



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

José Roberto Lopes Ferraz Filho

Ressonância magnética com imagem de tensor de difusão e espectroscopia na avaliação dos focos de hipersinal na ponderação T2 no encéfalo em crianças e adolescentes com neurofibromatose tipo 1

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Doutor no Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina Interna.

São José do Rio Preto

2011

José Roberto Lopes Ferraz Filho

Ressonância magnética com imagem de tensor
de difusão e espectroscopia na avaliação dos
focos de hipersinal no encéfalo em crianças
com neurofibromatose tipo 1

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de São José do Rio Preto
para obtenção do Título de Doutor
no Curso de Pós-graduação em
Ciências da Saúde, Eixo Temático:
Medicina Interna.

Orientador: Profa. Dra. Érika Cristina Pavarino

São José do Rio Preto

2011

Ferraz Filho, José Roberto Lopes

Ressonância magnética com imagem de tensor de difusão e espectroscopia na avaliação dos focos de hipersinal na ponderação T2 no encéfalo em crianças e adolescentes com neurofibromatose tipo 1
José Roberto Lopes Ferraz Filho

São José do Rio Preto, 2011

83 p.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina Interna

Orientadora: Profa. Dra. Érika Cristina Pavarino

1. Neurofibromatose tipo 1; 2. Ressonância magnética; 3. “Unidentified bright objects”; 4. Imagem de tensor de difusão; 5. Espectroscopia por ressonância magnética

José Roberto Lopes Ferraz Filho

Ressonância magnética com imagem de tensor de difusão e espectroscopia na avaliação dos focos de hipersinal na ponderação T2 no encéfalo em crianças e adolescentes com neurofibromatose tipo 1

BANCA EXAMINADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Érika Cristina Pavarino.

2º Examinador:

3º Examinador:

4º Examinador:

5º Examinador:

Suplentes:

São José do Rio Preto, __/__/_____.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos	ii
Epígrafe	v
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tabelas.....	viii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	x
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiv
1. Introdução	01
1.1. Bases Genéticas	02
1.2. Diagnóstico Clínico.....	03
1.3. Diagnóstico Radiológico	06
1.4. Objetivos	11
2. Artigos Científicos.....	13
Artigo 1	14
Artigo 2	33
Artigo 3	50
3. Conclusões	68
4. Referências Bibliográficas.....	70
5. Anexos.....	80
6. Apêndices	82

Dedicatória

Aos meus pais **José Roberto Lopes Ferraz** e **Maria de Lourdes Lopes Ferraz** pelos grandiosos ensinamentos e por me apoiarem sempre em meus ideais;

Ao meu irmão **Eloy Lopes Ferraz Neto** pela verdadeira amizade que cultivamos;

A minha esposa **Joyce Aparecida Martins Lopes Ferraz** pelo imenso carinho, companheirismo e pelos ótimos momentos que passamos juntos;

Ao meu filho **João Pedro Martins Lopes Ferraz** pela alegria que me proporciona todos os dias. Te amo filho!

Agradecimentos

- ✓ A **Profa. Dra. Érika Cristina Pavarino**, pela amizade, orientação e ensinamentos que foram fundamentais na elaboração da tese e na minha formação como pós-graduando.

- ✓ Aos **pacientes portadores de neurofibromatose**, fundamentais para a elaboração deste estudo.

- ✓ Ao **Prof. Dr. Marcos Pontes Muniz**, pelo seu incentivo na pesquisa em neurofibromatose e discussões sobre o assunto.

- ✓ Ao **Prof. Dr. Antônio Soares Sousa**, pelo incentivo à pesquisa em nosso departamento, pelas oportunidades na busca do conhecimento e troca de informações, despertando o interesse científico.

- ✓ Ao **Prof. Dr. Antônio José da Rocha**, por suas valiosas sugestões na elaboração da tese e discussões de idéias que enriqueceram o estudo.

- ✓ A **Profa. Dra. Eny Maria Goloni Bertollo** pela ajuda na discussão clínica e encaminhamento dos pacientes ambulatoriais com neurofibromatose.

- ✓ Aos **alunos de iniciação científica Antônio Carlos Pondé Rodrigues Junior e Wagner Moreno Junior**, pela dedicação, ajuda na identificação e convocação dos pacientes com neurofibromatose e na elaboração de trabalhos científicos.

- ✓ Ao **Prof. Dra. Adriana Barbosa Santos**, pela atenção e valiosa assessoria estatística na elaboração da tese.

- ✓ Aos **docentes, médicos contratados, residentes e funcionários** do Departamento de Imagem da FAMERP/ FUNFARME pela amizade, cooperação e estímulo na elaboração da tese.

- ✓ Aos profissionais do CEPAN, **Prof. Dr. João Roberto Antonio, Prof. Dr. Nelson I Valério, Dra. Marta F. Teixeira, Dra. Regina Célia A. P. Albuquerque** e todos os demais, pela disponibilidade e atenção no atendimento dos pacientes com neurofibromatose.

- ✓ Ao diretor administrativo **Dr. Jorge Fares** e diretor executivo **Dr. Horácio J Ramalho** da FUNFARME, pela disponibilização do espaço físico e aparelhos para a realização do estudo.

- ✓ Ao **Prof. Dr. Humberto Liedtke Junior**, diretor geral da FAMERP, pelo apoio às atividades de pesquisa.

- ✓ Aos **funcionários do Serviço de Radiologia** do Hospital de Base, em especial aos técnicos da ressonância magnética: Rafael D Addario, Gustavo Heleno Xavier Romano, Romilda Francisco Batista, Moniza de Sá Espírito Santo, Marcos Thiago Galana Alciati, Sueli Azevedo, Tereza Coelho e Paulo César Aissa, que realizaram os exames.

- ✓ Aos funcionários da pós-graduação: **Fabiana Cristina Godoy, Luiz Henrique Ferreira Oliveira** e **José Antonio Silistino**, pela atenção e auxílio no esclarecimento de dúvidas.

- ✓ **Ao núcleo de apoio pedagógico**, em especial ao funcionário Edílson Solin, pela disponibilidade e ajuda na formatação das figuras deste trabalho.

- ✓ A bibliotecária **Zélia Cristina Regis**, pela sua disponibilidade e ajuda no levantamento das referências bibliográficas.

Epígrafe

“O que vale na vida não é o ponto de partida e
sim a caminhada. Caminhando e semeando, no
fim, terás o que colher.”

Cora Coralina

Lista de Figuras

Artigo 1

Fig. 1. A-B Axial T2-weighted anatomic images and C-D color-encoded *FA* maps: circular regions of interest to quantitative analysis of the *FA* are placed in the cerebellar white matter and pons A-C and basal ganglia and thalamus B-D..... 28

Fig. 2. Frequency of UBOS in the 44 patients diagnosed with NF1 according to the anatomic region..... 29

Fig. 3. Box plot showing differences in the fractional anisotropy value (dotted line) for each anatomic region of NF1 patients compared to control individuals..... 29

Artigo 2

Fig. 1. Frequency of UBOS in the 27 patients diagnosed with NF1 according to the anatomic region at RM1 and RM2..... 46

Fig. 2. Box plot of *FA* by region of brain in patients for whom the UBOs decreased (gray) and the control group (green)..... 47

Fig. 3. An 7 year old girl with NF1. (A) Axial T2-weighted MRI across the globus pallidus showing UBOs. (B) Follow-up MRI after 3 years showing disappears of UBOs and (C) color-encoded *FA* maps with circular regions of interest in the same region as UBOs..... 47

Artigo 3

Fig 1. (A) Paciente com NF1 apresentando FHE-T2 na região palidal e ERM que evidenciou aumento da relação Co/Cr e Mi/Cr (setas). (B) Paciente com NF1 sem lesão encefálica na imagem de RM convencional e com ERM que evidenciou discreto aumento de Co e Mi (setas). (C) Paciente controle, não portador NF1, com RM encefálica e ERM sem alterações. 65

Lista de Tabelas

Artigo 1

Table 1. Results of the fractional anisotropy related to comparative tests between the NF1 group and control group.....	30
Table 2. Results of the fractional anisotropy related to comparative tests (ANOVA) between NF-1 patients with UBOs, NF-1 patients without UBOs and the control group.....	31
Table 3. Confidence interval (95%CI) – for mean fractional anisotropy values in each of the studied regions of NF1 patients.....	32

Artigo 2

Table 1. The evolution of UBOs at RM1 and RM2 stratified by age of NF1 patients.....	48
--	----

Table 2. Comparison of the *FA* of patients for whom UBOs decreased between RM1 and RM2 and the control group..... 48

Table 3. *FA* of the different regions of the brain in each patient for whom the UBOs disappeared between RM1 and RM2 compared to the control group..... 49

Artigo 3

Tabela 1. Percentuais relativos ao lado da lesão em que foi realizada a espectroscopia em pacientes do grupo NF1 com FHE-T2..... 66

Tabela 2. Análise univariada relativa à comparação entre os grupos controle e NF1..... 66

Tabela 3. Análise comparativa não paramétrica entre os três grupos NF1/com FHE-T2, NF1/sem FHE-T2 e controle..... 67

