imaging – two case reports. *Neurol Med Chir*, 2002; 42:346-8.
- [4] Lehnhardt FG, Bock C, Röhn G, Ernestus RI, Hoehn M. Metabolic differences between primary and recurrent human brain tumors: a ^1H NMR spectroscopic investigation. *NMR Biomed*. 2005; 18(6):371-82.
- [5] Demaerel P, Johannik K, Van Hecke P, et al. Localized ^1H NMR spectroscopy in fifty cases of newly diagnosed intracranial tumors. *J Comput Assist Tomogr*. 1991; 15(1):67-76.

-
- [6] Lukas L, Devos A, Suykens JA, Vanhamme L, Howe FA, Majós C, Moreno-Torres A, Van der Graaf M, Tate AR, Arús C, Van Huffel S. Brain tumor classification based on long echo proton MRS signals. *Artificial Intelligence in Medicine* 2004; 31:73–89.
- [7] Tate AR, Majós C, Moreno A, Howe FA, Griffiths JR, Arús C. Automated classification of short echo time in in-vivo ^1H brain tumor spectra: A multicenter study. *NMR in Biomedicine* 2003; 49:29–36.
- [8] Majós C, Julià-Sapé M, Alonso J, Serrallonga M, Aguilera C, Acebes JJ, Arús C, Gili J. Brain tumor classification by proton MR spectroscopy: comparison of diagnostic accuracy at short and long TE. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2004; 25(10):1696-1704.
- [9] Simonetti AW, Melssen WJ, Szabo F, van Asten JJ, Heerschap A and Buydens LM. Combination of feature-reduced MR spectroscopic and MR imaging data for improved brain tumor classification. *NMR Biomed.* 2005; 18:34–43.
- [10] Sjøbakk TE, Johansen R, Bathen TF, Sonnewald U, Kvistad KA, Lundgren S, Gribbestad IS. Metabolic profiling of human brain metastases using in vivo proton MR spectroscopy at 3T. *BMC Cancer.* 2007; 7:141.
- [11] Vanhamme L, Sundin T, Van Hecke P, Van Huffel S. MR spectroscopy quantitation: a review of time domain methods. *NMR in Biomedicine* 2001; 14:233–246.
- [12] Mierisová S, Ala-Korpela M. MR spectroscopy quantitation: a review of frequency domain methods. *NMR Biomed.* 2001;14:247–259.
- [13] Vanhamme L, Van Den Boogaart A and Van Huffel S. Improved method for accurate and efficient quantification of MRS data with use of prior knowledge. *Journal of Magnetic Resonance* 1997; 129:35–43.

-
- [14] De Graaf AA and Bovée WMMJ. Improved quantification of in vivo ^1H NMR spectra by optimization of signal acquisition and processing and by incorporation of prior knowledge into the spectral fitting. *Magnetic Resonance in Medicine* 1990; 15: 305-319.
- [15] Govindaraju V, Young K, Maudsley AA. Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR in Biomedicine* 2000; 13:129–153.
- [16] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO Classification for tumors of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007; 114:97-109.
- [17] Altman DG. Practical statistics for medical research. Chapman and Hall, London, 1991.
- [18] Campbell MJ and Machin D. Medical statistics: a commonsense approach. John Wiley, Chichester, 1999.
- [19] Gudmund R. I., Norpoth H. Analysis of variance. Sage, Newbury Park, 1987.
- [20] McLachlan GJ. Discriminant analysis and statistical pattern recognition. John Wiley, New York, 1992.
- [21] Opstad KS, Ladroue C, Bell BA, Griffiths R and Howe FA. Linear discriminant analysis of brain tumor H MR spectra: a comparison of classification using whole spectra versus metabolite quantification. *NMR in Biomedicine* 2007; 20:763-770.
- [22] Morales H, Kwock L, Castillo M . Magnetic resonance imaging and spectroscopy of pilomyxoid astrocytomas: case reports and comparison with pilocytic astrocytomas. *J Comput Assist Tomogr.* 2007; 31(5):682-687.

[23] Di Costanzo A, Scarabino T, Trojsi F, Giannatempo GM, Popolizio T, Catapano D, Bonavita S, Maggialelli N, Tosetti M, Salvolini U, d'Angelo VA, Tedeschi G. Multiparametric 3T MR approach to the assessment of cerebral gliomas: tumor extent and malignancy. *Neuroradiology* 2006; 48(9):622-31.

[24] Cho YD, Choi GH, Lee SP, Kim JK. ¹H-MRS metabolic patterns for distinguishing between meningiomas and other brain tumors. *Magn Reson Imaging* 2003; 21(6):663-72.

[25] Howe FA, Barton SJ, Cudlip SA, Stubbs M, Saunders DE, Murphy M, Wilkins P, Opstad KS, Doyle VL, McLean MA, Bell BA, and Griffiths JR. Metabolic Profiles of Human Brain Tumors Using Quantitative In Vivo ¹H Magnetic Resonance Spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine* 2003; 49:223–232.

Figures

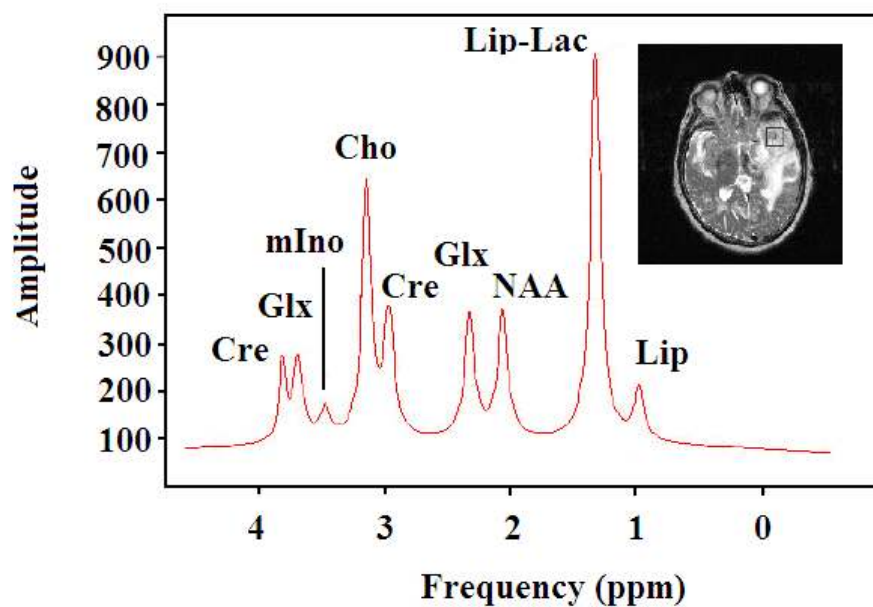


Figure 1: ^1H -MRS estimated spectrum of a patient with high grade neuroglial tumor.

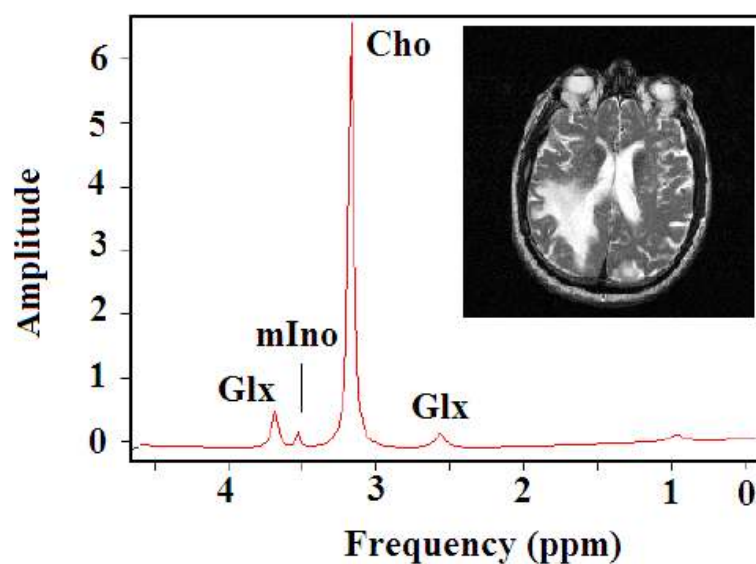


Figure 2: ^1H -MRS estimated spectrum of a patient with a non-neuroglial tumor.

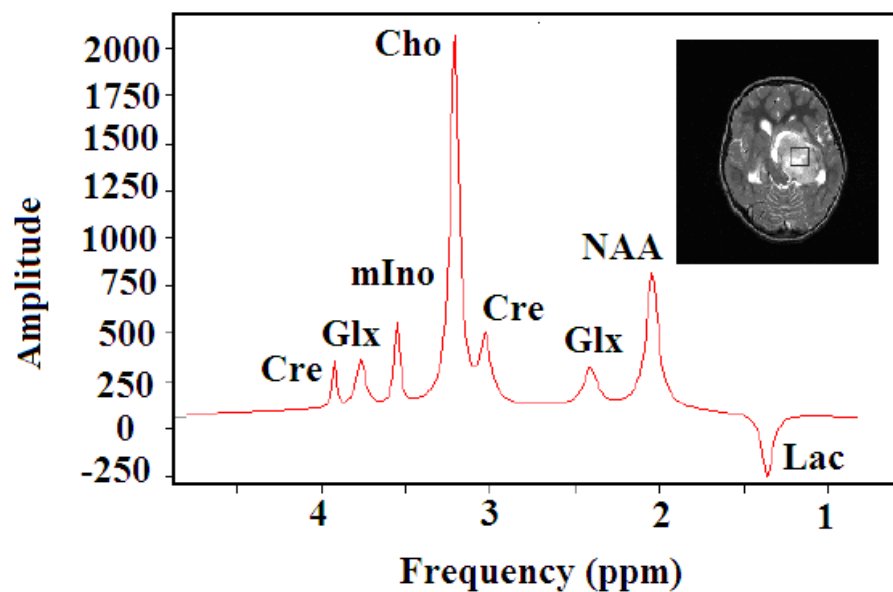


Figure 3: ^1H -MRS estimated spectra of a patient with a pilocytic astrocytoma tumor.

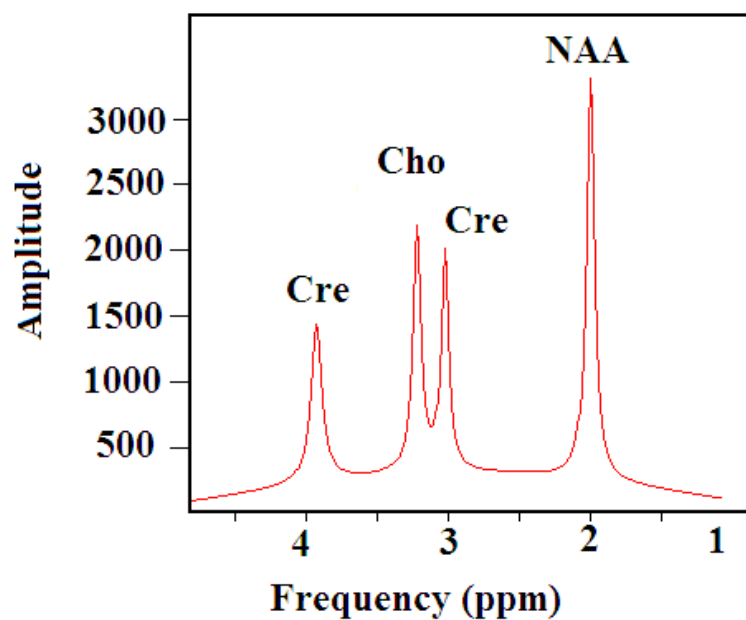


Figure 4: ^1H -MRS estimated spectra of a normal subject.

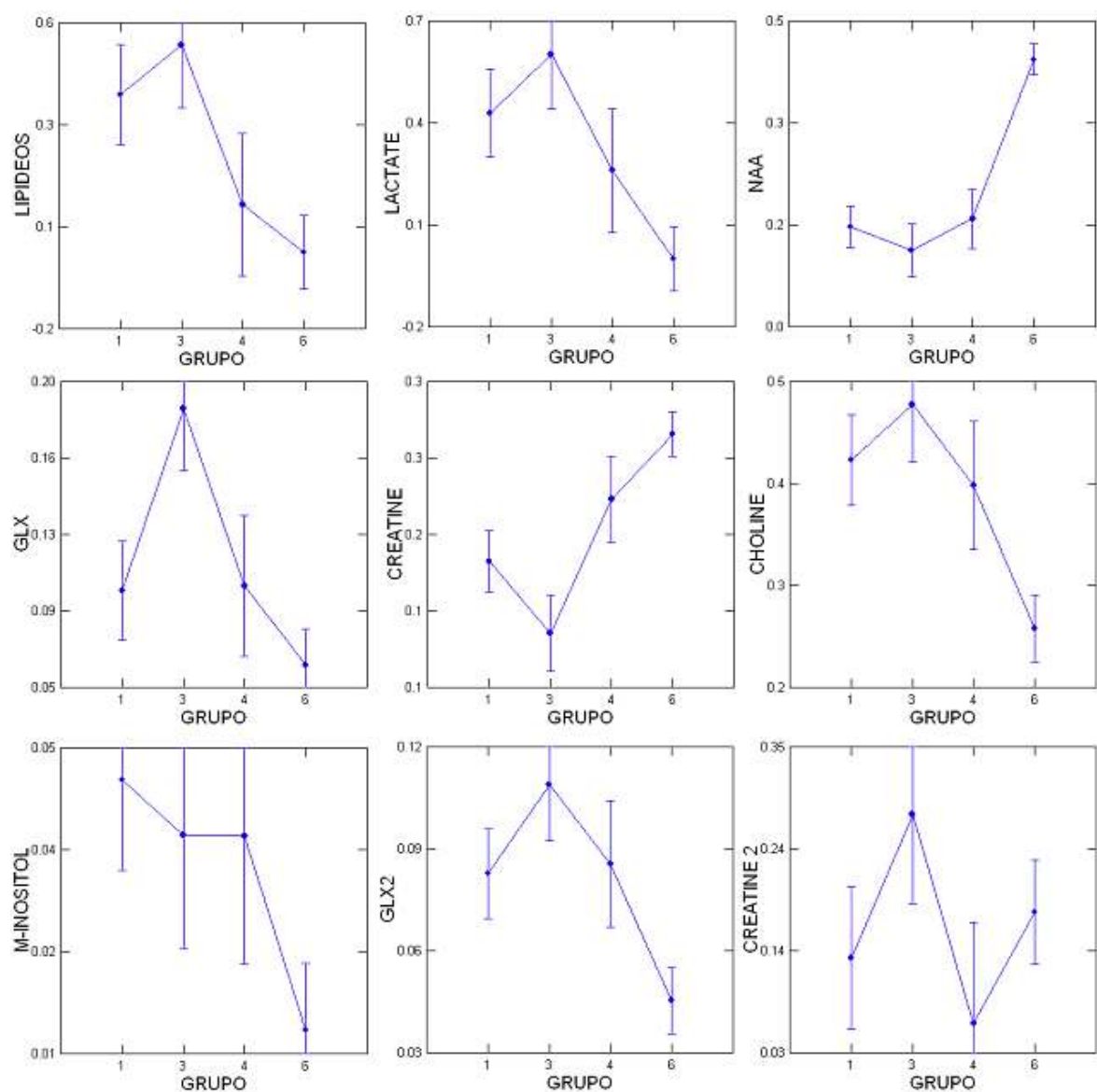


Figure 5: ANOVA test of resonance groups detected with the Automatic method (LIP, LAC, NAA, GLX, CRE, CHO, MINO and GLX2). Graphs show mean peak area for each tumor group (1, 3 and 4) and the control group (6).

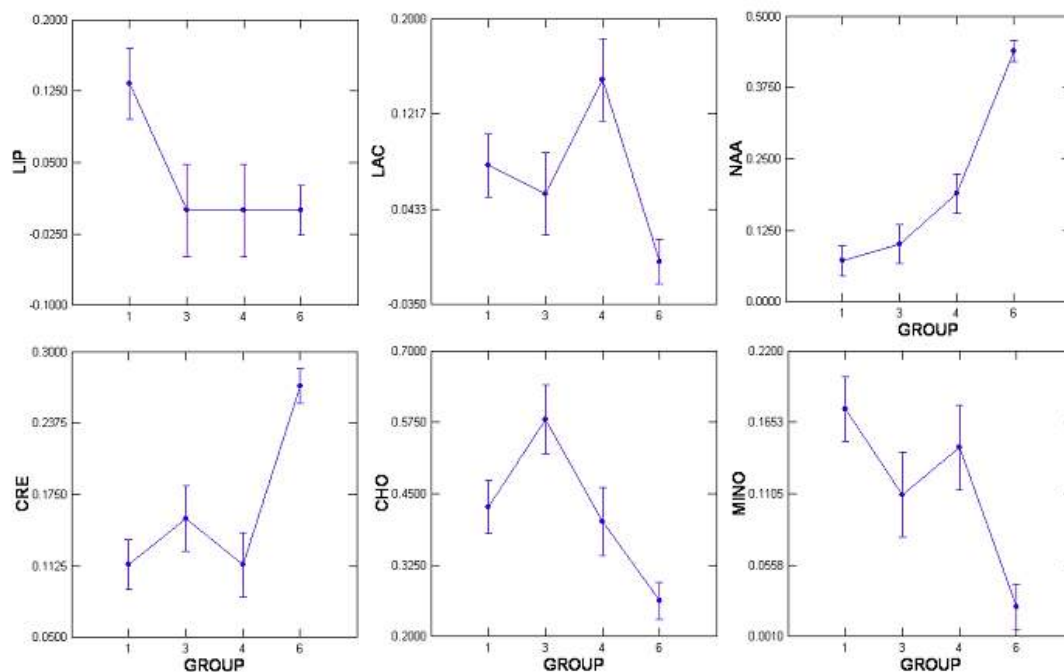


Figure 6: ANOVA test of all resonance groups detected with the Manual method (LIP, LAC, NAA, CRE, CHO, MINO). Graphs show mean peak area for each tumor group (1, 3 and 4) and the control group (6).

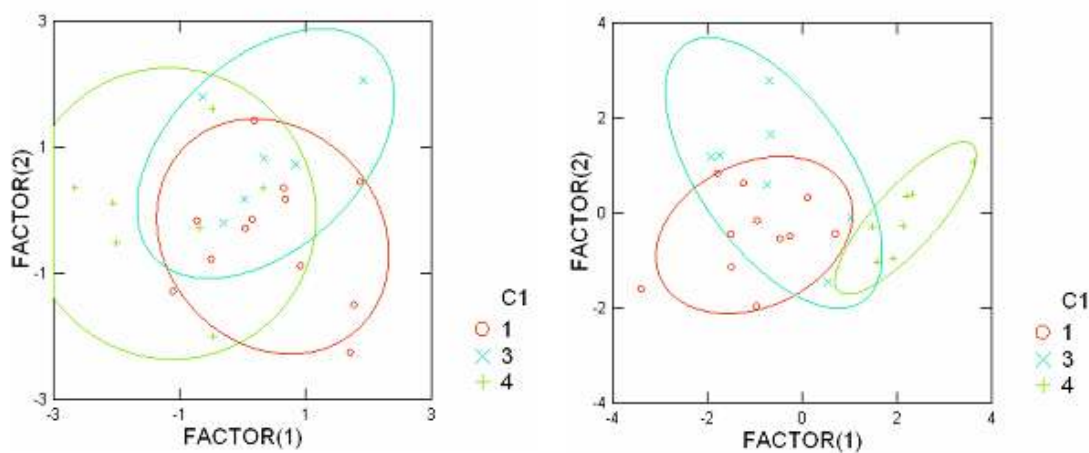


Figure 7: Discriminant distributions among tumor groups for Manual (left) and Automatic (right) methods. Red corresponds to neuroglial tumors (group 1), Blue to non-neuroglial tumors (group 3) and Green to Pilocytic Astrocytomas (group 4).

Estudo de perfis metabólicos ex vivo em tumores cerebrais pediátricos através da técnica HR MAS (High Resolution Magic Angle Spinning Spectroscopy)

Abstract

Brain tumours are the most common solid tumours in children and a major cause of children mortality. The most common paediatric brain tumours are those located in the posterior fossa. These children brain tumours are highly heterogeneous for histology, prognosis and therapeutic response. Subtle biochemical changes can be detected in intact tissues by HR-MAS revealing the status of tumor micro-heterogeneity, observing tumor metabolic alterations before they are morphologically detectable, and correlating them to histopathological features and diagnosis. In this study, we present metabolic profiles by HR-MAS of 20 intact tissue samples from paediatric brain tumours. Types of tumour include medulloblastoma, pilocytic astrocytoma and ependymoma. The metabolic characterization of paediatric brain tumour tissue by HR-MAS NMR spectroscopy provided differential patterns for these tumours. The metabolic composition of the tumour tissue was highly consistent with ‘in vivo’ and ‘ex vivo’ previous studies. Some resonances detected in this work and not previously obtained by in vivo spectroscopy show also some potential as biomarkers of tumour type and grade. Overall, this work suggests that the additional information obtained by NMR metabolomics applied to tissue from paediatric brain tumours may be useful for assessing tumour grade and determining optimum treatment strategies.

Keywords: paediatric brain tumors, medulloblastoma, ependymoma, pilocytic astrocytoma, biochemical profiling, HR-MAS, metabolomics.

Introduction

Brain tumours are the most common solid tumours in children and a major cause of children mortality. The most common paediatric brain tumours include cerebellar astrocytomas, medulloblastomas and ependymomas. These children brain tumours are highly heterogeneous for histology, prognosis and therapeutic response. Medulloblastomas, the most frequent malignant CNS neoplasm in children, usually located in the mid-line, are characterized, like other embryonic neuroepithelial tumours, by undifferentiated cells. They are classified as WHO grade IV, and are among the aggressive types of tumours that affect children [1]. Many medulloblastomas appear on MRI images as solid, contrast-enhancing masses dropping from the vermis into the ventricular cavity of the fourth ventricle [2]. Their metabolic profiles have been characterized mostly by using in-vivo spectroscopy in 1.5 T clinical scanners. In these profiles, higher levels of taurine with respect other type of tumours, seems the predominant metabolic feature [3]. Ependymomas, on the other hand, constitute 5-7% of all CNS intracranial tumours and are predominantly present in the first two decades of life. The fourth ventricle is the most common location for ependymomas. Cellular and anaplastic ependymoma are WHO grades II and III, respectively. Despite that MRS spectra from both, the cellular and anaplastic ependymomas, exhibit considerable heterogeneity, their metabolic differentiator is the relative level of N-acetyl-aspartate (NAA) in comparison to other tumours [3]. Prognosis, treatment strategy and survival rates in cases of medulloblastoma and ependymoma depend on many factors. Children with aggressive tumor pathologies are stratified for therapeutic purposes according to age and metastatic status, factors that will also determine the neurological side effects after surgical resection. Finally, pilocytic astrocytomas are usually indolent tumours that have excellent survival rates. They are WHO grade I tumours which most common anatomic site of origin for pilocytic astrocytomas in childhood is the cerebellum. MRI of pilocytic astrocytomas shows the typical macroscopic appearance of a well-demarcated lesion with a solid nodule and a cystic component [2]. Low levels of creatine, myo-inositol and taurine are the most relevant features of the MRS metabolic profile of pilocytic astrocytoma [3]. Therefore, there are

some in vivo MRS biomarkers for helping in the non invasive diagnosis of children brain tumours. However, in vivo MRS of children brain tumours still exhibits some limitations. First, the tumour size in paediatric patients is often smaller than the optimum voxel size, leading to contamination problems and often for magnetic field susceptibility artefacts. Second, magnetic field strength and, therefore resolution, is limited in clinical environments. Global metabolic profiles by high resolution NMR, performed on tumour tissue obtained at surgery, may support diagnosis when the conventional approaches are not sufficient.