Lista de Abreviaturas e Símbolos

<i>BG</i>	Núcleos da base
CEPAN	Centro de pesquisa e atendimento em neurofibromatose
<i>CHESS</i>	<i>Chemical shift selective</i>
Co	Colina
<i>DTI</i>	<i>Diffusion tensor imaging</i> (Imagem de tensor de difusão)
<i>EPI</i>	Imagem eco-planar
ERM	Espectroscopia por ressonância magnética
<i>FA</i>	<i>Fractional anisotropy</i> (Anisotropia fracionada)
FHE-T2	Focos de hipersinal no encéfalo na ponderação T2
<i>FLAIR</i>	<i>Fluid attenuation inversion recovery</i>
<i>FOV</i>	<i>Field of view</i>
<i>GDP</i>	Difosfato de guanosina
<i>GTP</i>	Trifosfato de guanosina
kDa	quilo Dalton
MCCL	Manchas café-com-leite
Mi	Mioinositol
Naa	N-acetil aspartato
NF1	Neurofibromatose tipo 1
<i>NIH</i>	<i>National Institutes of Health</i>
NSA	Número de médias de sinal
ppm	Partes por milhão
<i>Press</i>	<i>Point resolved spectroscopy</i>

RM	Ressonância magnética
SE	Spin-eco
TC	Tomografia computadorizada
TE	Tempo de eco
TR	Tempo de repetição
TSE	Turbo spin-eco
<i>UBOs</i>	<i>Unidentified Bright Objects</i>

Resumo

Introdução: A neurofibromatose tipo 1 (NF1) em crianças e adolescentes está frequentemente associada com o aparecimento ou desaparecimento de lesões focais de hipersinal no encéfalo na ponderação T2 (FHE-T2). Estas lesões não são aceitas como critério diagnóstico para NF1 e sua natureza exata ainda não está clara. **Objetivos:** **artigo 1:** Avaliar a relação entre a presença dos FHE-T2 e padrões de anisotropia fracionada (FA) em uma série de pacientes com NF1; **artigo 2:** Demonstrar o padrão de evolução dos FHE-T2 por exame de Ressonância Magnética (RM) em indivíduos com NF1 e relacionar com o valor regional de FA; **artigo 3:** Avaliar os padrões metabólicos por meio da espectroscopia por ressonância magnética (ERM) do encéfalo na presença dos FHE-T2 em pacientes com NF1. **Métodos:** **artigo 1:** Analisou-se uma série de 44 indivíduos com NF1, e 20 controles. A análise quantitativa do FA foi definida em quatro regiões anatômicas pré-determinadas e relacionada à presença de FHE-T2; **artigo 2:** Analisou-se com imagem de tensor de difusão (DTI) a evolução dos FHE-T2 nas regiões de núcleos da base, tálamos, cerebelo e tronco encefálico de um grupo de 27 pacientes com NF1 e 20 controles. A presença de FHE-T2 em dois exames de RM encefálica consecutivos foram relacionados com o valor de FA; **artigo 3:** Analisou-se 42 indivíduos com NF1, e 25 controles saudáveis por exame de ERM *univoxel* na região do globo pálido. Foi feita análise automatizada quantitativa da relação dos metabólitos colina/creatina (Co/Cr), N-acetil aspartato/creatina (Naa/Cr) e Mioinositol/creatina (Mi/Cr) e relacionada à ocorrência de FHE-T2 na região do

globo pálido. **Resultados: artigo 1:** Os FHE-T2 foram diagnosticados em 50% dos pacientes com NF1. Observou-se redução do valor de FA nas regiões do cerebelo e tálamo de aparência normal ou com FHE-T2 de pacientes com NF1 em relação ao controle ($P \leq .05$); **artigo 2:** Houve redução significativa no valor de FA nas regiões de núcleos da base, cerebelo e tálamos em pacientes com NF1 em relação ao grupo controle ($P \leq .05$) mesmo com redução ou desaparecimento dos FHE-T2; **artigo 3:** Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de pacientes com NF1 e o controle quanto aos valores médios (\bar{x}) de Mi/Cr e Co/Cr ($P < 0,05$) na região do globo pálido. **Conclusões: artigo 1:** A técnica de DTI confirma que os FHE-T2 estejam relacionados às alterações da microestrutura do tecido cerebral em pacientes NF1. **artigo 2:** A RM possibilita o adequado monitoramento da distribuição no tempo e espaço dos FHE-T2 em pacientes com NF1. DTI evidencia alterações no valor de FA mesmo com o desaparecimento ou redução dos FHE-T2; **artigo 3:** A ERM permite a caracterização de anormalidades teciduais não demonstráveis nas sequências convencionais de RM de pacientes com NF1 por meio da análise dos metabólitos Co e Mi.

Palavras-Chave: 1. Neurofibromatose tipo 1; 2. Ressonância magnética; 3. “Unidentified bright objects”; 4. Imagem de tensor de difusão; 5. Espectroscopia por ressonância magnética.

Abstract

Introduction: Neurofibromatosis type 1 (NF1) in children and adolescents is frequently associated with the appearance of focal lesion hyperintensities on T2-weighted images seen in the brain which are called Unidentified Bright Objects (UBOs). These lesions are not an accepted criterion in the diagnosis of NF1 and the exact nature of UBOs remains unclear. **Objectives:** **article 1:** This study employed diffusion tensor imaging (DTI) to evaluate the relation among fractional anisotropy (FA) patterns with the findings of T2 sequences in individuals with NF1; **article 2:** To evaluate the evolution of UBOs in individuals with NF1 by serial MRI, and to relate this to regional fractional anisotropy (FA); **article 3:** To evaluate the metabolic patterns by magnetic resonance spectroscopy (MRS) of the brain, in the presence of UBOS in patients with NF1. **Methods:** **article 1:** Forty-four individuals with NF1 and 20 control subjects were evaluated. The comparative analysis of FA between NF1 and control groups was based on four pre-determined anatomic regions of the brain and related to the presence or absence of UBOs; **article 2:** The signal pattern of the T2-weighted sequences in the basal ganglia, thalamus, brain stem, and cerebellum for 27 NF1 individuals and a control group were analyzed by DTI. The presence or absence of UBOs in 2 consecutive MRI examinations were related to FA. **article 3:** Forty-two individuals with NF1 and 25 control subjects were evaluated by examination of ERM univoxel placed in the region of the globus pallidus. Automated quantitative analysis was made of the relationship of the metabolites choline/creatine (Co / Cr), N-acetyl aspartate/creatine (NAA / Cr) and myoinositol/creatine (MI / Cr) and

related to the occurrence of UBOS in region of the globus pallidus. **Results:** **article 1:** The FA values between the groups demonstrated statistically significant differences ($p \leq 0.05$) for the cerebellum and thalamus in NF1 patients, independent of the occurrence of UBOS; **article 2:** We demonstrated statistically significant differences in FA for the basal ganglia, cerebellum, and thalamus between NF1 patients and controls ($P \leq 0.05$), even with a reduction or disappearance of UBOS; **article 3:** We demonstrated statistically significant differences between of patients with NF1 and control groups as the average values Mi/Cr and Co/Cr ($P < 0.05$) in the region of the globus pallidus. **Conclusions:** **article 1:** MR imaging using DTI technique suggests that UBOS are due to microstructural defect of the brain tissue in NF1 patients. **article 2:** MRI allows for adequate monitoring of the temporal and spatial distribution of UBOS in patients with NF1. DTI confirmed changes in FA despite the disappearance or reduction of UBOS. **article 3:** MR spectroscopy allows the characterization of the tissue abnormalities not demonstrable in the conventional MR sequences of patients with NF1 by analysis of metabolites Co and Mi.

Key words: 1.Neurofibromatosis type 1; 2.Magnetic resonance imaging; 3.Unidentified Bright Objects; 4.Diffusion tensor imaging; 5. Magnetic resonance spectroscopy.

1. Introdução

1. Introdução

1.1. Bases Genéticas

A neurofibromatose (NF), primeiramente relatada, em 1768, por Mark Akenside e descrita, em 1882, por Friedrich Von Recklinghausen,⁽¹⁾ é uma síndrome que apresenta duas formas principais, identificadas como tipo 1 (NF1) e tipo 2 (NF2).^(2,3) A neurofibromatose tipo 1 (NF1) é a mais comum das facomatoses e se caracteriza por múltiplos neurofibromas, lesões pigmentadas na pele e deformidades esqueléticas. É uma afecção com padrão de herança autossômica dominante, com incidência de um para 3.000 nascidos vivos, afeta igualmente ambos os gêneros e metade dos casos representa nova mutação.⁽¹⁻³⁾

O gene responsável pela neurofibromatose tipo 1, designado *NF1*, está localizado no braço longo do cromossomo 17, em 17q11.2,⁽⁴⁾ e codifica uma proteína que possui 2818 aminoácidos e massa molecular de 327 kDa (quilo Dalton), denominada neurofibromina.⁽⁵⁻⁷⁾ Esta é predominantemente expressa em neurônios, células de Schwann, oligodendrócitos e astrócitos.⁽⁸⁻¹⁰⁾ Nordlund *et al.*⁽¹¹⁾ detectaram a presença de neurofibromina em todas as partes do encéfalo, principalmente em neurônios com projeções extensas, tais como as células piramidais e de Purkinje.