High-Resolution Proton Magnetic Angle Spinning Spectroscopy (^1H HR-MAS) spectroscopy is a powerful technique being broadly applied in metabolomics of intact tissues [4], cells and biofluids [5, 6, 7], which also has been successfully applied to the characterization of different types of cancers [8-10]. Subtle biochemical changes detected in intact tissues (ex-vivo) by ^1H HR-MAS reveal the status of tumor micro-heterogeneity, observe tumor metabolic alterations before they are morphologically detectable, and correlate them to histopathological features and diagnosis. Thus, the precise determination of biochemical and metabolic profiles in intact tissue promises to extend the possibilities of high resolution MR spectroscopy as a medical diagnostic tool. For non-solid or highly viscous liquids, HR-MAS spectroscopy allows the reduction of most of the line broadening associated to restricted molecular motion, chemical shift anisotropy, dipolar coupling and field inhomogeneity by high-rate spinning of the sample at the magic angle $\theta = 54.7^\circ$ [11,12]. The potencial of HR-MAS applications to the study of intact tissues (ex-vivo) has been widely demonstrated and provides further advantages over traditional high resolution liquid NMR of tissues extracts (in vitro) [13]. High resolution NMR on extracts of excised tissues requires large amounts of sample (> 0.25 g of tissue) [14]. Moreover, extraction methods usually discriminate metabolites on the basis of solubility in a particular solvent. Although it has some minor limitations associated mainly to the spinning of the samples (spinning side-bands, spinning degradation effects and spinning temperature gradients among others), HR-MAS is a non-destructive technique, which requires minimal sample preparation, and allows the observation of most of the tissue metabolites and dynamic interactions in an extremely reduced

sample quantity (~mg). This technology can supplement histopathological examination and improve brain tumor diagnostic [10,15]. The similarities between ‘ex-vivo’ and ‘in-vivo’ spectra found in studies of different primary brain tumors in childhood allow a better interpretation of in-vivo MR spectra and increase the clinical potential of the method [16]. HR-MAS spectra generate metabolic profiles that contain information on physiological and pathological status. This approach can be used to define the metabolomic phenotype of a tissue.

The aims of this study are to obtain high resolution NMR metabolic profiles of paediatric medulloblastomas, ependymomas and pilocytic astrocytomas by using ^1H HR-MAS, to further characterize possible differences among these three types of tumors and to identify additional potential diagnosis biomarkers. Twenty pediatric brain tumor samples underwent ^1H HR-MAS spectroscopy measurements. Principal component analysis (PCA) performed over the ^1H HR-MAS spectra region between 0.5 and 4.5 ppm allowed to identify metabolic differences among these types of tumour and provided a set of relevant metabolites, which are proposed as potential childhood brain tumour markers.

Methods

Patient Demographics and tissue samples

Twenty tissue samples of paediatric brain tumours were obtained during craniotomy (see tumour localization in Table 1) at the “Foundation against the childhood neurological diseases”, FLENI (Argentina). The tissue was collected by anatomopathologist for routine histological analysis. The study was approved by the local Ethics Committee and informed parental consent was obtained. The remainder tissue was immediately put in cryogenic vials and snap-frozen in liquid nitrogen. All samples used for histopathological examination were fixed in formalin and embedded in paraffin wax by a pathologist. Routine methods were employed for histopathology studies. All snap-frozen samples for HR-MAS were stored in a freezer at -80 C until further

analysis. Subject ages ranged from 10 months to 15 years. Three types of tumours were included in the study: medulloblastomas, pilocytic astrocytomas, and ependymomas.

HR-MAS sample preparation

Total sample preparation time for each sample prior to NMR detection was less than 5 min. All the material to be in contact with the tissue was pre-cooled to reduce tissue degradation during the sample preparation process. Frozen samples were taken from the ultra-freezer and immediately placed in a cryo-vial and in liquid N₂ until insertion in a 4-mm outer diameter ZrO₂ rotor. The HR-MAS tissue sample was split from the whole frozen tumoral mass submerged in liquid nitrogen. The pre-cooled rotor was filled with cooled D₂O after tissue sample insertion. Cylindrical inserts were used in all the cases, limiting the rotor inner volume to 50 µl. Exceeding D₂O was removed before rotor sealing. Tissue samples were weighted in the rotor before D₂O addition and HR-MAS measurements. The mean sample weight was 24.2 ± 8.8 mg.

HR-MAS spectroscopy

HR-MAS experiments were conducted in a Bruker Avance DRX 600 spectrometer (Valencia, Spain) operating at a ¹H frequency of 600.13 MHz. The instrument was equipped with a 4 mm triple resonance ¹H/¹³C/¹⁵N HR-MAS probe with magnetic field gradients aligned with the magic angle axis.

For all experiments, samples were spun at 5000 Hz to keep the rotation sidebands out of the acquisition window. Lock homogeneity was achieved by extensive coil-shimming using the 1D water pre-saturation experiment in interactive mode as control. Alanine doublet at 1.478 ppm was used for lock homogeneity shimming, as described elsewhere [10]. Nominal temperature of the sample receptacle was kept at 273K, using the cooling of the inlet gas pressures responsible for the sample spinning. This value corresponded to the temperature measured from the thermocouple just below the rotor in the probe. The effect of sample rotation was to slightly

increase this value. Internal measurement using a 100% MeOH sample in a 4 mm rotor spinning at the same frequency provided a corrected internal value of 277K. In order to minimize the effects of tissue degradation, which would alter the metabolite composition of the biopsy, all *ex vivo* spectra were acquired at this temperature of 277K. A total of 10 min was allowed for the temperature of the sample to reach steady state before spectra were acquired. A single-pulse pre-saturation experiment was acquired in all the samples. Number of transients was 256 collected into 32 k data points for all the experiments. Water pre-saturation was used during one second along the recycling delay for solvent signal suppression. Spectral widths were 8000 Hz for ^1H . Before Fourier transformation, the free induction decay was multiplied with a 0.3 Hz exponential line broadening. Chemical shift referencing was performed relative to the Alanine CH_3 signal at 1.478 ppm. For assignment purposes, two-dimensional (2D) homo (2D-TOCSY) and heteronuclear (2D- ^1H , ^{13}C -HSQC) experiments were acquired on some selected samples.

Spectral analysis

All 20 spectra were processed using TopSpin 1.5 (Bruker Biopsin GmbH, Rheinstetten, Germany) and transferred to MATLAB (MathWorks Inc, 2006) using in-house scripts for data analysis. The chemical shift region including resonances between 0.50 and 4.50 ppm (the aliphatic region) was investigated. The spectra were normalized to total aliphatic spectral area to eliminate differences in sample weight. The spectra were binned into 0.01 ppm buckets and statistical analysis was performed using in-house MATLAB scripts and the LIBRA statistical multivariate analysis library [17]. Robust Principal Component Analysis (RPCA) was applied to the set of spectral vectors. Principal components were chosen to explain at least 90% of the variance. The loading plots of the corresponding Principal Components were used to detect most discriminative metabolites. Signals belonging to these selected metabolites were integrated and quantified. One-way-analysis of variance (ANOVA) was used for the determination of statistical significance of the corresponding integrals among medulloblastomas, pilocytic astrocytomas and ependymomas by group means. The significance of the test was determined at the $p < 0.05$ level.

Results and Discussion

Spectral features

All NMR spectra showed narrow line widths and adequate signal-to-noise ratios with well resolved spin-spin multiplicities. Representative ^1H HR-MAS spectra of paediatric medulloblastoma, ependymoma and pilocytic astrocytoma are shown in Figure 1. HR-MAS spectra exhibit higher signal-to-noise ratio and resolution than in vivo spectra, allowing the identification and quantification of many more resonances (Figure 2). Metabolite spin systems and resonances were identified by using literature data [10] and additional 2D homo and multi-nuclear experiments collected in selected samples. The 1D single-pulse pre-saturation experiment provides complete and unambiguous identification of the metabolic pattern characterizing the examined tissues. Spectra with most relevant metabolites labelled are shown in Figures 2, and 3. In all spectra, the aliphatic region had prominent signals of water-soluble metabolites such as lactate, creatine, taurine, phosphoethanolamine, glycerophosphocholine, phosphocholine, and choline. Choline compounds, which are highly overlapped in in-vivo spectra, were resolved by ex-vivo ^1H HR-MAS spectroscopy detecting separately the three different peaks of GPCCho, PCho and free-Cho, being free-Cho and PCho the most prominent signals found in all groups of tumours, suggesting that they are the main contribution to the total signal detected and reported in the in-vivo studies with MRS at low-field strength (1.5-3.0 T). This distinction is important because PCho appears to play some role in carcinogenesis through the overexpression of choline kinase. Multiplets hardly resolved in conventional clinical scanners (1.5-3.0 T), like glutamine and glutamate, were clearly identified by HR-MAS spectroscopy. The endogenous compounds detected in the spectra also include standard amino acids like glycine, leucine, isoleucine, valine, alanine, lysine, asparagine and aspartic acid. Other signals observed included glucose, γ -aminobutyric acid and glycerol. Prominent broad signals belonging to lipids and fatty acid chains were also detected.

The risk of overestimating statistical significance in the study of small datasets may be partially overcome by performing Principal Component Analysis (PCA) of the data. PCA was carried out on the mean-centered normalized ^1H NMR spectra to generate an overview of the variations among groups. Two principal components were calculated for the model with a total of 90% of variance being expressed. While complete discrimination was not achieved, our PCA results exhibits some interesting trends in the differentiation of the types of tumour studied here, as shown in Figure 4. Pilocytic astrocytomas form a well defined group. Interestingly, the different Principal Components PC1 and PC2 seem to help in the discrimination of different pairs of tumours. PC1 provides a good basis for the metabolic differentiation between ependymomas and pilocytic astrocytomas, whereas PC2 provides the basis for distinguishing between medulloblastomas and the rest. Figure 5 show the corresponding PCA loading plots (PC₁ and PC₂). Spectral integration was performed over the most significant signals. Statistically significant intensity values, according to the ANOVA test, are summarize in Table 2.

Metabolic profile of medulloblastoma

Medulloblastomas ^1H HR-MAS spectra were characterized by high levels of taurine, glycerophosphocholine (GPCho), phosphocholine (PCho) and free-choline. An example of ^1H HR-MAS spectra in this type of tumour is presented in Figure 2. Recent studies have shown that taurine can influence defects in nerve blood flow, motor nerve conduction velocity, and nerve sensory thresholds [ref PMID: 16624563]. An increase in taurine has been correlated with malignancy, possibly related to an increased blood perfusion in the aggressive tumour. The increase in choline-containing compounds also suggests a very active tumour. Increased levels of PCho have been related to the ras oncogene activation [19] and to higher total choline levels, which include several choline compounds like PCho and GPCho. Choline compounds, which are involved in membrane synthesis and degradation, are associated with increased membrane turnover and tumour growth [20]. In contrast, levels of NAA, which are typically associated with neuronal viability, are decreased in medulloblastomas, suggesting neuronal death. Myo-inositol also exhibits a slight increase in medulloblastoma with respect other paediatric brain tumours.

Interestingly, medulloblastomas, which are the most aggressive tumours studied here, show the lowest levels of total fatty acids. The interpretation of variations in these signals is far from simple. Mobile lipids are typically associated with malignancy in a variety of paediatric brain tumours [21]. However, they are also correlated with other cell processes like apoptosis, metabolic cell stress and loss of viability [22]. Glucose levels in medulloblastoma are also rather low. Previous studies hypothesized that malignant tumours have a high metabolic rate [23]. Additionally, some reports show correlation between glucose consumptions rate and lactate levels for gliomas, suggesting alterations in glycolysis in brain tumours [24]. However, we did not find statistically significant correlation between the levels of lactate and tumour grade. Our findings support the in-vivo results reported at short echo times regarding levels of taurine as the most discriminant biomarker of medulloblastoma [18]. Overall, the HR-MAS profile of paediatric medulloblastomas provides important metabolic information including an increased membrane turnover, low neuronal viability and glycolysis alterations.

Metabolic profile of ependymoma

Paediatric ependymomas HR-MAS spectra are mainly characterized by intense signals of Glycerol and Myo-inositol. An example of ^1H HR-MAS spectra of a paediatric ependymoma is presented in Figure 3. Myo-inositol is normally elevated in the newborn brain, but its concentration rapidly decreases thereafter. Myo-inositol is also involved in the activation of protein C kinase. This protein leads to production of proteolytic enzymes, which are found more often in malignant and aggressive primary cerebral tumors. Thus, changes in the levels of myo-inositol may predict the histological grade of brain tumors [25]. Other metabolic features observed in paediatric ependymomas include slightly lower levels with respect medulloblastoma of γ -aminobutyric acid (GABA), PCho, and GPCCho. GABA is the principal inhibitory neurotransmitter in the adult mammalian brain and is thought to be involved in cell proliferation, migration and in the promotion of cell survival. Given that GABA participates in the proliferation of various normal cell types, a role in cancer cell proliferation has been considered.

Increased GABA content has been reported in several types of cancers: colon, breast, prostate gastric and glioma [26, 27]. The levels of choline-containing compounds in ependymoma with respect medulloblastoma are in good agreement with lower tumour grade. Interestingly, levels of NAA are very similar to those in medulloblastoma. However, the average age of the ependymoma group is also slightly lower, and therefore, a decreased NAA level is also expected in the normal situation. Another interesting feature of paediatric ependymoma spectra is the high levels of phenylalanine. Although the role of phenylalanine in cancer is unclear, it can be neurotoxic and it can affect the synthesis of inhibitory monoamine neurotransmitters [28]. In general, levels of other important metabolites in the characterization of brain tumours, like fatty acids or amino acids, suggest an intermediate metabolic situation between medulloblastomas and pilocytic astrocytomas. Overall, the metabolic profile of paediatric ependymomas confirms that these tumours are less aggressive than medulloblastoma but more than grade I pilocytic astrocytoma.

Metabolic profile of pilocytic astrocytoma

Pilocytic astrocytomas, WHO grade I brain tumours, show higher concentration of fatty acids, as it can be seen in Figure 1 as a prominent feature. This suggests that fatty acids are not exclusively related to necrosis and apoptosis. Increased fatty acids levels may also represent an alteration in the metabolism of mobile lipids in this particular pathology. Fatty acid metabolism may also contribute to energy production in the developing brain. Other characteristic features of HR-MAS spectra of paediatric pilocytic astrocytoma include low levels of creatine, myo-inositol and taurine, in agreement with previous studies [3]. Additionally, we found that all choline-containing compounds (GPCho, free-Cho and PCho) were in low concentrations in these brain tumours, reflecting their low aggressiveness. Aminoacids like isoleucine, leucine and valine were detected in high concentrations in pilocytic astrocytoma with respect other tumours. NAA, as expected, is present at higher levels in this group in comparison with other types of tumours, suggesting low levels of neuronal destruction. Additionally, and supporting this observation, neurotransmitter and neuroinhibitors are present at higher levels in these tumours. GABA and

specially glutamate show higher concentrations in comparison with the other tumours studied here. Pilocytic astrocytomas display a typical metabolic profile of low grade glial tumours, where neuronal viability is still high and the tumour growth, represented by choline-containing compounds, remains moderate.

Conclusions

In summary, the metabolic characterization of paediatric brain tumour tissue by HR-MAS NMR spectroscopy provided differential patterns for medulloblastoma, ependymoma and pilocytic astrocytoma. The metabolic composition of the tumour tissue was highly consistent with ‘in vivo’ and ‘ex vivo’ previous studies. Agreement between in-vivo and ex-vivo MR spectroscopy suggests that ex-vivo HR-MAS spectroscopy can improve resolution and provide a link between in-vivo spectroscopy and neuropathological analysis of paediatric brain tumours. Particular attention should be placed in Choline compounds and Glutamate metabolites which are unusually resolved in common clinical scanners. Despite the limited number of cases per type of tumor, a trend was observed for the separation of them using Principal Component Analysis (PCA) and the ANOVA test. Some resonances detected in this work and not previously obtained by in vivo spectroscopy showed some potential as biomarkers of tumour type and grade. The corresponding metabolites include GABA, glucose, and some amino acids. However, their metabolic role in the disease is not well understood yet. Other metabolites, typically observed in adult brain tumours, correlate well with tumour grade. Overall, this work suggests that the additional information obtained by NMR metabolomics applied to tissue from paediatric brain tumours may be useful for assessing tumour grade and determining optimum treatment strategies.

Acknowledgments

SAF 2004-06297, HealthAgents and eTUMOUR (FP6 LSH 2002-2.2.0-5) are gratefully acknowledged for financial support. DM gratefully acknowledges a Ramon y Cajal contract from the Ministry of Education of Spain. SC gratefully acknowledges a fellowship from Banco Santander-BANESPA and Brazilian Council for Scientific and Technological Development.

References

- [1] D. N. Louis, H. Ohgaki, O. D. Wiestler, W. K. Cavenee, P. C. Burger, A. Jouvet, B. W. Scheithauer, P. Kleihues. The 2007 WHO Classification of tumors of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007; 114: 97-109.
- [2] M.K. Rosenblum and D. D. Bigner. *Pathology of tumors of the nervous system.* 7th ed. Oxford University Press, 2006.
- [3] A. Panigrahy, M.D. Krieger, I. Gonzalez, X. Liu, J. G. McComb, J.L. Finlay, M.D. Nelson, F. H. Gilles and S. Blüml. Quantitative short echo time ^1H -MR spectroscopy of untreated pediatric brain tumors: preoperative diagnosis and characterization. *Am J Neuroradiol* 27: 560-572.
- [4] G. S. Payne, H. Troy, S. J. Vaidya, J. R. Griffiths, M. O. Leach, Y.-L. Chung. Evaluation of ^{31}P high-resolution magic angle spinning of intact tissue samples. *NMR Biomed* 2006; 19: 5 , 593 – 598.
- [5] Chen JH, Sambol EB, Kennealey PT, O'Connor RB, DeCarolis PL, Cory DG, Singer S. Water suppression without signal loss in HR-MAS ^1H NMR of cells and tissues. *J Magn Reson.* 2004;171(1):143-50.
- [6] Griffin JL, Bollard M, Nicholson JK, Bhakoo K. Spectral profiles of cultured neuronal and glial cells derived from HR MAS (^1H) NMR spectroscopy. *NMR Biomed.* 2002; 15: 375-384.
- [7] Application of orthogonal signal correction to minimize the effects of physical and biological variation in high resolution ^1H NMR spectra of biofluids. *Analist.* 2002; 127 (10): 1283-8.

- [8] Bathen TF, Jensen LR, Sitter B, Fjøsne HE, Halgunset J, Axelson DE, Gribbestad IS, Lundgren S. MR-determined metabolic phenotype of breast cancer in prediction of lymphatic spread, grade, and hormone status. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;104(2):181-9.
- [9] Swanson MG, Zektzer AS, Tabatabai ZL, Simko J, Jarso S, Keshari KR, Schmitt L, Carroll PR, Shinohara K, Vigneron DB, Kurhanewicz J. Quantitative analysis of prostate metabolites using ^1H HR-MAS spectroscopy. *Magn Reson Med.* 2006; 55(6):1257-64.
- [10] Martinez-Bisbal MC, Martí-Bonmatí L, Piquer J, Revert A, Ferrer P, Llácer JL, Piotto M, Assemat O, Celda B. ^1H and ^{13}C HR-MAS spectroscopy of intact biopsy samples ex-vivo and in-vivo ^1H MRS study of human high grade gliomas. *NMR Biomed.* 2004; 17: 191-205.
- [11] Andrew ER, Eades RG. Removal of dipolar broadening of NMR spectra of solids by specimen rotation. *Nature.* 1959; 183: 1802.
- [12] Garroway AN. Magic angle sample spinning of liquids. *J Magn Reson.* 1982; 49: 168-171.
- [13] Waters NJ, Holmes E, Waterfield CJ, Farrant RD, Nicholson JK. NMR and pattern recognition studies on liver extracts and intact livers from rats treated with alpha-naphthylisothiocyanate. *Biochem Pharmacol.* 2002; 64(1):67-77.
- [14] Maxwell RJ, Martinez-Perez I, Cerdan S, Cabanas ME, Arus C, Moreno A, Capdevila A, Ferrer E, Bartomeus F, Aparicio A, Conesa G, Roda JM, Carceller F, Pascual JM, Howells SL, Mazucco R, Griffiths JR. Pattern recognition análisis of ^1H NMR spectra from perchloric acid extracts of human brain tumor biopsias. *Magn Reson Med.* 1998; 39: 869-877.

-
- [15] Cheng LL, Chang IW, Louis DN, Gonzalez RG. Correlation of high-resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy with histopathology of intact human brain tumor specimens. *Cancer Res.* 1998; 58: 1825-1832.
- [16] Tugnoli V, Schenetti L, Mucci A, Nocetti L, Toraci C, Mavilla L, Basso G, Rovati R, Tavani F, Zunarelli E, Righi V, Tosi MR. A comparison between in vivo and ex vivo HR-MAS ¹H MR spectra of a pediatric posterior fossa lesion. *Int J Mol Med.* 2005;16(2):301-7.
- [17] Verboven S, Hubert M, LIBRA: a MATLAB Library for Robust Analysis, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2005; 75, 127-136.
- [18] Peet AC, Lateef S, MacPherson L, Natarajan K, Sgouros S, Grundy RG. Short echo time ¹H magnetic resonance spectroscopy of childhood brain tumours. *Childs Nerv Syst.* 2007; 23:163-169.
- [19] Ronen SM, Jackson LE, Belouèche M, Leach MO. Magnetic resonance detects changes in phosphocholine associated with Ras activation and inhibition in NIH 3T3 cells. *Br J Cancer.* 2001;84(5):691-6.
- [20] Z. Wang, L. N. Sutton, A. Cnaan, J.C. Haselgrove, L. B. Rorke, H. Zhao, L. T. Bilaniuk and R. A. Zimmerman. Proton MR Spectroscopy of pediatric cerebellar tumors. *Am J Neuroradiol* 1995; 16: 1821-1833.
- [21] Peet A, Garala P, MacPherson L, Natarajan K, Sgouros S, Grundy R. Mobile lipids detected by short echo time ¹H magnetic resonance spectroscopy correlate with malignancy in childhood brain tumours. *Neuro-oncol* 2004; 6:471.

- [22] Blankenberg FG, Katsikis PD, Storrs RW, Beaulieu C, Spielman D, Chen JY, Naumovski L, Tait JF. Quantitative analysis of apoptotic cell death using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Blood*. 1997;89(10):3778-86.
- [23] Di Chiro G, DeLaPaz RL, Brooks RA, et al. Glucose utilization of cerebral gliomas measured by [18F] flurodeoxyglucose and positron emission tomography. *Neurology* 1982; 32: 1323-1329.
- [24] Luyten PR, Marien AJH, Heindel W, et al. Metabolic imaging of patients with intracranial tumors: H-1 MR spectroscopic imaging and PET. *Radiology* 1990;176:791–799.
- [25] Castillo M, Smith JK, Kwock L. Correlation of myo-Inositol levels and grading of cerebral astrocytomas. *Am J Neuroradiol* 2000;21:1645–1649.
- [26] Watanabe M, Maemura K, Oki K, Shiraishi N, Shibayama Y, and Katsu K. Gamma-aminobutyric acid (GABA) and cell proliferation: focus on cancer cells. *Histol Histopathol* 2006; 21: 1135-1141.
- [27] Azuma H, Inamoto T, Sakamoto T, Kiyama S, Ubai T, Shinohara Y, Maemura K, Tsuji M, Segawa N, masuda H, Takahara K, Datsuoka Y and Watanabe M. Gamma-aminobutiric acid as a promoting factor of cancer metastasis; induction of matrix metalloproteinase production is potentially its underlying mechanism. *Cancer Research* 2003; 63, 8090-8096.
- [28] Girard N, Wang ZJ, Erbetta A et al (1998) Prognostic value of proton MR spectroscopy of cerebral hemisphere tumours in children. *Neuroradiology* 40:121–125
- [29] J.H. Hwang, G. F. Egnaczyk, E. Ballard, R. Scott, S. K. Holland and W. S. Ball. Proton MR Spectroscopic Characteristics of pediatric pilocytic astrocytomas. *Am J Neuroradiol* 1998; 19: 535-540.