Uma região central da neurofibromina é estrutural e funcionalmente homóloga às proteínas ativadoras da função GTPase (GAP_s) de mamíferos, que aceleram a hidrólise de proteína $p21^{ras}$ -GTP para $p21^{ras}$ -GDP,

convertendo-a, deste modo, da forma ativa para inativa. Essa região central, conhecida como NF1-GRD, se estende por aproximadamente 360 aminoácidos, correspondendo aos exons 20 - 27a do gene.⁽¹²⁻¹⁴⁾

Os membros da família de proteínas p21^{ras} são codificados pelos genes *H-Ras*, *K-Ras* e *N-Ras*, ciclam entre o estado ativo (p21^{ras}-GTP) e inativo (p21^{ras}-GDP) e desempenham papel central na diferenciação e no crescimento celular, transduzindo sinais da membrana plasmática ao núcleo por meio de seus efetores.^(15,16)

Mutações oncogênicas nos genes *Ras* ou inativação do *NF1* favorecem o estado ativo (p21^{ras}-GTP) e, conseqüentemente, resultam na estimulação permanente da cascata de sinais e no excesso de divisão celular.^(13,17) A perda da neurofibromina, em uma variedade de tumores e em células de camundongos deficientes de NF1, está associada com níveis elevados de p21^{ras} – GTP e consequente ativação de seus efetores secundários.⁽¹⁸⁻²⁰⁾ Tais achados e a presença frequente de neoplasias em pacientes com neurofibromatose tipo 1 ocorre porque o *NF1* é um gene supressor de tumor e a neurofibromina participa do processo de tumorigênese pela inativação de ambos alelos do gene.^(14,18,21-23)

1.2. Diagnóstico clínico

Os critérios diagnósticos da NF1, estabelecidos pelo *National Institutes of Health* (NIH),^(24,25) durante conferência realizada em Bethesda (EUA) em

1987, especificam a presença de pelo menos duas das seguintes características:

- a) seis ou mais manchas café-com-leite (MCCL), com mais de 5 mm em pacientes na pré-puberdade ou com mais de 15 mm na pós-puberdade;
- b) dois ou mais neurofibromas ou um neurofibroma plexiforme;
- c) efélides (sardas) nas regiões axilares e/ou inguinais;
- d) glioma óptico;
- e) dois ou mais nódulos de Lisch;
- f) uma lesão óssea característica, como displasia do esfenoide ou afilamento da cortical dos ossos longos, com ou sem pseudoartrose;
- g) recorrência familiar, representada por pelo menos um parente de primeiro grau com diagnóstico de NF1.

Os sinais clínicos da NF1 geralmente não são observados em crianças nos primeiros anos de vida, porém tendem a ser progressivos com o passar dos anos.⁽¹⁾ Os primeiros achados no exame clínico em crianças são as MCCL, seguidos de efélides axilares, nódulos de Lisch, neurofibromas, glioma óptico e lesões ósseas.⁽²⁶⁾

As MCCL podem ser diagnosticadas desde o nascimento ou no primeiro ano de vida, ocorrem em 99% dos pacientes com NF1. São lesões pigmentadas, benignas, em número de seis ou mais, localizadas frequentemente no tronco, mas podem ser observadas em qualquer parte do corpo, exceto no couro cabeludo, sobrancelhas, palma das mãos, planta dos pés e na face.^(27,28)

As efélides axilares e/ou inguinais ocorrem em 90% dos pacientes desde o nascimento ou frequentemente por volta dos sete anos de idade e, geralmente, não aparecem após esta idade.⁽²⁶⁾ Elas possuem coloração semelhante às MCCL, porém, de menor tamanho, em número igual ou superior a três, não relacionadas à exposição ao sol.⁽²⁹⁻³¹⁾

Os nódulos de Lisch caracterizam-se por elevações ovulares na superfície da íris, com coloração amarelo ou marrom e não causam complicação oftalmológica.^(26,30) Esses nódulos são considerados exclusivos de NF1, estão presentes em 5% das crianças com menos de três anos de idade e em 90% dos indivíduos com mais de 20 anos.^(32,33)

Neurofibromas são tumores benignos da bainha de nervos periféricos que se originam das células de Schwann e fibroblastos perineurais. Ocorrem em 25-50% dos pacientes com NF1, geralmente após os 20 anos de idade ou podem ser congênitos.^(34,35)

Os neurofibromas cutâneos geralmente aparecem no final da adolescência, são móveis junto à pele, com textura amolecida, ocorrendo em qualquer parte do corpo e não possuem potencial para transformação maligna. Os neurofibromas subcutâneos são profundos e de consistência mais firme.⁽³⁰⁾

Os neurofibromas plexiformes são na maioria congênitos, considerados altamente sugestivos de NF1, porém não são patognomônico de NF1.⁽³⁵⁾ Podem sofrer transformação maligna para neurofibrossarcoma em 2 a 5% dos casos.⁽³⁶⁾ Esses tumores são localmente invasivos, espessam o nervo e frequentemente estão associados à hipertrofia de tecidos moles adjacentes.⁽³⁵⁾ São encontrados mais frequentemente na face e no pescoço devido à rica

inervação desta região, mas podem ser encontrados em outras partes do corpo como tórax, região paravertebral, mediastino e membros.^(28,37,38)

Os gliomas ópticos são encontrados em 5-15% das crianças com NF1, com pico de incidência entre dois a oito anos de idade, podendo regredir espontaneamente com o tempo.^(28,39-41) Histologicamente, são classificados como astrocitomas de baixa agressividade (astrocitoma pilocítico), comumente afetam o nervo óptico de crianças e, quando sua localização é quiasmática e retroquiasmática, podem ter uma evolução mais agressiva e pior prognóstico.⁽⁴²⁻⁴⁴⁾ Os gliomas ópticos bilaterais são considerados específicos de NF1.⁽⁴⁵⁾

1.3. Diagnóstico radiológico

A NF1, em particular em crianças e adolescentes está frequentemente associada com o aparecimento na ressonância magnética (RM) encefálica de lesões focais de hipersinal na ponderação T2 e isointensas/hiperintensas na ponderação T1, sem efeito expansivo e que não impregnam pelo contraste endovenoso. Estes focos de hipersinal no encéfalo na ponderação T2 (FHE-T2) são denominados de UBOs (*Unidentified Bright Objects*) e não são aceitos como critério diagnóstico para NF1.⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾

Estas lesões são encontradas no cerebelo, tronco encefálico, núcleos da base e na substância branca hemisférica e estão presentes em um número apreciável de crianças com NF1, com freqüências de 43 a 93% dos casos.^(46,47,49-56)

Nos primeiros dois anos de vida, os FHE-T2 são frequentemente ausentes e, a partir de três anos de idade, são diagnosticados. Aos 10 ou 12 anos de idade podem aumentar em número e tamanho, desaparecem com o passar dos anos e, raramente são vistos após os 20 anos.^(49,50,57,58) Apesar do padrão predominantemente ser de diminuição dos FHE-T2, durante a adolescência, esta evolução pode não ser linear, existindo pacientes com aumento ou aparecimento de novos FHE-T2, durante o início da adolescência, os quais desaparecem na fase adulta.^(49,59,60)

A natureza exata dos FHE-T2 ainda não está clara. A correlação com estudos histopatológicos é escassa e sugere tratar-se de uma alteração vacuolar e espongiótica na substância branca encefálica ocasionada por edema intramielínico,⁽⁴⁷⁾ podendo ser esta alteração transitória e intermitente na microestrutura cerebral como têm sido observado em estudos longitudinais.⁽⁴⁹⁾

Apesar da escassez de estudos anatomopatológicos sobre as bases dos FHE-T2⁽⁴⁷⁾, modernas técnicas de RM têm demonstrado *in vivo* anormalidades microestruturais, mesmo na ausência de alteração às sequências convencionais de RM, permitindo especular sobre a presença de anormalidades microestruturais do parênquima cerebral, resultante da mutação do gene *NF1* em regiões susceptíveis (cerebelo, tronco encefálico, tálamos e núcleos da base)^(61,62). Contudo, não há consenso na literatura atual sobre o papel da espectroscopia por ressonância magnética (ERM) na avaliação metabólica do encéfalo de indivíduos com NF1.⁽⁶³⁻⁶⁶⁾

A colina (Co) é um metabólito proveniente da glicerofosocolina e

fosfocolina, considerada um marcador de proliferação celular. O aumento dos níveis de mioinositol (Mi) e Co são encontrados nos gliomas e auxilia no diagnóstico diferencial destas lesões com os FHE-T2 em pacientes com NF1.⁽⁶⁶⁾ No entanto, um discreto aumento de Mi e Co também pode ser observado na substância branca na presença^(63,65) ou mesmo ausência dos FHE-T2⁽⁶⁴⁾ em pacientes com NF1.

A redução de N-acetil aspartato (Naa) ocorre quando existe algum dano do tecido cerebral ou substituição por processo destrutivo, degenerativo ou infiltrativo, o que não é esperado para os FHE-T2 uma vez que o metabólito é um marcador de função neuronal e os FHE-T2 são considerados “cl clinicamente assintomáticos”.⁽⁶⁷⁾

A avaliação da substância branca no encéfalo também pode ser feita por imagens de RM na ponderação T2 com excelente contraste entre substância branca e cinzenta, porém não fornece informação sobre o sentido das fibras de substância branca, as quais podem ser avaliadas por imagens de tensor de difusão (*DTI*).^(61,62)

O estudo por RM com *DTI* demonstra a movimentação das moléculas de água, na qual a direção da difusão coincide com os tratos axiais de fibras de substância branca considerada difusão anisotrópica. Esta informação é dada por meio de *DTI*, um modelo matemático de difusão espacial tridimensional. O tensor é uma entidade matemática que possui propriedades específicas que permite a quantificação de um fenômeno físico complexo. Neste contexto, o tensor é simplesmente uma matriz de números derivada da mensuração da

difusão em várias direções, o qual pode estimar a difusão em qualquer direção arbitrária ou determinar a direção da difusão máxima.^(61,68,69)

Com uso do *DTI*, o grau de anisotropia e a direção das fibras de substância branca podem ser mapeados por *voxel* possibilitando o estudo da arquitetura da substância branca em vivo.^(61,70)