- [30] A. A. Tzika, L. L. Cheng, L. Goumnerova, J. R. Madsen, D. Zurakowski, L. G. Astrakas, M. K. Zarifi, R. M. Scott, D. C. Anthony, R. G. Gonzalez and P. McL. Black. Biochemical characterization of pediatric brain tumors by using in in-vivo and ex-vivo magnetic resonance spectroscopy. *J Neurosurg.* 2002; 96: 1023-1031.
- [31] Z. Wang, R. A. Zimmerman, R. Sauter. Proton MR Spectroscopy of the brain: clinically useful information obtained in assessing CNS disease in children. *AJR.* 1996; 167: 191-194.
- [32] P. J. Scotting, S. L. Thompson, J. A. Punt, D. A. Walkwer. Pediatric brain tumours: an embryological perspective. *Child's Nerv Syst.* 2000; 16: 261-268.
- [33] K. J. Marcus, L. G. Astrakas, D. Zurakowski, M. K. Zarifi, D. Mintzopoulos, T. Young, D. C. Anthony, U. Girolami, P. McL. Black, N. J. Tarbell and A. Aria Tzika. Predicting survival of children with CNS tumors using proton magnetic resonance spectroscopic imaging biomarkers. *Int J Onc.* 2007; 30: 651-657.
- [34] M. Grimmer and W. A. Weiss. Childhood tumors of the nervous system as disorders of normal development. *Curr Opin Pediatr.* 2006; 18: 634-638.
- [35] L. G. Vézia. Neuroradiology of childhood brain tumors: new challenges. *J Neur Onc.* 2005; 75: 243-252.
- [36] A. A. Tzika, L. G., Astrakas, M. K. Zarifi, N. Petridou, T. Young-Poussaint, L. Goumnerova, D. Zurakowski, D. C. Anthony, P. McL. Black. Multiparametric MR assessment of pediatric brain tumors. *Neuroradiol* 2003; 45: 1-10.
- [37] R. Hourani, A. Horská, S. Albayram, L. J. Brant, E. Melhem, K. J. Cohen, P. C. Burger, J. D. Weingart, B. Carson, M. D. Wharam and P. B. Barker. Proton Magnetic Resonance

Spectroscopic Imaging to differentiate between nonneoplastic lesions and brain tumors in children. *J Mag Res Imag.* 2006; 23: 99-107.

[38] L. G. Astrakas, D. Zurakowski, A. A. Tzika, M. K. Zarifi, D. C. Anthony, U. De Cgirolami, N. J. Tarbell and P. McLaren. Noninvasive magnetic resonance spectroscopic imaging biomarkers to predict the clinical grade of pediatric brain tumors. *Clinic Cancer Research.* 2004; 10: 8220-8228.

[39] T. Pietsch, M. D. Taylor and J. T. Rutka. Molecular pathogenesis fo childhood brain tumors. *J Neur Onc.* 2004; 70: 203-215.

[40] K. E. Warren. NMR spectroscopy and pediatric brain tumors. *The Oncolog* 2004; 9: 312-318.

[41] L. N. Sutton, S. L. Wehrli, L. Gennarelli, Z. Wang, R. Zimmerman, K. Bonner and L. B. Rorke. High-resolution ^1H -magnetic resonance spectroscopy of pediatric posterior fossa tumors in vitro. *J Neurosurg.* 1994; 81: 443-448.

[42] J. E. Arle, C. Morriss, Z. J. Wang, R. A. Zimmerman, P.G. Phillips and L. N. Sutton. Prediction of posterior fossa tumor type in children by means of magnetic resonance image properties, spectroscopy, and neural networks. *J Neurosurg.* 1997; 86: 755-761.

Figure Legends

Figure 1. Comparison of typical ^1H HR-MAS spectra for intact tissue from paediatric pilocytic astrocytoma (top), medulloblastoma (middle) and ependymoma (bottom).

Figure 2. Example of ^1H HR-MAS spectrum (A), MR images (B) and MRS in-vivo spectrum (C) for a paediatric medulloblastoma. Most relevant resonances have been labelled in the HR-MAS spectra. Key: Myo-inositol (mIno), lactate (Lac), N-Acetylaspartate (NAA), Taurine (Tau), Fatty acids (Fatty), Isoleucine (Isoleu), Leucine (Leu), Valine (Val), Phosphorylcholine (PCho), GABA, Glutamate (Glu), Glutamine (Gln), Creatine (Cre), Choline (Cho).

Figure 3. Example of ^1H HR-MAS spectrum for intact tissue from paediatric ependymoma.

Figure 4. Scores plot for Principal Component Analysis (PCA) to compare the metabonome of paediatric medulloblastomas (x), ependymomas (white circles) and pilocytic astrocytoma (black squares) based on ^1H HR-MAS 1D presaturation single-pulse experiment

Figure 5. Loadings plots of first (PC1) and second (PC2) Principal Component from PCA over the metabonome of paediatric brain tumours based on ^1H HR-MAS 1D presaturation single-pulse experiment.

Tables**Table 1.** Patient demographics, WHO grade, number of cases (N), mean age of patients gender (F, female and M, male).

Diagnosis	WHO Grade	Localization	N	Age	Gender
Pilocytic Astrocytoma	I	Cerebellum, Frontal, Supracellar region	8	7.5±4.2	4 F/4 M
Ependymoma	II	Ventricular, Cerebellum	3	5.0±3.5	1 F/2 M
Anaplastic Ependymoma	III	Ventricular	2	3.0±0.0	1 F/1 M
Medulloblastoma	IV	Cerebellum, Ventricular	7	7.0±4.4	4 F/3 M

Table 2. Concentration of statistically significant ($p < 0.05$) metabolites detected, frequency and p-values calculated in each case.

Metabolite	δ ppm	Medulloblastoma	Ependymoma	Pilocytic Astrocytoma	p-value
Fatty acids	0.80	0.0382 ± 0.0240	0.0572 ± 0.0194	0.0746 ± 0.0095	0.0046
Isoleucine	0.94	0.0102 ± 0.0027	0.0106 ± 0.0017	0.0137 ± 0.0025	0.0232
Leucine	0.95	0.0107 ± 0.0025	0.0114 ± 0.0021	0.0149 ± 0.0027	0.0115
Leucine	0.96	0.0060 ± 0.0014	0.0069 ± 0.0016	0.0088 ± 0.0016	0.0088
Valine	0.98	0.0039 ± 0.0011	0.0043 ± 0.0011	0.0058 ± 0.0010	0.0066
Isoleucine	1.00	0.0039 ± 0.0015	0.0046 ± 0.0015	0.0065 ± 0.0012	0.0069
Valine	1.04	0.0016 ± 0.0007	0.0021 ± 0.0006	0.0029 ± 0.0004	0.0009
PCho	3.22	0.0682 ± 0.0506	0.0187 ± 0.0028	0.0157 ± 0.0027	0.0074
GABA	1.89	0.0014 ± 0.0006	0.0010 ± 0.0007	0.0022 ± 0.0003	0.0063
Acetate	1.90	0.0017 ± 0.0005	0.0013 ± 0.0007	0.0026 ± 0.0005	0.0032
NAA	2.02	0.0060 ± 0.0013	0.0051 ± 0.0007	0.0089 ± 0.0016	0.0002
Glutamate	2.04	0.0065 ± 0.0013	0.0076 ± 0.0015	0.0110 ± 0.0026	0.0011
Glutamate	2.11	0.0122 ± 0.0027	0.0105 ± 0.0027	0.0149 ± 0.0020	0.0155
Choline	3.20	0.1028 ± 0.0655	0.0490 ± 0.0052	0.0443 ± 0.0096	0.0236
GPCho/PCho	3.23	0.0198 ± 0.0085	0.0178 ± 0.0036	0.0097 ± 0.0043	0.0074
Glycerol	3.64	0.0037 ± 0.0017	0.0058 ± 0.0018	0.0029 ± 0.0006	0.0046
mIno/PCho	3.61	0.0115 ± 0.0084	0.0090 ± 0.0036	0.0037 ± 0.0013	0.0346
Glucosa	3.70	0.0046 ± 0.0026	0.0089 ± 0.0028	0.0085 ± 0.0019	0.0079
Glucosa	3.82	0.0047 ± 0.0017	0.0101 ± 0.0022	0.0099 ± 0.0031	0.0013
Aspartic acid	3.88	0.0018 ± 0.0004	0.0031 ± 0.0012	0.0028 ± 0.0005	0.0105
Glucosa	3.90	0.0026 ± 0.0009	0.0060 ± 0.0015	0.0053 ± 0.0014	0.0003
Creatine	3.93	0.0026 ± 0.0008	0.0060 ± 0.0011	0.0052 ± 0.0013	0.0006
Serine	3.95	0.0047 ± 0.0014	0.0070 ± 0.0015	0.0057 ± 0.0012	0.0313
Serine	3.98	0.0123 ± 0.0043	0.0059 ± 0.0013	0.0012 ± 0.0013	0.0002

Phenylalanine	4.00	0.0024 ± 0.0005	0.0034 ± 0.0010	0.0020 ± 0.0006	0.0059
mIno/Cho	4.05	0.0102 ± 0.0070	0.0185 ± 0.0065	0.0059 ± 0.0028	0.0035
PCho	4.18	0.0133 ± 0.0094	0.0067 ± 0.0013	0.0035 ± 0.0012	0.0130
Taurine	3.26	0.0244 ± 0.0118	0.0164 ± 0.0028	0.0138 ± 0.0023	0.0341
Taurine	3.42	0.0084 ± 0.0072	0.0018 ± 0.0017	0.0006 ± 0.0006	0.0077

Figures

Figure 1.