A classificação dos tratos de substância branca é feita em fibras de associação, projeção, comissural, do tronco cerebral e cerebelo.^(61,68) As fibras de associação interconectam áreas corticais de cada hemisfério e incluem o cíngulo, fascículo occipito frontal superior e inferior, fascículo uncinado, fascículo longitudinal superior (arqueado) e inferior (occipitotemporal). As fibras de projeção interconectam áreas corticais com núcleos da base, tronco encefálico, cerebelo e medula espinhal e incluem os tratos corticoespinhal, corticobulbar e corticopontino, bem como o trato geniculocalcarino (radiações ópticas). As fibras comissurais interconectam áreas corticais similares entre o hemisfério contralateral e inclui o corpo caloso e comissura anterior. As fibras do tronco cerebral e cerebelo não são consistentemente identificadas nos mapas de cor direcional do *DTI*.^(61,68)

Variações da difusão em direções espaciais diferentes trazem informações sobre difusão anisotrópica e de fato sobre estrutura tecidual. Vários estudos têm demonstrado que alterações da substância branca resultantes de neoplasias cerebrais podem ser explicadas por influência da medida da anisotropia do tensor de difusão e orientação das fibras de substância branca, resultando em alguns padrões direcionais nos mapas de cor do *DTI*.⁽⁶⁸⁾

A classificação dos tratos de substância branca tem sido feita em casos de neoplasia encefálica. ^(68,71) O padrão de alteração dos tratos de fibras de substância branca causado por neoplasias pode ser classificado de três formas: a) desviado: os tratos de substância branca estão intactos, porém desviados pelo tumor, com anisotropia preservada e identificação da localização ou orientação da direção dos mapas de cor do *DTI*; b) edemaciado ou infiltrado: os tratos podem perder alguma anisotropia, mas mantêm a organização direcional e identificação da direção dos mapas de cor do *DTI*; c) destruído ou interrompido: ponto onde a organização direcional dos mapas de cor do *DTI* é perdida completamente.^(68,71)

Em estudos de Zamboni *et al.* ⁽⁶²⁾ em pacientes maiores de 18 anos e de Van Engelen *et al.* ⁽⁷²⁾ em crianças com diagnóstico de NF1, foram avaliados os tratos de substância branca por *DTI* e o valor de *FA*, observando-se alterações da microestrutura cerebral em diferentes regiões aparentemente normais do encéfalo, em comparação a um grupo controle⁽³⁷⁾.

1.4. Objetivos

- Aplicar a técnica *DTI* para relacionar os padrões de *FA* com os achados na sequência T2, visando o melhor entendimento das alterações anatômicas e da microestrutura do encéfalo em indivíduos com NF1;
- Realizar análise seriada dos FHE-T2 de pacientes com NF1 por meio de imagens convencionais de RM visando relacionar a distribuição dos mesmos no tempo e no espaço, e correlacionar os FHE-T2 com anormalidades microestruturais de regiões específicas do encéfalo por meio da técnica de *DTI*;
- Avaliar os padrões metabólicos por meio da ERM do globo pálido na presença dos FHE-T2 em uma grande série de pacientes com NF1.

2. Artigos Científicos

Artigos Científicos

ARTIGO 1

Título: Diffusion tensor MR imaging in neurofibromatosis type 1: expanding the knowledge of microstructural brain abnormalities.

Autores: Ferraz-Filho JRL; da Rocha AJ; Muniz MP; Souza AS; Goloni-Bertollo EM; Pavarino-Bertelli EC.

Periódico: Pediatric Radiology, aceito para publicação.

ARTIGO 2

Título: Unidentified bright objects in neurofibromatosis type 1: Conventional MRI in the follow-up and correlation of microstructural lesions on diffusion tensor images.

Autores: Ferraz-Filho JRL; da Rocha AJ; Muniz MP; Souza AS; Goloni-Bertollo EM; Pavarino-Bertelli EC.

Periódico: European Journal of Paediatric Neurology, aceito para publicação.

ARTIGO 3

Título: Espectroscopia por RM em Neurofibromatose tipo 1 é capaz de detectar anormalidades metabólicas não reveladas no parênquima cerebral de aparência normal?

Autores: Ferraz-Filho JRL, da Rocha AJ; Muniz MP; Rodrigues-Junior ACP; Moreno-Junior W; Santana-Netto PV; Goloni-Bertollo EM; Pavarino EC.

Periódico: Arquivos de neuropsiquiatria, a ser submetido para publicação.

ARTIGO 1

Título: Diffusion tensor MR imaging in neurofibromatosis type 1: expanding the knowledge of microstructural brain abnormalities.

Autores: Ferraz-Filho JRL; da Rocha AJ; Muniz MP; Souza AS; Goloni-Bertollo EM; Pavarino-Bertelli EC.

Periódico: Pediatric Radiology, aceito para publicação.

Decision Letter (P-RAD-11-00220.R2)

From: pedradeditor@med.wayne.edu

To: jrl.ferraz@terra.com.br, a.rocha@uol.com.br, mpomuniz@terra.com.br, antoniosouzabr@gmail.com, eny.goloni@famerp.br, erika@famerp.br

CC:

Subject: Pediatric Radiology - Manuscript Accepted

Body: Dear Prof. Ferraz Filho:

Manuscript Number: P-RAD-11-00220.R2

Manuscript Title: Diffusion tensor MR imaging in neurofibromatosis type 1: expanding the knowledge of microstructural brain abnormalities

Congratulations! Your manuscript has been accepted for publication in Pediatric Radiology and will be forwarded to the publisher, Springer-Verlag. You will be notified by e-mail once your galley proofs are available.

Again, congratulations and thank you for submitting your work to Pediatric Radiology.

Sincerely,

Dr. Cynthia Rigsby
Assistant Editor
Pediatric Radiology

Date Sent: 30-Aug-2011

Abstract

Purpose : This study employed diffusion tensor imaging (DTI) to evaluate the relation among fractional anisotropy (FA) patterns with the findings of T2 sequences, with the aim of improving our understanding of anatomic changes and microstructural brain abnormalities in individuals with neurofibromatosis type 1 (NF1). Methods: Forty-four individuals with NF1 and 20 control subjects were evaluated. The comparative analysis of FA between NF1 and control groups was based on four pre-determined anatomic regions of the brain (basal ganglia, cerebellum, pons, thalamus) and related the presence or absence of lesion hyperintensities on T2-weighted images seen in the brain which are called Unidentified Bright Objects (UBOs). Results: The FA values between the groups demonstrated statistically significant differences ($p \leq 0.05$) for the cerebellum and thalamus in NF1 patients, independent of the occurrence of UBOs. Conclusions: The DTI technique confirms the influence of occurrence of UBOs in the decrease of FA values in these series of NF1 patients. Additionally, this technique allows the characterization of microstructural abnormalities even in some regions brain that appear normal in conventional MR sequences.

Key words: Neurofibromatosis type 1, Magnetic resonance imaging, Diffusion tensor imaging, Brain, Unidentified bright objects.

Introduction

Neurofibromatosis type 1 (NF1) is a hereditary disease with a dominant autosomal pattern [1-4]. In children and adolescents specifically, this disease is frequently associated with the appearance of focal lesion hyperintensities on T2-weighted images seen in the brain which are called Unidentified Bright Objects (UBOs) [5-7]. These lesions detected by magnetic resonance (MR) imaging are not an accepted criterion in the diagnosis of NF1 [5,7].

The exact nature of the UBOs is still unclear. It is believed, through anatomopathological studies, that these lesions are due to vacuolar and spongiotic changes in the brain white matter caused by intramyelinic edema [8], which may be transient or intermittent alterations in the brain microstructure as has been observed in longitudinal studies [2,9,10].

An evaluation of the signal of white matter tracts can be achieved by conventional T2-weighted MR imaging, which demonstrates an excellent contrast between the white and gray matter. However, this technique has already proved to be limited in brain microstructure studies [11,12]. Diffusion tensor images (DTI) have been employed in other pathological models where they proved more valuable than conventional techniques. It is a new imaging parameter that may disclose important information about the microscopic structure of pathological tissues [11,13].

The DTI technique is based on the study of the movement of water molecules whose direction can vary according to the integrity of the fiber of the white matter. By means of a 3-dimensional spatial diffusion mathematical

model, this technique allows the quantitative analysis and “*in vivo*” anatomic mapping of the architecture of the white matter tracts [11,14-16].

The current study employs the DTI technique to evaluate the relation among fractional anisotropy (FA) values with the findings of T2 sequences with the aim of improving our understanding of the anatomic changes and the brain microstructure of individuals with NF1.

Materials and Methods

Forty-four individuals were enrolled in this study with diagnosis of NF1 according to the criteria established by the National Institutes of Health (NIH) [3] which include:

1. Six or more café au lait macules over 5mm in greatest diameter in prepubertal individuals and over 15mm in greatest diameter in postpubertal individuals
2. Two or more neurofibromas of any type or one plexiform neurofibroma
3. Freckling in the axillary or inguinal regions (Crowe’s sign)
4. Optic glioma
5. Two or more Lisch nodules (iris harmartomas)
6. A distinctive osseous lesion such as sphenoid dysplasia or thinning of long bone cortex with or without pseudoarthrosis
7. A first-degree relative (parent, sibling, or offspring) with NF1 by the above criteria

The criteria are met in an individual if two or more of the features listed are present.

These individuals were treated in a specialized outpatients clinic in the period from 2007 to 2009 and allocated to two groups: presenting UBOs and without UBOs. A control group was matched for age and gender. It was comprised of 20 healthy individuals without clinical or family histories of NF1 and whose MR images did not demonstrate structural disorders. This study was approved by the institutional Research Ethics Committee and the patients or their guardians signed an informed consent form.

The exclusion criteria utilized for both groups were: prior history of any underlying neurological disease, such as neonatal hypoxia, neuroinfection and brain tumor; radiotherapy of the head; systemic chemotherapy; and the implantation of any type of metallic apparatus that would impair the performance evaluation of an MRI study.

The MR images were carried out using a Phillips Intera equipment (Scanner hardware release 11) utilizing a dedicated 8-channel head coil. The protocol included structural images with the evaluation of T2 TSE sequences (TR / TE = 4.466 / 110 ms), 5-mm slices with a 1-mm gap, FOV 250, matrix 512, NSA 2, spin-echo sagittal T1-weighted (TR / TE = 550 / 15ms), 5-mm slices with a 1-mm gap, FOV 250, matrix 256x512, NSA 2; as well as axial FLAIR sequences (TR / TE / TI = 6000/ 120/ 2000 ms), 5-mm slices with a 1-mm gap, FOV 250, matrix 256x512, NSA 3.

The DTI protocol included SE-EPI images, TR = 6569 ms, TE = 75 ms, 15 gradient directions, $b=1000$ s/mm², section thickness of 3.5-mm with a 0.5-

mm gap, FOV of 240x240mm², matrix of 110x128, NSA 3, EPI-Bandwidth 7911, SENSE acceleration of 2.5.

Images were exported in proprietary REC/PAR format and analyzed using a tractography tool (PRIDE Fiber Tracking tool – Phillips). The color-encoded FA maps were overlaid on T2-weighted anatomic images, with the areas of interest defined in greater precision for the quantification of the FA. The white matter tracts were reconstructed and overlaid on the anatomic image to facilitate the measurement of the FA.

The quantitative analysis of the FA was defined for four pre-determined anatomic regions, which are well known to be the preferred location for signal abnormalities in brain: 1) basal ganglia (BG); 2) cerebellum: cerebellar white matter; 3) brainstem: pons; 4) diencephalon: thalamus. The sizes of ROIs used were 20 mm³.

The Student t-test for independent samples was employed in the statistical analysis of the changes in the brain tissue (FA) comparing the group of NF1 patients with the control group. Analysis of variance (ANOVA) was utilized in the study on the effects of the UBOs with the FA values of three groups: NF1 patients with UBOs, NF1 patients without UBOs and the control group. When appropriate, Dunnett's (post hoc) test was performed to compare each NF1 group with the control group. In all the statistical tests, the level of significance was set at a p-value < 0.05. The analyses were performed utilizing the Minitab ® 15 statistical software.

Results

The study group was composed of 44 patients with a diagnosis of NF1 while the control group consisted of 20 healthy individuals. In the study group, 52.3% of the patients were men and 47.7% were women and 55.0% of the individuals in the control group were men and 45.0% were women. The ages of the patients in the study group varied from 2 to 24 years old with a mean age of 12.8 years and a standard deviation of 5.9 years. In the control group the participants' ages ranged from 4 to 23 years old with a mean age of 14.1 years (standard deviation = 6.1 years). Half the patients of the study group were older than 12.5 years and in the control group half were older than 14 years.

Twenty-two (50%) of the 44 patients observed in this study with the diagnosis of NF1 presented with UBOs in at least one of the chosen regions of interest (Fig. 1). The most commonly involved region was the cerebellum followed by the basal ganglia, thalamus and pons (Fig.2).

The results presented in Fig. 3 show the differences in the bilateral thalamic and cerebellar FA values comparing NF1 patients with the control group. Statistically significant differences were identified for these chosen regions between the groups in respect to the mean values. Additionally, it was observed that the estimated medians in these regions were higher in the control group.

The results of the tests of significance (Student t-test) showed a decreased in the bilateral thalamic and cerebellar FA values ($p < 0.05$ – Table 1) comparing NF1 patients and the control group.

Table 2 lists the FA values comparing NF-1 patients with UBOs, NF-1 patients without UBOs and the control group. There were statistically significant differences between the groups in respect to the thalamus ($p = 0.001$) and cerebellum ($p \leq 0.001$). For the other regions, no significant differences were seen for the FA values ($p > 0.05$).

The results of Table 2 show that there are similarities in the mean FA values between NF1 patients without UBOs and those of the control group for the basal ganglia, bilateral cerebellum and pons. Statistically significant differences were only seen in the thalamus of NF1 patients without UBOs and the control group.

Estimations of the mean FA values calculated for NF-1 patients with UBOs, NF-1 without UBOs and the control group are shown in Table 3. These serve as mean reference values to evaluate NF1 patients.

Discussion

Although the nature of UBOs remains unclear, they are common findings in MR structural studies of children and adolescents with NF1. Despite the occurrence of UBOs, it is not an accepted criterion in the diagnosis of NF1 due to their transitory occurrence in the first decade of life, eventually disappearing during the subsequent decades.

In this study, UBOs were diagnosed in 50% of the patients with NF1 with ages between 2 and 24 years old, thus confirming previously published data that point to an estimated incidence of 50 to 80% for this age group [5,17-19].

We standardized the investigation of the basal ganglia, cerebellum, pons and thalamus according to the distribution of UBOs reported in previously published study samples [6,9,10,20]. Thalamic involvement was not specified in some studies, because the brainstem and diencephalon were analyzed together [20] or with the basal ganglia and the internal capsule [10].

The pathologic substrate of the UBOs is still unclear and requires histopathological studies for a better definition. There is only one anatomopathological report of UBOs which evaluated three NF1 patients showing the presence of vacuolar or spongiotic changes caused by intramyelinic edema [8]. The results of the study of DiPaolo et al. are limited due to the very small and heterogenic sample that studied patients with neurological manifestations resulting from a premature baby with an intraventricular hemorrhage and seizures, and the other received chemotherapy for treatment of fibrosarcoma. Only the third patient, who died as a result of complications during a scoliosis surgery [8].

Our study shows significant decreased FA values in the thalamus and cerebellum of NF1 patients when compared to the control group. The FA values were lower in the cerebellum of NF1 patients with UBOs. However in the thalamus, the lower FA values were independent as to whether the NF1 patients had UBOs or not. Hence our results support the hypothesis that there is a change in the microstructure of some regions of the brain of NF1 patients even when UBOs are not detected, as was suggested by Zamboni et al. in adults with NF1 [12]. However, as anisotropy may be affected by the intensity of the axonal injury and by the permeability of the membrane in regards to water

[21], it is not possible to discard the possibility of regional variations, by the varying intensity of the microstructural injury and anatomical changes related to the predominance of white matter, tracts, or gray matter in the studied areas.

On employing a methodology similar to ours, van Engelen et al. [21] demonstrated a correlation between the lower FA values and the occurrence of UBOs. In this study, only the cerebellar white matter presented with significantly lower FA values in NF1 patients. However, the authors also demonstrated higher FA values in NF1 patients in the globus pallidus compared to other regions. This increase in FA values may be due to the partial volume effect of white matter tracts in the region, including internal capsule and gray matter nuclei [21].

Some of the UBOs located in the basal ganglia region may characteristically present increased T1-weighted signal intensity. This increased T1-weighted signal intensity occurs in 20 to 50% of cases. The presence of increased T1-weighted signals intensity may be a result of remyelination of an area with an initial myelin disorder or related to microcalcification secondary to the repair process of intramyelinic edema [22, 23]. Thus, the increase FA in the globus pallidi could also be related the presence of microcalcifications. The results of the current study suggest greater involvement in the cerebellum and thalamus, even with the absence of structural abnormalities detectable by conventional MR. Our results agree with those of van Engelen et al. [21] and support the argument that regional variations seem to constitute a characteristic of the pathological process that characterizes NF1, as expressed by multifocal microstructural damage that may cause UBOs and abnormalities of FA which

are not detectable by conventional structural MRI techniques. The available information allows us to speculate on the presence of a spectral pattern of structural anomalies that may result from the expression of the mutation that determines the disease. We also believe that the higher FA values in the globus pallidus may occur due to microstructural characteristics of the region or even from the interference of other adjacent regions.

Currently it remains necessary to employ a technique to evaluate the microstructure of the brain in NF1 patients in order to better understand UBOs *in vivo*. Our study included a large number of subjects and controls, but with some limitations, in particular those inherent to impossibility of histopathologic correlations in this series. However, the results obtained allow some relevant observations that improve our understanding of the brain abnormalities in NF1 and point to the necessity of future studies that may increase available knowledge.

Conclusion

This study corroborates the necessity of employing modern imaging techniques to improve knowledge of microstructural brain changes in NF1. MR imaging using DTI suggests that UBOs are due to microstructural defect of the brain tissue in NF1 patients and even allows characterization of the tissue abnormalities that are not demonstrated in conventional MR sequences.

References

1. Riccardi VM. Neurofibromatosis phenotype, natural history and pathogenesis. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 1992.
2. Mentzel HJ, Seidel J, Fitzek C, Eichhorn A, Vogt s, Reichenbach JR, *et al.* Pediatric brain MRI in neurofibromatosis type I. *Eur Radiol* 2005;15:814-22.
3. NIH Consensus development conference: Neurofibromatosis. *Arch Neurol* 1988;45:575-8.
4. Mulvihill JJ, Parry DM, Sherman JL, Pikus A, Kaiser-Kupfer MI, Eldridge R. NIH conference neurofibromatosis 1 (Recklinghausen disease) and neurofibromatosis 2 (bilateral acoustic neurofibromatosis): an update. *Ann Intern Med* 1990;113:39-52.
5. DeBella K, Poskitt K, Szudek J, Triedman J. Use of "unidentified bright objects" on MRI for diagnosis of neurofibromatosis 1 in children. *Neurology* 2000;54:1646-51.
6. Sevick RJ, Barkovich AJ, Edwards MS, Koch T, Berg B, Lempert T. Evolution of white matter lesions in neurofibromatosis type 1: MR findings. *AJR Am J Roentgenol* 1992;159:171-5.
7. Gurless RG. Use of "unidentified bright objects" on MRI for diagnosis of neurofibromatosis 1 in children. *Neurology* 2000;55:1067-8.
8. DiPaolo DP, Zimmerman RA, Rorke LB, Zackai EH, Bilaniuk LT, Yachnis AT. Neurofibromatosis type 1: Pathologic substrate of high signal intensity foci in the brain. *Radiology* 1995;195:721-4.