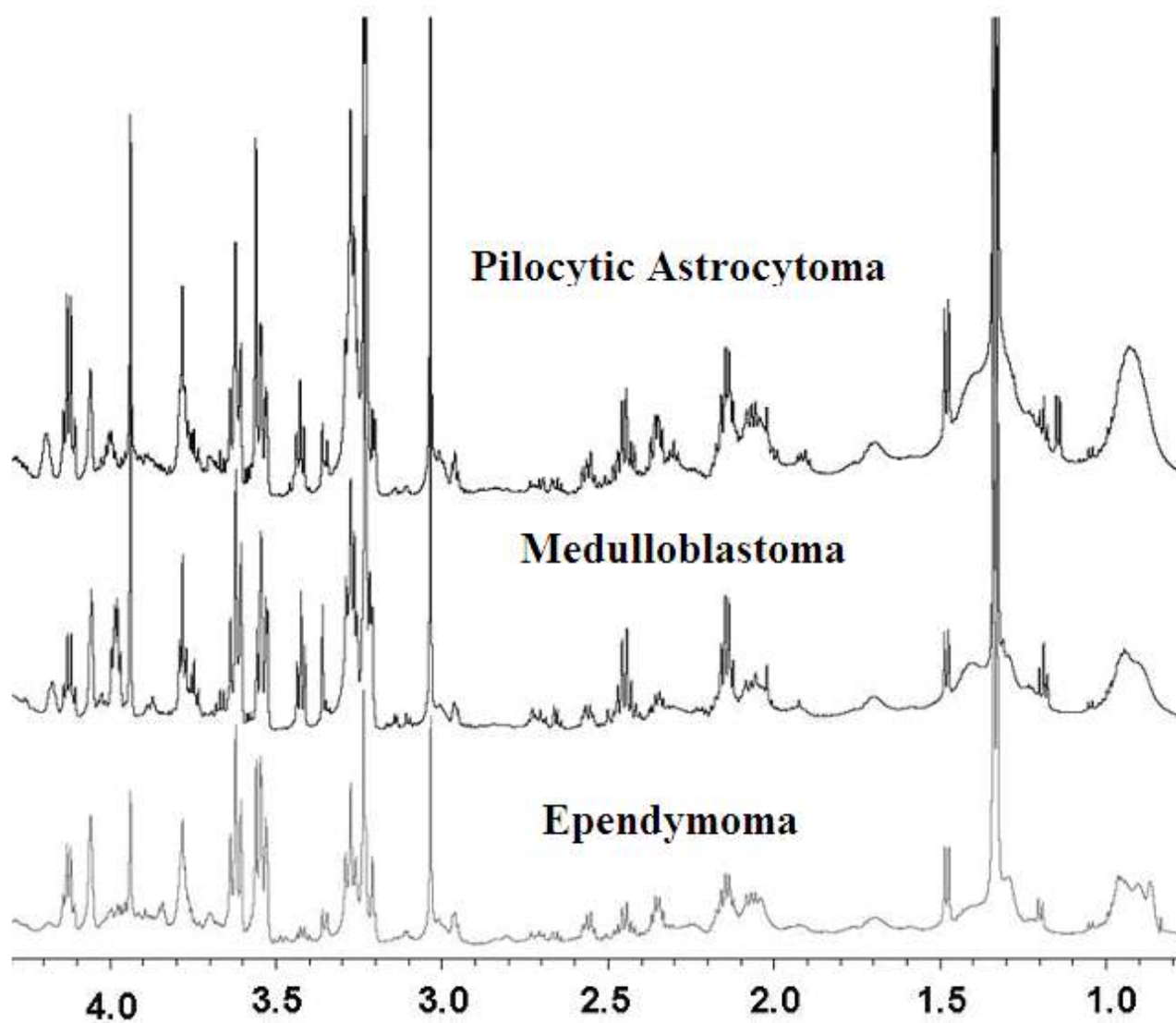


Figure 2

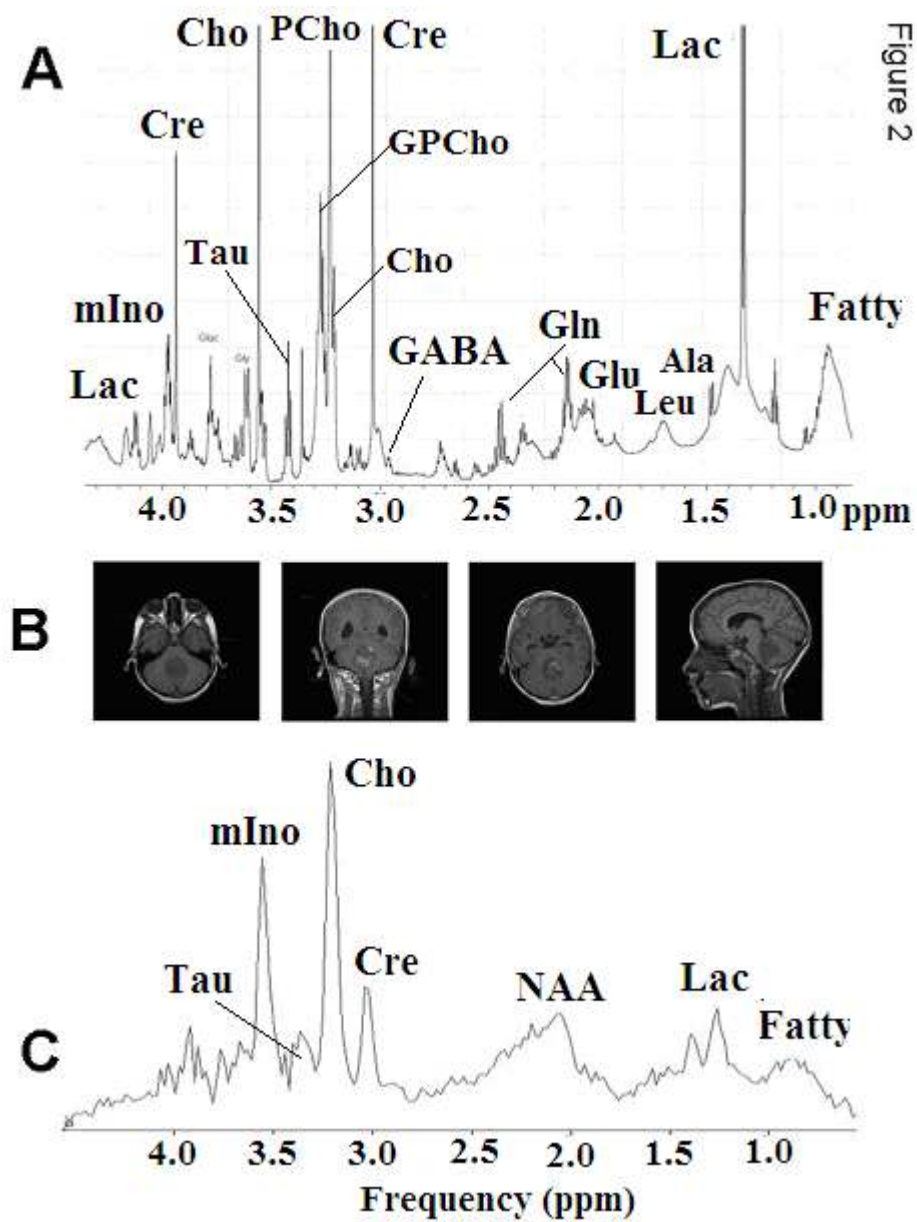


Figure 3

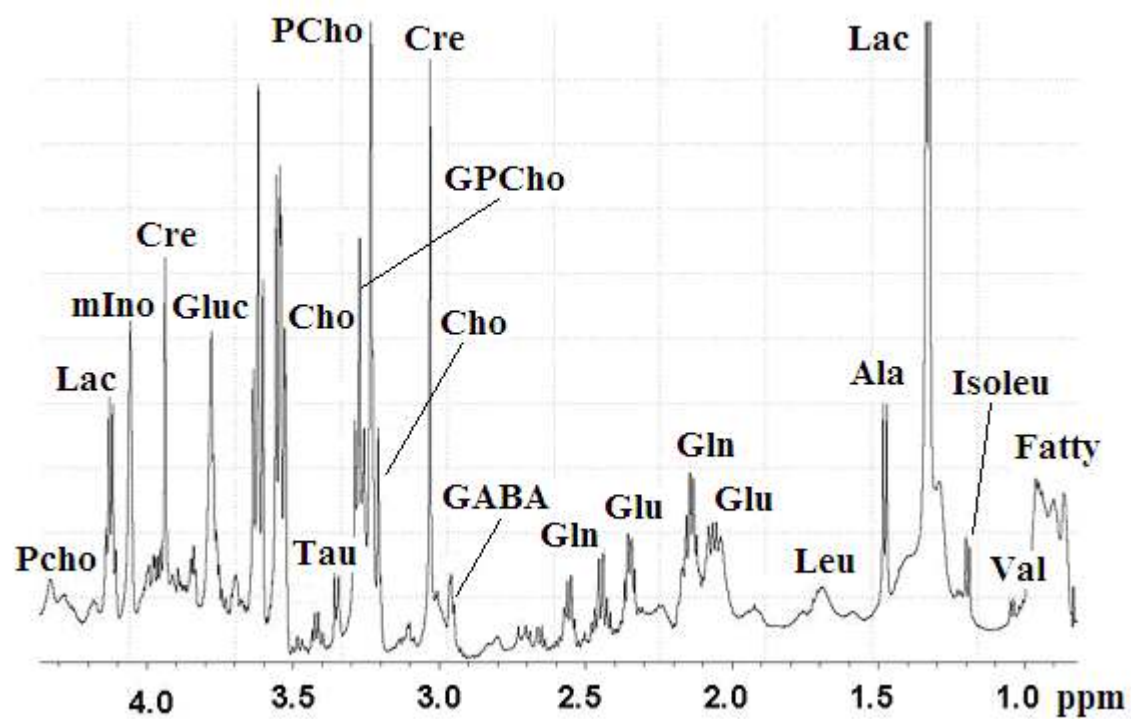
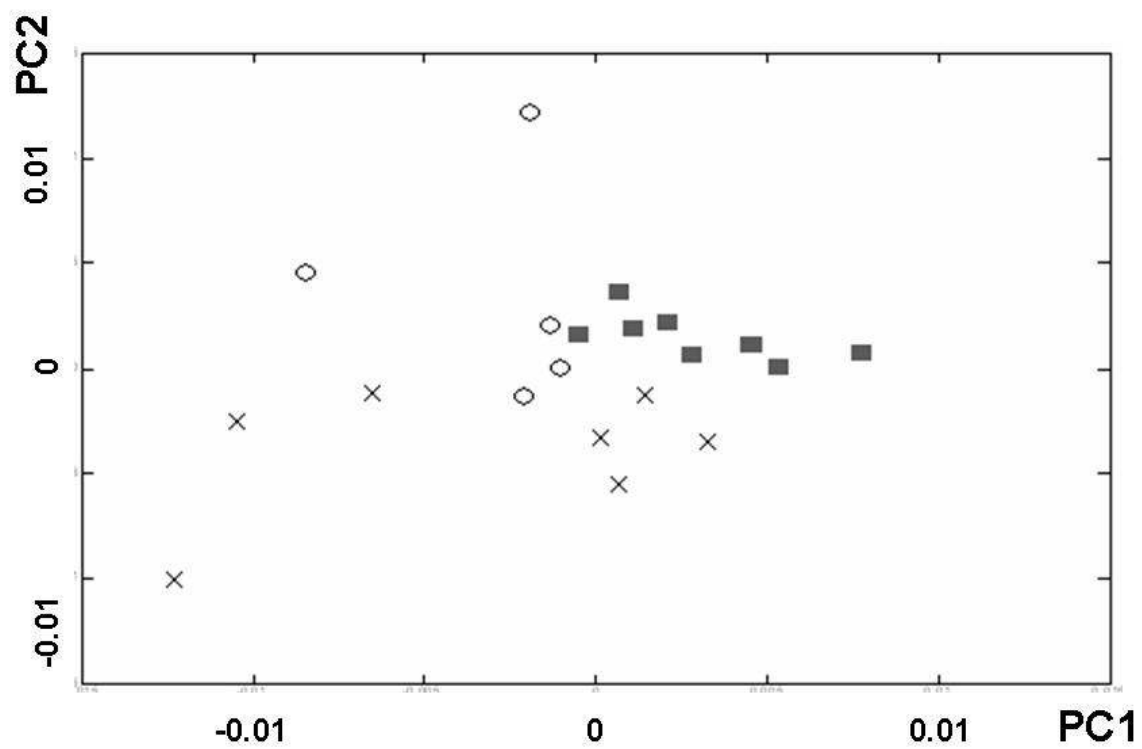
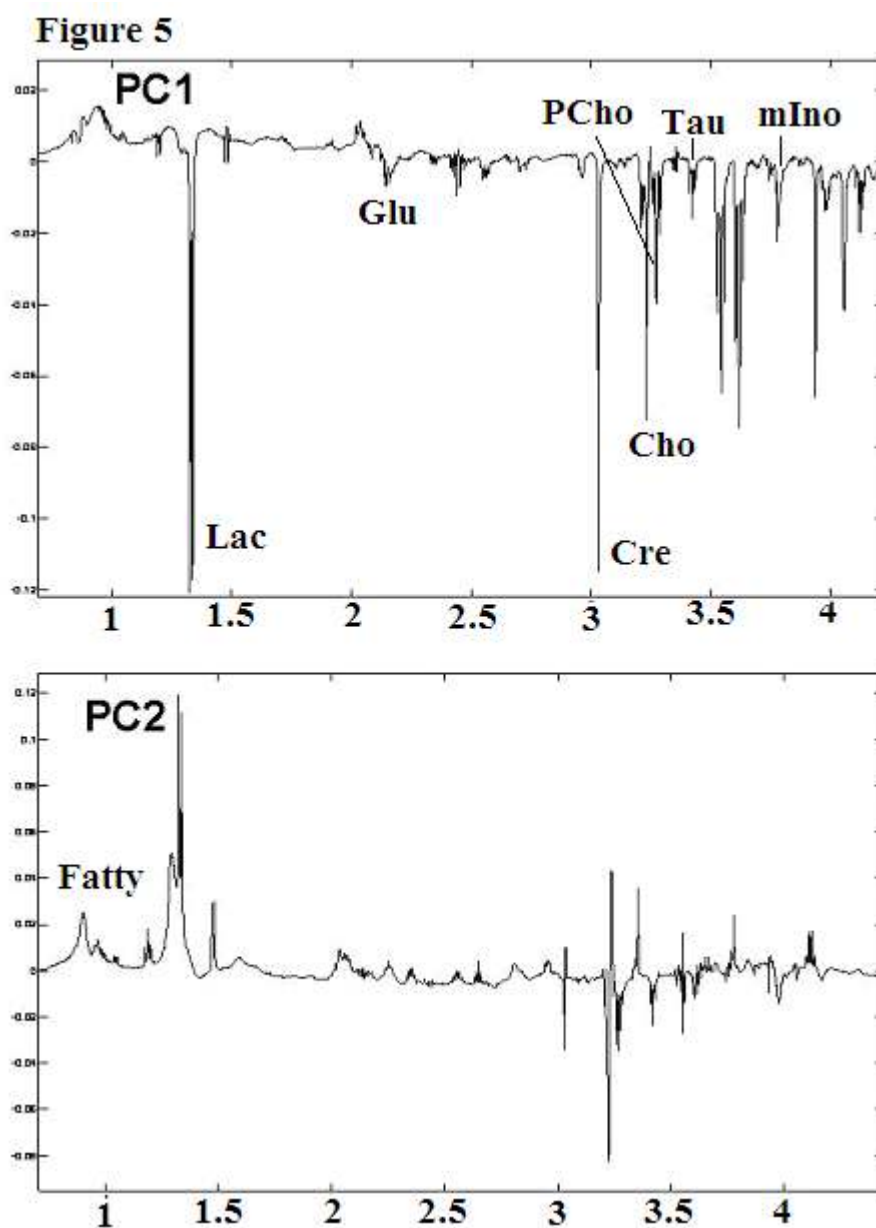


Figure 4



Referências Bibliográficas

- [1] <http://sermn02.uab.es/mrui/>
- [2] Faria, A. Tese Doutorado: Estudo da bioquímica dos tumores do sistema nervoso central através da espectroscopia de hidrogênio por ressonância magnética. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, 2004.
- [3] Preul MC, Caramanos Z, Collins DL et al. Accurate, noninvasive diagnosis of human brain tumors by using proton magnetic resonance spectroscopy. *Nature Med* 1996; 2(3):323-325.
- [4] Del Sole A, Falini A, Ravasi L et al. Anatomical and biochemical investigation of primary brain tumours. *Eur J Nucl Med* 2001; 28(12):1851-72.
- [5] Simonetti AW, Melssen WJ, Szabo F, van Asten JJ, Heerschap A and Buydens LM. Combination of feature-reduced MR spectroscopic and MR imaging data for improved brain tumor classification. *NMR Biomed.* 2005; 18:34-43.
- [6] Lukas L, Devos A, Suykens JA, Vanhamme L, Howe FA, Majós C, Moreno-Torres A, Van der Graaf M, Tate AR, Arús C, Van Huffel S. Brain tumor classification based on long echo proton MRS signals. *Artificial Intelligence in Medicine* 2004; 31:73-89.
- [7] Tate AR, Majós C, Moreno A, Howe FA, Griffiths JR, Arús C. Automated classification of short echo time in in-vivo ^1H brain tumor spectra: A multicenter study. *NMR in Biomedicine* 2003; 49:29-36
- [8] Majós C, Julià-Sapó M, Alonso J, Serrallonga M, Aguilera C, Acebes JJ, Arús C, Gili J. Brain tumor classification by proton MR spectroscopy: comparison of diagnostic accuracy at short and long TE. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2004; 25(10):1696-1704.
- [9] Lehnhardt FG, Bock C, Röhn G, Ernestus RI, Hoehn M. Metabolic differences between primary and recurrent human brain tumors: a ^1H NMR spectroscopic investigation. *NMR Biomed.* 2005; 18(6):371-82.

- [10] Demaerel P, Johannik K, Van Hecke P, et al. Localized ^1H NMR spectroscopy in fifty cases of newly diagnosed intracranial tumors. *J Comput Assist Tomogr.* 1991; 15(1):67-76.
- [11] Vanhamme L, Sundin T, Van Hecke P, Van Huffel S. MR spectroscopy quantitation: a review of time domain methods. *NMR in Biomedicine* 2001; 14:233-246.
- [12] Mierisov'a S, Ala-Korpela M. MR spectroscopy quantitation: a review of frequency domain methods. *NMR Biomed.* 2001;14:247-259.
- [13] de Graaf RA. *In vivo NMR spectroscopy: Principles and Techniques.* John Wiley and Sons. New York, US, 1998.
- [14] Haacke EM, Brown RW, Thompson MR, Venkatesan R. *Magnetic Resonance Imaging: Physical Principles and Sequence Design.* John Wiley and Sons, New York, US, 1999.
- [15] Bushberg JT, Seibert JA, Leidholdt EM, Boone JM. *The Essential Physics of Medical Imaging.* 2nd. ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, US, 2001.
- [16] Gillard JH, Waldman AD, Barker PB. *Clinical MR Neuroimaging: Diffusion, Perfusion and Spectroscopy.* Cambridge University Press. 2005; Cap. 1-3,18,19.
- [17] Liang ZP, Lauterbur PC. *Principles of Magnetic Resonance Imaging: A signal Processing Perspective.* IEEE Press in Biomedical Engineering, New York, 2000.
- [18] Dick JD, RiddleWR, Clarke GD. Proton Magnetic Resonance Spectroscopy in the brain: Report of AAPM MR Task Group No. 9. *Med. Phys.* 29(9), 2002.
- [19] Govindaraju V, Young K, Maudsley AA. Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR in Biomedicine* 2000; 13:129-153.
- [20] Herminghaus S, Pilatus U, Moller-Hartmann W, et al. Increased choline levels coincide with enhanced proliferative activity of human neuroepithelial brain tumors. *NMR Biomed* 2002; 15: 385-392.
- [21] Shimizu H, Kumabe T, Shirane R, Yoshimoto. Correlation between choline level measured by proton MR spectroscopy and ki-67 labelling index in gliomas. *AJNR Am J Neuroradiol* 2000; 21: 659-665.
- [22] Tedeschi G, Lundbom N, Raman R, et al. Increased choline signal coinciding with malignant degeneration of cerebral gliomas: a serial proton magnetic resonance spectroscopy imaging study. *J Neurosurg* 1997; 87: 516-24.
- [23] Miller BL: A review of chemical issues in ^1H NMR spectroscopy: N-acetyl-aspartate, creatine and choline. *NMR Biomed* 4:47-52, 1991

- [24] Tzika AA, Vajapeyam S, Barnes PD: Multivoxel proton MR spectroscopy and hemodynamic MR imaging of childhood brain tumors: Preliminary observations. *Am J Neuroradiol* 18:203-218, 1997.
- [25] Christiansen P, Henriksen O, Stubgaard M, et al: In vivo quantification of brain metabolites by ¹H-MRS using water as an internal standard. *Magn Reson Imaging* 11:107-118, 1993.
- [26] Bendszuz M, Warmuth-Metz M, Burger R. Diagnosing dural metastasis: the value of ¹H Magnetic Resonance Spectroscopy. *Neuroradiology*, 43: 285-289, 2001.
- [27] Birken DL, Oldendorf WH: N-acetyl-L-aspartic acid: A literature review of a compound prominent in ¹H-NMR spectroscopic studies of the brain. *Neurosci Biobehav Rev* 13:23-31, 1989.
- [28] Tallan HH. Studies on the distribution of N-acetyl-L-aspartic acid in brain. *J Biol Chem* 1957; 224: 41-45.
- [29] Castillo M, Smith JK, Kwok L. Correlation of myo-inositol levels and grading of cerebral astrocytomas. *Am J Neuroradiol* 2000; 21: 1645-1649.
- [30] Majós C. Tese de Doutorado: Espectroscopia por Resonancia Magnética de Protón en el diagnóstico de tumores cerebrales. Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona, 1999.
- [31] Yu X, Liu Z, Tian Z, et al. Stereotactic biopsy for intracranial spaceoccupying lesions: clinical analysis of 550 cases. *Stereotact Funct Neurosurg* 2000; 75: 103-108.
- [32] Burtcher IM, Skagerberg G, Geijer B, Englund E, Ståhlberg F, Holtås S. Proton MR spectroscopy and preoperative diagnostic accuracy: an evaluation of intracranial mass lesions characterized by stereotactic biopsy findings. *AJNR Am J Neuroradiol* 2000; 21: 84-93.
- [33] Ross B, Michaelis T. Clinical applications of magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Q* 1994; 10: 191-247.
- [34] Murphy M, Loosemore A, Clifton AG, et al. The contribution of proton magnetic resonance spectroscopy (¹H MRS) to clinical brain tumour diagnosis. *Br J Neurosurg* 2002; 16: 329-334.
- [35] Preul MC, Caramanos Z, Leblanc R, Villemure JG, Arnold DL. Using pattern recognition of in vivo proton MRSI data to improve the diagnosis and surgical management of patients with brain tumors. *NMR Biomed* 1998; 11: 192-200.
- [36] Dowling C, Bollen AW, Noworolski SM, et al. Preoperative proton MR spectroscopy imaging of brain tumors: correlation with histopathologic analysis of resection specimens. *AJNR Am J Neuroradiol* 2001; 22: 604- 612.

- [37] Bruhn H, Frahm J, Gyngell ML, et al. Noninvasive differentiation of tumors with use of localized H-1 MR spectroscopy in vivo: Initial experience in patients with cerebral tumors. *Radiology* 1989; 17: 541-548.
- [38] Lenkinski RE. MR spectroscopy: Clinical tool or research probe? *Acad Radiol* 2001; 8:567-570.
- [39] Fulham MJ, Bizzi A, Dietz MJ, et al: Mapping of brain tumor metabolites with proton MR spectroscopic imaging: Clinical relevance. *Radiology* 185:675-686, 1992.
- [40] Soher BJ, van Zijl PC, Duyn JH, et al: Quantitative proton MR spectroscopic imaging of the human brain. *Magn Reson Med* 35:356-363, 1996.
- [41] Sijens PE, Oudker KM. 1H Chemical shift imaging characterization of human brain tumor and edema. *Er. Radiol.* 12: 2056-2061, 2002.
- [42] Zhu XP, Young K, Ebel A, Soher BJ, et al. Robust analysis of short echo time 1H MRSI of human brain. *Magnetic Resonance in Medicine*. 55: 706-711, 2006.
- [43] Novotny E, Ashwal S, Shevell M: Proton magnetic resonance spectroscopy: An emerging technology in pediatric neurology research. *Pediatr Res* 44:1-10, 1998.
- [44] Peet AC, Lateef S, MacPherson L, Natarajan K, Sgouros S, Grundy RG. Short echo time 1H magnetic resonance spectroscopy of childhood brain tumours. *Childs Nerv Syst*. 2007; 23:163-169.
- [45] Opstad KS, Ladroue C, Bell BA, Griffiths R and Howe FA. Linear discriminant analysis of brain tumor H MR spectra: a comparison of classification using whole spectra versus metabolite quantification. *NMR in Biomedicine* 2007; 20:763-770.
- [46] Ursenius JP, Tuohimetsä S, Vainio P, Ala-Korpela M, Hiltunen Y, Kauppinen RA. Automated classification of human brain tumours by neural network analysis using in vivo 1H magnetic resonance spectroscopic metabolite phenotypes. *NeuroReport* 1996; 7: 1597-1600.
- [47] Meyerand ME, Pipas JM, Mamourian A, Tosteson TD, Dunn JF. Classification of biopsy-confirmed brain tumors using single-voxel MR spectroscopy. *AJNR Am J Neuroradiol* 1999; 20: 117-123.
- [48] Tate AR, Griffiths JR, Martínez-Pérez I, et al. Towards a method for automated classification of 1H MRS spectra from brain tumours. *NMR Biomed* 1998; 11: 177-191.
- [49] [http : //carbon.uab.es/INTERPRET/](http://carbon.uab.es/INTERPRET/)
- [50] www.etumour.net/

- [51] De Graaf AA and Bov´ee WMMJ. Improved quantification of in vivo ^1H NMR spectra by optimization of signal acquisition and processing and by incorporation of prior knowledge into the spectral fitting. *Magnetic Resonance in Medicine* 1990; 15: 305-319.
- [52] LCModel and LCMgui User Manual. Stephen Provencher, 2008.
- [53] Vanhamme L, Van Den Boogaart A and Van Huffel S. Improved method for accurate and efficient quantification of MRS data with use of prior knowledge. *Journal of Magnetic Resonance* 1997; 129:35-43.
- [54] Matthes R. ICNIRP Statement Medical Magnetic Resonance (MR) Procedures: Protection of Patients. The international Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. *Health Physics*. 87:2, 2004.
- [55] Zandt HJA, van der Graaf M, Heerschap A. Commom Processing of in-vivo MR spectra. *NMR Biomed*. 14: 224-232, 2001.
- [56] Gudmund R. I., Norpoth H. *Analysis of variance*. Sage, Newbury Park, 1987.
- [57] Altman DG. *Practical statistics for medical research*. Chapman and Hall, London, 1991.
- [58] Campbell MJ and Machin D. *Medical statistics: a commonsense approach*. John Wiley, Chichester, 1999.
- [59] McLachlan GJ. *Discriminant analysis and statistical pattern recognition*. John Wiley, New York, 1992.
- [60] www.systat.com
- [61] [http : //www.statsoft.com/textbook/stathome.html](http://www.statsoft.com/textbook/stathome.html), [http ://faculty.chass.ncsu.edu/garson/PA765/statnote.htm](http://faculty.chass.ncsu.edu/garson/PA765/statnote.htm)
- [62] www.anatpat.unicamp.br
- [63] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO Classification for tumors of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007; 114:97-109.
- [64] Di Costanzo A, Scarabino T, Trojsi F, Giannatempo GM, Popolizio T, Catapano D, Bonavita S, Maggialelli N, Tosetti M, Salvolini U, d´ Angelo VA, Tedeschi G. Multi-parametric 3T MR approach to the assessment of cerebral gliomas: tumor extent and malignancy. *Neuroradiology* 2006; 48(9):622-31.
- [65] Howe FA, Barton SJ, Cudlip SA, Stubbs M, Saunders DE, Murphy M, Wilkins P, Opstad KS, Doyle VL, McLean MA, Bell BA, and Griffiths JR. Metabolic Profiles of Human Brain Tumors Using Quantitative In Vivo ^1H Magnetic Resonance Spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine* 2003; 49:223-232.