9. Kraut MA, Gerring JP, Cooper KL, Thompson RE, Denckla MB, Kaufmann WE. Longitudinal evolution of unidentified bright objects in children with neurofibromatosis-1. *Am J Med Gen A* 2004;129:113-9.
10. Itoh T, Magnaldi S, White RM, Denckla MB, Hofman K, Naidu S, *et al.* Neurofibromatosis type 1; the evolution of deep gray and white matter MR abnormalities. *AJNR* 1994;15:1513-9.
11. Mamata H, Mamata Y, Westin CF, Shenton ME, Kikinis R, Jolesz FA, Maier SE. High-resolution line scan diffusion tensor MR imaging of white matter fiber tract anatomy. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2002;23:67-75.
12. Zamboni SL, Loenneker T, Boltshauser E, Martin E, Il'yasov KA. Contribution of diffusion tensor MR imaging in detecting cerebral microstructural changes in adults with neurofibromatosis type 1. *AJNR.* 2007;28:773-6.
13. Wei CW, Guo G, Mikulis DJ. Tumor effects on cerebral white matter as characterized by diffusion tensor tractography. *Can J Neurol Sci.* 2007;34:62-8.
14. Jellison BJ, Field AS, Medow J, Lazar M, Salamat MS, Alexander AL. Diffusion tensor imaging of cerebral white matter: a pictorial review of physics, fiber tract anatomy, and tumor imaging patterns. *AJNR.* 2004;25:356-69.
15. Tamura H, Takahashi S, Kurihara N, Yamada S, Hatazawa J, Okudera T. Practical visualization of internal structure of white matter for image interpretation: staining a spin-echo T2-weighted image with three echo-planar diffusion-weighted images. *AJNR.*2003;24:401-9.

16. Provenzale JM, Liang L, DeLong D, White LE. Diffusion tensor imaging assessment of brain white matter maturation during the first postnatal year. *AJR Am J Roentgenol.* 2007;189:476-86.
17. DeBella K, Szudek J, Friedman JM. Use of the National Institutes of Health criteria for diagnosis of neurofibromatosis 1 in children. *Pediatrics* 2000;105:608-14.
18. Szudek J, Friedman JM. Unidentified bright objects associated with features of neurofibromatosis 1. *Pediatr Neurol* 2002;27(2):123-7.
19. Lopes Ferraz Filho JR, Munis MP, Soares Souza A, Sanches RA, Goloni-Bertollo EM, Pavarino-Bertelli EC. Unidentified bright objects on brain MRI in children as a diagnostic criterion for neurofibromatosis type 1. *Pediatr Radiol.* 2008 Mar;38(3):305-10.
20. DiMario FJ, Ramsby G. Magnetic resonance imaging lesion analysis in neurofibromatosis type 1. *Arch Neurol* 1998;55:500-5.
21. Van Engelen SJ, Krab LC, Moll HA et al. Quantitative differentiation between healthy and disordered brain matter in patients with neurofibromatosis type I using diffusion tensor imaging. *AJNR* 2008;29(4):816-22.
22. Terada H, Barkovich AJ, Edwards MS, et al. Evolution of high-intensity basal ganglia lesions on T1-weighted MR in neurofibromatosis type 1. *AJNR Am J Neuroradiol* 1996;17:755-60.
23. Mirowitz SA, Sartor K, Gado M. High-intensity basal ganglia lesions on T1-weighted MR images in neurofibromatosis. *AJNR Am J Neuroradiol* 1989;10:1159-63.

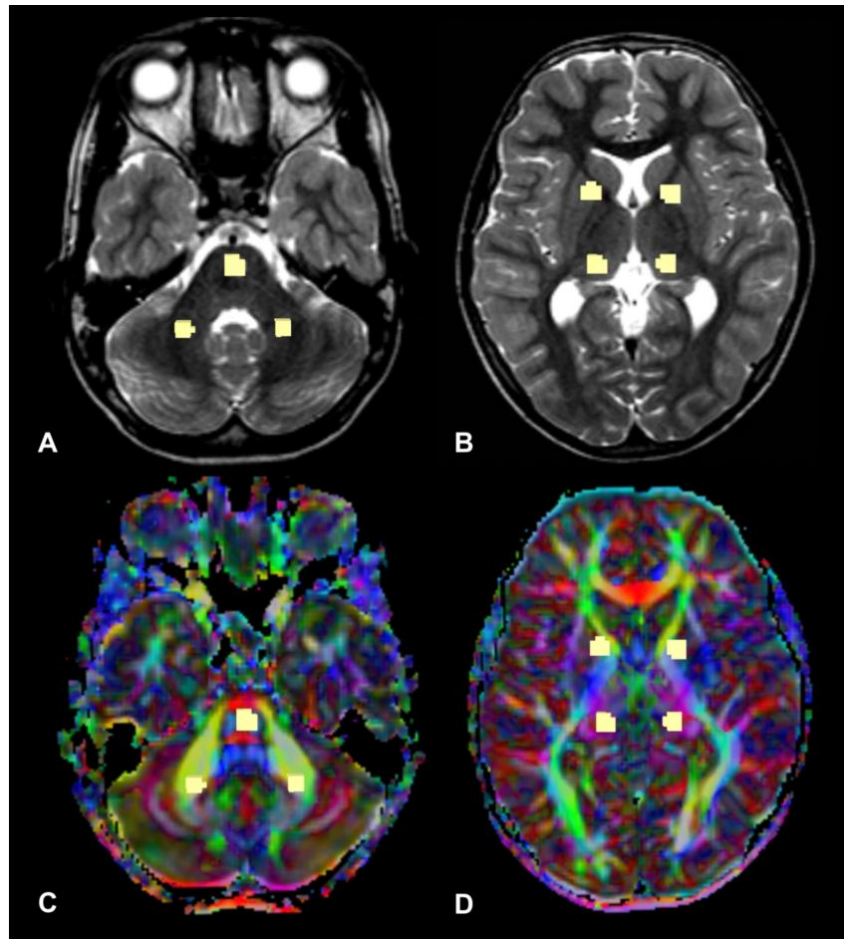


Fig.1: A-B Axial T2-weighted anatomic images and C-D color-encoded FA maps: circular regions of interest to quantitative analysis of the FA are placed in the cerebellar white matter and pons A-C and basal ganglia and thalamus B-D.

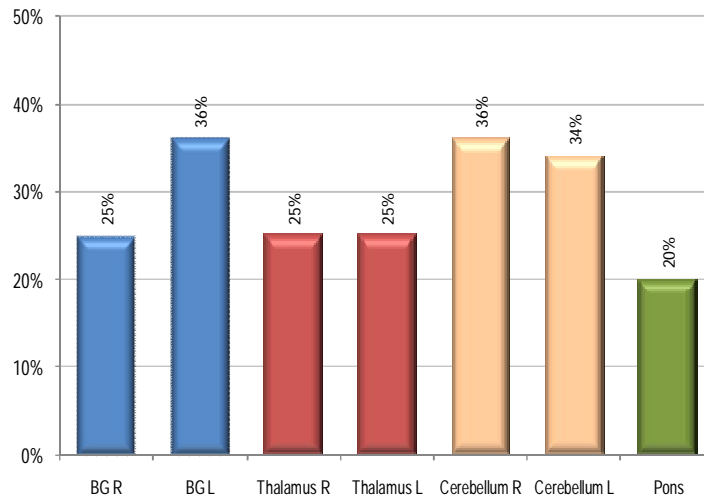


Fig. 2: Frequency of UBOS in the 44 patients diagnosed with NF1 according to the anatomic region.

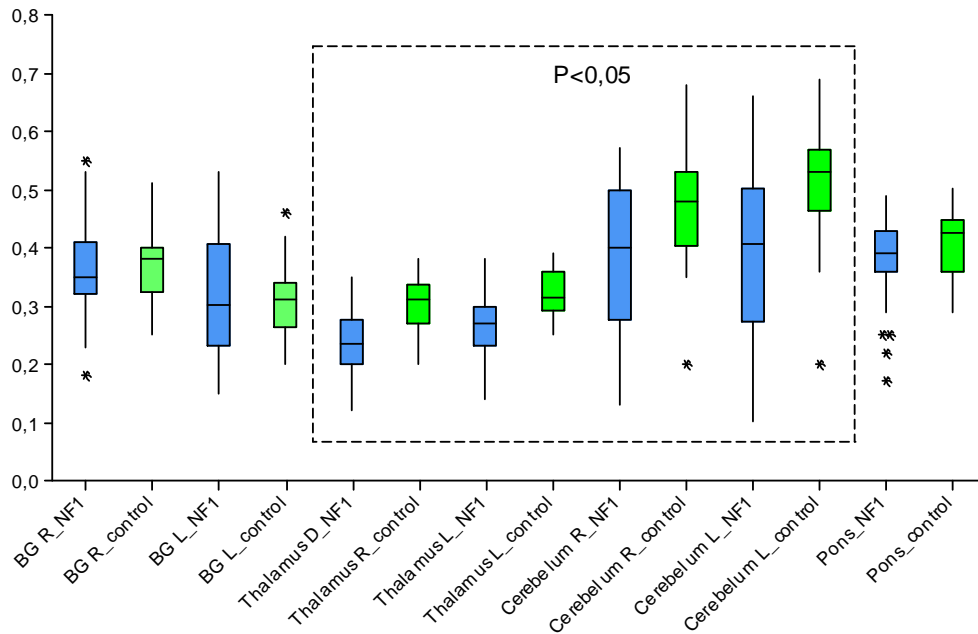


Fig. 3: Box plot showing differences in the FA value (dotted line) for each anatomic region of NF1 patients compared to control individuals.