- [66] Alger JR, Frank JA, Bizzi A, et al. Metabolism of human gliomas: assessment with H-1 MR spectroscopy and F-18 fluorodeoxyglucose PET. *Radiology* 1990; 177: 633-641.
- [67] Cendes F. Proton MRS: lactate. *Adv. Neurol.* 83:247-251, 2000.
- [68] Sutton LN, Wang Z, Gusnardi D. Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Pediatric Brain Tumors. *Neurosurgery* 31: 195-201, 1992.
- [69] Bendszus M, Warmuth-Metz M, Burger R, Klein R, Tonn JC, Solymosi L. Diagnosing dural metastases: the value of 1H magnetic resonance spectroscopy. *Neuroradiology* 2001; 43: 285-289.
- [70] Sjøbakk TE, Johansen R, Bathen TF, Sonnewald U, Kvistad KA, Lundgren S, Gribbestad IS. Metabolic profiling of human brain metastases using in vivo proton MR spectroscopy at 3T. *BMC Cancer.* 2007; 7:141.
- [71] Ishimaru H, Morikawa M, Iwanaga S, Kaminogo M, Ochi M, Hayashi K. Differentiation between high-grade glioma and metastatic brain tumor using single-voxel proton MR spectroscopy. *Eur Radiol* 2001; 11: 1784- 1791.
- [72] Paulus W, Pfeiffer J. Intratumoral histologic heterogeneity of gliomas. A quantitative study. *Cancer* 1989; 64: 442-447.
- [73] KaminogoM, Ishimaru H, Morikawa M, et al. Diagnostic potential of short echo time MR spectroscopy of gliomas with single-voxel and pointresolved spatially localised proton spectroscopy of brain. *Neuroradiology* 2001; 43: 353-363.
- [74] Negendank WG, Sauter R, Brown TR, et al. Proton magnetic resonance spectroscopy in patients with glial tumors: a multicenter study. *J Neurosurg* 1996; 84: 449-458.
- [75] Roser W, Hagberg G, Mader I, et al. Assignment of glial brain tumors in humans by in vivo 1H-magnetic resonance spectroscopy and multidimensional metabolic classification. *MAGMA* 1997; 5: 179-183.
- [76] Carpinelli G, Carapella CM, Palombi L, Raus L, Caroli F, Podo F. Differentiation of glioblastoma multiforme from astrocytomas by in vitro 1H MRS analysis of human brain tumors. *Anticancer Res* 1996; 16: 1559- 1564.
- [77] Arnold DL, Shoubridge EA, Villemure JG, FreindelW. Proton and phosphorus magnetic resonance spectroscopy of human astrocytomas in vivo: preliminary observations on tumor grading. *NMR Biomed* 1990; 3: 184-189.
- [78] Kuesel AC, Sutherland GR, Halliday W, Smith ICP. 1H MRS of high grade astrocytomas: mobile lipid accumulation in necrotic tissue. *NMR Biomed* 1994; 7: 149-155.
- [79] Castillo M, Smith JK, Kwock L. Correlation of myo-inositol levels and grading of cerebral astrocytomas. *Am Journal of Neuroradiology.* 21:1645-1649, 2000.

- [80] Maxwell RJ, Martinez-Pérez I, Cerdán S, et al. Pattern recognition analysis of ¹H NMR spectra from perchloric acid extracts of human brain tumour biopsies. *Magn Reson Med* 1998; 39: 869-877.
- [81] Shiino A, Nakasu S, Matsuda M, Handa J, Morikawa S, Inubushi T. Noninvasive evaluation of the malignant potential of intracranial meningiomas performed using proton magnetic resonance spectroscopy. *J Neurosurg* 1999; 91: 928-934.
- [82] Ginsberg LE. Radiology of meningiomas. *J Neurooncol* 1996; 29: 229-238.
- [83] Russell EJ, George AE, Kritcheff MD, Budzilovich G. Atypical computed tomographic features of intracranial meningioma. *Radiology* 1980; 135: 673-682.
- [84] Osborn AG. Meningiomas and other non-glial neoplasms. In: Osborn AG, ed. *Diagnostic neuroradiology*. St Louis, Mo: Mosby, 1994; 613-620.
- [85] Barba I, Moreno A, Martínez-Pérez I, et al. Magnetic resonance spectroscopy of brain hemangiopericytomas: high myoinositol concentrations and discrimination from meningiomas. *J Neurosurg* 2001; 94: 55-60.
- [86] Cho YD, Choi GH, Lee SP, Kim JK. ¹H-MRS metabolic patterns for distinguishing between meningiomas and other brain tumors. *Magn Reson Imaging* 2003; 21(6):663-72.
- [87] Morales H, Kwok L, Castillo M. Magnetic resonance imaging and spectroscopy of pilomyxoid astrocytomas: case reports and comparison with pilocytic astrocytomas. *J Comput Assist Tomogr.* 2007; 31(5):682-687.
- [88] Manton DJ, Lowry M, Blackband SJ, Horsman A. Determination of proton metabolite concentrations and relaxation parameters in normal human brain and intracranial tumors. *NMR in Biomed* 1995; 8: 104-112.
- [89] Sijens PE, Levendag PC, Vecht CJ, van Dijk P, Oudkerk M. ¹H MR spectroscopy detection of lipids and lactate in metastatic brain tumors. *NMR in Biomed* 1996; 9: 65-71.
- [90] Sijens PE, Knopp MV, Brunetti A, et al. ¹HMR spectroscopy in patients with metastatic brain tumors: a multicenter study. *Magn Reson Med* 1995; 33: 818-826.
- [91] Meyers SP, Kemp SS, Tarr RW. MR Imaging features of medulloblastomas. *AJR Am J Roentgenol* 1992; 158: 859-865.
- [92] Bourgouin PM, Tampieri D, Grahovac SZ, Léger C, Del Carpio R, Melançon D. CT and MR imaging findings in adults with cerebellar medulloblastoma: Comparison with findings in children. *AJR Am J Roentgenol* 1992; 159: 609-612.
- [93] Koci TM, Chiang F, Mehringer CM, et al. Adult cerebellar medulloblastoma: imaging features with emphasis on MR findings. *AJNR Am J Neuroradiol* 1993; 14: 929-939.

- [94] Brandes AA, Palmisano V, Monfardini S. Medulloblastoma in adults: clinical characteristics and treatment. *Cancer Treatment Reviews* 1999; 25: 3-12.

Referências Adicionais

- [95] van den Boogaart A. Quantitative data analysis of in vivo MRS data sets. *Magn Reson Chem* 1997; 35: S146-S152.
- [96] Kugel H, Heindel W, Ernestus RI, et al. Human brain tumors: spectral patterns detected with localized H-1 MR spectroscopy. *Radiology* 1992; 183: 701-709.
- [97] Kinoshita Y, Kajiwara H, Yokota A, Koga Y. Proton magnetic resonance spectroscopy of brain tumors: an in vitro study. *Neurosurgery* 1994; 35: 606-614.
- [98] Bernstein M, Parrent AG. Complications of CT-guided stereotactic biopsy of intra-axial brain brain lesions. *J Neurosurg* 1994; 81: 165-168.
- [99] Ott D, Henning J, Ernst T. Human brain tumors: assessment with in vitro proton MR spectroscopy. *Radiology* 1993; 186: 745-752.
- [100] Mittler MA, Walters BC, Stopa EG. Observer reliability in histological grading of astrocytoma stereotactic biopsies. *J Neurosurg* 1996; 85: 1091- 1094.
- [101] Poptani H, Kaartinen J, Gupta RK, Niemitz M, Hiltunen Y, Kauppinen. Diagnostic assessment of non-neoplastic brain disorders in vivo using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and artificial neural networks. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999; 125: 343-349.
- [102] Gill SS, Thomas DG, Van Bruggen N, et al. Proton MR spectroscopy of intracranial tumors: In vivo and in vitro studies. *JCAT* 1990; 14: 497-504.
- [103] Luyten PR, Marien AJH, Heindel W, et al. Metabolic imaging of patients with intracranial tumors: H-1 MR spectroscopic imaging and PET. *Radiology* 1990; 176: 791-799.
- [104] Wilken B, Dechent P, Herms J, et al. Quantitative proton magnetic resonance spectroscopy of focal brain lesions. *Pediatr Neurol* 2000; 23:
- [105] Majos C, Cucurella G, Aguilera C, Coll S, Pons LC. Intraventricular meningiomas: MR imaging and MR spectroscopic findings in two cases. *AJNR Am J Neuroradiol* 1999; 20:882-885.
- [106] Rand SD, Prost D, Haughton V, et al. Accuracy of single-voxel proton MR spectroscopy in distinguishing neoplastic from nonneoplastic brain lesions. *AJNR Am J Neuroradiol* 1997; 18: 1695-1704.
- [107] Chang L, Mc Bride D, Miller BL, et al. Localized in vivo ¹H magnetic resonance spectroscopy and in vitro analyses of heterogeneous brain tumors. *J Neuroimaging* 1995;5: 157-163.

- [108] McBride DQ, Miller BL, Nikas DL, et al. Analysis of brain tumors using ^1H magnetic resonance spectroscopy. *Surg Neurol* 1995; 44: 137-144.
- [109] Ursenius JP, Kauppinen RA, Vainio PA, et al. Quantitative metabolite patterns of human brain tumors: detection by ^1H NMR spectroscopy in vivo and in vitro. *JCAT* 1994; 18: 705-713.
- [110] Krouwer HGJ, Kin TA, Rand SD, et al. Single-voxel proton MR spectroscopy of nonneoplastic brain lesions suggestive of a neoplasm. *AJNR Am J Neuroradiol* 1998; 19:1695-1703.
- [111] Cecil KM, Jones BV. Magnetic resonance spectroscopy of the pediatric brain. *Top Magn Reson Imag* 2001; 12: 435-452.
- [112] Castillo M, Kwok L, Mukherji SK. Clinical applications of proton MR spectroscopy. *AJNR Am J Neuroradiol* 1996; 17: 1-15.
- [113] Castillo M, Kwok L. Proton MR spectroscopy of common brain tumors. *Neuroimaging Clin North Am* 1998; 8: 733-752.
- [114] Kinoshita Y, Yokota A. Absolute concentrations of metabolites in human brain tumors using in vitro proton magnetic resonance spectroscopy. *NMR Biomed* 1997; 10: 2-12.
- [115] van del Knaap MS, van der Grond J, van Rijen PC, et al. Age-dependent changes in localized proton and phosphorous MR spectroscopy of the brain. *Radiology* 1990; 176: 509-515.
- [116] Lowry OH, Berger SJ, Chi M, et al. Diversity of metabolic patterns in human brain tumors. I. High energy phosphate compounds and basic composition. *J Neurochem* 1977; 29: 959-977.
- [117] Ernst T, Hennig J. Coupling effects in volume selective ^1H spectroscopy of major brain metabolites. *Magn Reson Med* 1991; 21: 82-96.
- [118] Adamson AJ, Rand SD, Prost RW, Kim TA, Schultz C, Haughton VM. Focal brain lesions: Effect of single-voxel proton MR spectroscopic findings on treatment decisions. *Radiology* 1998; 209: 73-78.
- [119] Grand S, Passaro G, Ziegler A, et al. Necrotic tumor versus brain abscess: Importance of amino acids detected at ^1H MR spectroscopy-Initial results. *Radiology* 1999; 213: 785-793.
- [120] Lehnhardt FG, Röhn G, Ernestus RI, Grüne M, Hoehn M. ^1H - and ^{31}P -MR spectroscopy of primary and recurrent human brain tumors in vitro: malignancy-characteristic profiles of water soluble and lipophilic spectral components. *NMR Biomed* 2001; 14: 307-317.

-
- [121] Castillo M, Kwok L, Scatliff J, Mukherji SK. Proton MR spectroscopy in neoplastic and non-neoplastic disorders. *MRI Clin of North Am* 1998; 6: 1- 20.
- [122] Gotsis ED, Fountas K, Kapsalaki E, Toulas P, Peristeris G, Papadakis N. In vivo proton MR spectroscopy: The diagnostic possibilities of lipid resonances in brain tumors. *Anticancer Res* 1996; 16: 1565-1568.