Table 1: Results of the FA related to comparative tests between the NF1 group and control group.

FA	Case group (NF1)		Control group		p-value
	n=44	$\bar{x} \pm s$	n=20	$\bar{x} \pm s$	
Basal ganglia right		0.36±0.08		0.37±0.06	0.475
Basal ganglia left		0.32±0.09		0.31±0.06	0.712
Thalamus right		0.23±0.06		0.30±0.05	<0.001*
Thalamus left		0.26±0.05		0.32±0.04	<0.001*
Cerebellum right		0.38±0.13		0.47±0.10	0.005*
Cerebellum left		0.40±0.13		0.51±0.11	0.001*
Pons		0.38±0.07		0.41±0.07	0.211

*Significant p-value for a level of 0.05

Table 2: Results of the FA related to comparative tests (ANOVA) between NF-1 patients with UBOs, NF-1 patients without UBOs and the control group.

FA	Group NF1/with UBOs		Group NF1 /without UBOs		Control group		p-value (ANOVA)
	n	$\bar{x} \pm s$	n	$\bar{x} \pm s$	n	$\bar{x} \pm s$	
Basal ganglia right	22	0.36±0.10	22	0.36±0.07	20	0.37±0.06	0.773
Basal ganglia left	22	0.31±0.11	22	0.33±0.08	19	0.30±0.06	0.872
Thalamus right	22	0.23±0.07 ^a	22	0.24±0.05 ^a	20	0.30±0.05 ^b	<0.001*
Thalamus left	22	0.26±0.06 ^a	22	0.27±0.04 ^a	20	0.32±0.04 ^b	<0.001*
Cerebellum right	22	0.34±0.13 ^a	22	0.42±0.11 ^b	19	0.48±0.08 ^b	0.001*
Cerebellum left	22	0.36±0.13 ^a	20	0.43±0.13 ^b	19	0.53±0.08 ^b	<0.001*
Pons	20	0.40±0.05	21	0.40±0.06	20	0.41±0.07	0.797

*Significant p-value for a level of 0.05

A,b - Different letters indicate statistically significant differences in relation to the control group by Dunnett's (post hoc) test.

Table 3: Confidence interval (95%CI) – for mean FA values in each of the studied regions of NF1 patients.

Brain region	IC (95%)		
	Group NF1/ with UBOs	Group NF1/ without UBOs	Control group
Basal ganglia right	(0.32; 0.41)	(0.34; 0.39)	(0.34; 0.40)
Basal ganglia left	(0.27; 0.36)	(0.30; 0.34)	(0.28; 0.33)
Thalamus right	(0.19; 0.26)	(0.25; 0.29)	(0.28; 0.32)
Thalamus left	(0.23; 0.29)	(0.28; 0.31)	(0.30; 0.34)
Cerebellum right	(0.28; 0.40)	(0.44; 0.52)	(0.44; 0.52)
Cerebellum left	(0.30; 0.42)	(0.49; 0.56)	(0.49; 0.56)
Pons	(0.34; 0.41)	(0.38; 0.44)	(0.38; 0.44)

ARTIGO 2

Título: Unidentified bright objects in neurofibromatosis type 1: Conventional MRI in the follow-up and correlation of microstructural lesions on diffusion tensor images.

Autores: Ferraz-Filho JRL; da Rocha AJ; Muniz MP; Souza AS; Goloni-Bertollo EM; Pavarino-Bertelli EC.

Periódico: European Journal of Paediatric Neurology, aceito para publicação.

Date: Oct 22, 2011
To: "José Roberto Lopes Ferraz-Filho" jrl.ferraz@terra.com.br
From: "European Journal of Paediatric Neurology" ejpn@uz.kuleuven.ac.be
Subject: Your Submission

Ms. Ref. No.: EJPN-D-11-00059R1
Title: Unidentified bright objects in neurofibromatosis type 1: Conventional magnetic resonance imaging in the follow-up and correlation of microstructural lesions on diffusion tensor images
European Journal of Paediatric Neurology

Dear Dr. José Roberto Lopes Ferraz-Filho,

I am pleased to confirm that your revised paper "Unidentified bright objects in neurofibromatosis type 1: Conventional magnetic resonance imaging in the follow-up and correlation of microstructural lesions on diffusion tensor images" has been accepted for publication in European Journal of Paediatric Neurology. Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,

Lieven Lagae
Editor-in-Chief
Editorial Office
European Journal of Paediatric Neurology

Abstract

Purpose: To evaluate the evolution of unidentified bright objects (UBOs) in individuals with neurofibromatosis type 1 (NF1) by serial magnetic resonance imaging (MRI), and to relate this to regional fractional anisotropy (FA). **Materials and Methods:** The signal pattern of the T2-weighted sequences in the basal ganglia, thalamus, brain stem, and cerebellum for 27 NF1 individuals and a control group were analyzed by diffusion tensor imaging (DTI). The presence or absence of UBOs in 2 consecutive MRI examinations was related to FA. **Results:** We demonstrated significant differences in FA for the basal ganglia, cerebellum, and thalamus between NF1 patients and controls ($P \leq 0.05$), even with a reduction or disappearance of UBOs. **Conclusions:** MRI allows for adequate monitoring of the temporal and spatial distribution of UBOs in patients with NF1. DTI confirmed changes in FA despite the disappearance or reduction of UBOs, thereby confirming the hypothesis that microstructural damage occurs in specific brain regions of NF1 patients.

Key words: Neurofibromatosis type 1, Magnetic resonance imaging, Diffusion tensor imaging, Brain, unidentified bright objects.

Introduction

Neurofibromatosis type 1 (NF1) results in the appearance of hyperintensities on T2-weighted images in the brain; these hyperintensities are referred to as unidentified bright objects (UBOs).¹⁻⁴ Although they are not considered one of the accepted criteria in the diagnosis of NF1,³ UBOs have been identified in the cerebellum, brain stem, thalamus, and basal ganglia,⁵ especially in children and adolescents.⁵⁻⁷

The exact nature of UBOs remains unclear. Histological analysis has shown that UBOs result from a vacuolar or spongiotic alteration in the white matter caused by intramyelinic edema.⁸ These cerebral microstructural changes are transient, as has been shown by longitudinal magnetic resonance imaging (MRI) studies of patients over the first decades of life.^{6,9,10}

MRI with diffusion tensor imaging (DTI) is used to detect white matter abnormalities by measuring fractional anisotropy (FA). This technique, which allows an estimation of regional white matter integrity¹¹⁻¹³, has proven to be superior to conventional techniques in several pathological models.^{14,15} By estimating the occurrence of axonal damage or abnormal myelination in patients with NF1, this method may potentially improve our understanding of the microstructure of the brain parenchyma.^{16,17}

The aims of this study were to serially evaluate UBOs by conventional MRI to better understand their distribution over time and space, and also to correlate them with microstructural analysis in the chosen brain regions of interest, using DTI, by comparing NF1 patients with a control group.

Materials and Methods

We analyzed patients diagnosed as having NF1 between 2003 and 2009 according to the National Institutes of Health Criteria. Two consecutive MRI examinations were performed for comparative analysis of the spatial distribution and temporal pattern of UBOs.

We selected an individually healthy age- and gender-matched control group, which consisted of 20 healthy individuals without clinical characteristics of NF1, a familial history of NF1, or structural MRI abnormalities. The study was approved by the Institutional Research Ethics Committee, and guardians of participants gave written informed consent.

Individuals with a history of any type of neurological disease, such as cerebrovascular disease, central nervous system infection, or brain tumors; who had undergone brain radiotherapy or systemic chemotherapy; or who had any type of implanted metal device that may interfere in the performance or evaluation of the MRI study were excluded from both groups.

All MRI were performed using 1.5 Tesla Philips system (Intera scanner and hardware, Release 11) utilizing a dedicated 8-channel head coil. The protocol included structural images with the evaluation of T2 TSE sequences (TR/TE = 4466/110 ms), 5-mm slices with a 1-mm gap, FOV 250, matrix 512, NSA 2; T1 TSE sequences (TR/TE = 550/15 ms), 5-mm slices with a 1-mm gap, FOV 230 × 85, matrix 256 × 512, NSA 2; and axial FLAIR sequences (TR/TE/TI = 6000/120/1800 ms), 5-mm slices with a 1-mm gap, FOV 250, matrix 256 × 512, NSA 3.

The DTI protocol was performed during the second MR acquisition. It included SE-EPI images (TR/TE = 6569/75 ms) with b-factor 1000 s/mm² in 15 directions, a slice thickness of 3.5 mm with a 0.5-mm gap, FOV 240 × 240, matrix 110 × 128, NSA 3, EPI Bandwidth-7911, SENSE acceleration 2.5.

Images were exported in the specific REC/PAR format of the manufacturer and analyzed using a tractography tool (PRIDE Fiber tracking tool, Philips). FA color-coded maps were superimposed on anatomical T2-weighted images to better identify the anatomical areas of interest.

MRI was analyzed by visual inspection by an experienced professional who actively looked for UBOs (spatial distribution). We only included those NF1 patients who had at least 2 consecutive MRI examinations to establish an evolution pattern for UBOs with respect to number and size (temporal behavior). UBOs were interpreted individually on consecutive slices, considering their diameter and signal intensity to conduct a qualitative analysis. For each UBO three possibilities were considered according to this analysis: unaltered, reduced or enlarged.

The quantitative analysis of FA was obtained in the second MRI examination of NF1 patients and in the control group. To compare both groups of individuals, we manually defined brain regions of interest (20 mm³). We defined four pre-determined anatomic regions, which are well known to be the preferred location for signal abnormalities in brain: 1) basal ganglia (BG); 2) cerebellum: cerebellar white matter; 3) brainstem: pons; 4) diencephalon: thalamus.

The FA of both groups (NF1 and control) was compared using Student's *t*-test, which compares the means of independent samples. Student's *t*-test for paired samples was used to compare the number of lesions of 2 consecutive MRI examinations. The results are presented as percentages and 95% confidence interval (CI). The level of significance was set at a P-value of ≤ 0.05 . Analyses were achieved using Minitab[®] 15 statistical software.

Results

Twenty-seven individuals diagnosed as having NF1 who performed 2 consecutive MRI examinations at intervals of 1 to 5 years (mean, 3.4 [1.2] years) were included in this study. The ages at first examination (RM1) ranged from 4 to 19 years (mean, 10.9 [4.3] years). At the second examination (RM2), the patients were aged between 5 and 24 years (mean, 14.3 [4.7] years). The control group consisted of 20 healthy individuals matched for age and gender (55% male), with ages ranging from 4 to 23 years (average, 14.1 [6.1] years).

Figure 1 shows the frequency of UBOS in the patients diagnosed as having NF1 according to specific regions of the brain at RM1 and RM2. There was an overall reduction in lesions between the 2 examinations. Although 17 (63%) patients presented with UBOs in some region of the brain at RM1, this was reduced to 13 (48%) patients at RM2.

There was no statistically significant difference in the mean number of lesions per patient from RM1 (mean, 2.7 [2.7]) to RM2 (mean, 2.0 [2.7]). It is

worth mentioning that 4 patients had lesions in all 7 regions investigated in this study.

An analysis of consecutive MRI examinations showed that for 15 patients (55.6%), the pattern of UBOs remained unchanged; for 3 (11.1%), the number and/or volume increased; and for 9 (33.3%), there was a reduction.

Table 1 shows the evolution of UBOs with respect to the age of NF1 patients. Of 8 patients (29.6%) who were under 10 years of age at both MRI evaluations, 3 (37.5%) had increases in UBOs; in 5 (62.5%), the pattern remained unaltered; and no patient showed a decrease. Of the patients who were under 10 years of age at RM1 and over 10 years of age at RM2, the number and volume of UBOs remained unchanged in 2 (40%), while there was a decrease in the UBOs in 3 (60%). Of the 14 patients who were over 10 years of age at both tests (51.9%), 8 (57.1%) showed no change in the pattern of UBOs and 6 (42.9%) showed a decrease in the number and/or size.

Figure 2 and Table 2 show the changes in FA of the different anatomical regions of patients who had decreases in UBOs between the 2 consecutive MRI examinations. The mean FA was lower for the right basal ganglia (BG), left and right thalamus, and left cerebellum when decreases in lesions occurred. Note also that for these regions, the mean FA in this subgroup of patients was lower than that in the control group ($P < 0.05$). No relationship between the decrease in UBOs and FA could be inferred for the other regions (left BG, right cerebellum, and pons). Figure 3 show UBOs in globus pallidus and follow-up MRI with disappears of UBOs and reduced FA in the same region as UBOs in color-encoded FA maps.

Table 3 lists the FA value of each region of the brain for patients in whom the lesions disappeared between RM1 and RM2.

Discussion

The spatial distribution of UBOs in our series is in agreement with that of previously published data; ^{5,18-20} we observed UBOs in 48% of children and adolescents with NF1. UBOs were more commonly found in the BG followed by the thalamus and cerebellum, with the brain stem being the least involved. This spatial distribution has been described in previous studies. ^{6,9,10,21} Some reports did not specifically identify the involvement of the thalamus, but combined it with the brain stem and diencephalon, ²¹ or even with the BG and internal capsule. ¹⁰

Variations in the size and number of UBOs over the first decades of life have been described. They have rarely been seen in individuals over 20 years of age. ^{7,9,10} Although our study shows temporal variations in UBOs in line with the age of patients, there was a predominance of unaltered patterns at all ages during the follow-up. This may have resulted from the relatively small number of cases or the short follow-up period. Nevertheless, our study demonstrates the absence of any reduction in the UBOs within the first decade of life, and even shows a tendency of these lesions to increase, particularly in the early years. However, after the first decade, although some lesions remained unchanged, most lesions disappeared or decreased in size. This nonlinear pattern of evolution also agrees with the results of previous reports. ^{10,21,22}

In children under 2 years of age, the evaluation of UBOs by MRI is not precise due to the incomplete myelination of the brain in this period.²³ Even so, it is important to recognize the different behavioral patterns of UBOs, particularly in the first decade, during which time there is a tendency for UBOs to increase in number and volume, as shown by our results. An increase in UBOs during adolescence has been reported;⁹ however, this pattern of evolution was not observed in our series.

Kraut et al.⁹ showed a linear decrease of UBOs only in the medial cerebellar structures of adolescents, whereas they reported that these hyperintense lesions appear to have a nonlinear evolution in the BG (striatum) on T2-weighted images. In contrast, our results demonstrated that the disappearance of UBOs in subsequent MR examinations occurred more frequently in the BG and thalamus, which is in agreement with the data published by DiMario and Ramsby.²¹

Our report depicted a reduction in the mean FA in regions where UBOs were identified. There were statistically significant differences ($P < 0.05$) between the FA values of NF1 patients and those of the control group for regions where there was a decrease in the number or volume of UBOs (right BG, thalamus, and left cerebellum). On analyzing only regions where the UBOs disappeared, the FA values showed a trend toward decreasing or approaching the average values of the control group.

Van Engelen et al.¹⁷ demonstrated a relationship, specifically in cerebellar white matter, between a decreased FA value and the occurrence of UBOs in NF1 individuals. Zamboni et al.¹⁶ observed a decrease in the FA value

in all brain regions of adults with NF1 compared with age-matched healthy volunteers, suggesting a persistently abnormal microstructure, even in adulthood.

This study has some limitations related to the absence of pathological correlation. Moreover, DTI analysis was only performed in the second MR examination. In spite of this, our report offers a new perspective on the study of the relationship between the mean FA and the decrease, or even disappearance, of UBOs over time. Our findings support the hypothesis that microstructural changes persist in the brain parenchyma, even in those regions where UBOs have reduced or disappeared. The opportunity to demonstrate structural differences in coexisting lesions by using the DTI technique and to predict associated temporal variations should be the subject of future studies with a longer follow-up and larger sample size.

Conclusion

Our study confirms a predictable pattern of spatial distribution and temporal variation of UBOs in NF1 individuals. Our data reinforce the hypothesis of impairment in likely brain regions, and may point to a trend toward an increase in the number and size of UBOs over the first years of life and a reduction in the lesions as adolescence progresses.

MRI with DTI confirms the relationship between reduced mean FA and the occurrence of UBOs (spatial distribution), even after the decrease or disappearance of the lesions (temporal variation). The results denote the

occurrence of persistent microstructural damage in specific brain regions in NF1 patients.

References

1. Riccardi VM. Neurofibromatosis phenotype, natural history and pathogenesis. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 1992.
2. Mentzel HJ, Seidel J, Fitzek C, Eichhorn A, Vogt s, Reichenbach JR, *et al.* Pediatric brain MRI in neurofibromatosis type I. *Eur Radiol* 2005;15:814-22.
3. NIH Consensus development conference: Neurofibromatosis. *Arch Neurol* 1988;45;575-8.
4. Mulvihill JJ, Parry DM, Sherman JL, Pikus A, Kaiser-Kupfer MI, Eldridge R. NIH conference neurofibromatosis 1 (Recklinghausen disease) and neurofibromatosis 2 (bilateral acoustic neurofibromatosis): an update. *Ann Intern Med* 1990;113:39-52.
5. DeBella K, Poskitt K, Szudek J, Tiedman J. Use of "unidentified bright objects" on MRI for diagnosis of neurofibromatosis 1 in children. *Neurology* 2000;54:1646-51.
6. Sevick RJ, Barkovich AJ, Edwards MS, Koch T, Berg B, Lempert T. Evolution of white matter lesions in neurofibromatosis type 1: MR findings. *AJR Am J Roentgenol* 1992;159:171-5.
7. Gurless RG. Use of "unidentified bright objects" on MRI for diagnosis of neurofibromatosis 1 in children. *Neurology* 2000;55:1067-8.

8. DiPaolo DP, Zimmerman RA, Rorke LB, Zackai EH, Bilaniuk LT, Yachnis AT. Neurofibromatosis type 1: Pathologic substrate of high signal intensity foci in the brain. *Radiology* 1995;195:721-4.
9. Kraut MA, Gerring JP, Cooper KL, Thompson RE, Denckla MB, Kaufmann WE. Longitudinal evolution of unidentified bright objects in children with neurofibromatosis-1. *Am J Med Gen A* 2004;129:113-9.
10. Itoh T, Magnaldi S, White RM, Denckla MB, Hofman K, Naidu S, *et al.* Neurofibromatosis type 1; the evolution of deep gray and white matter MR abnormalities. *AJNR Am J Neuroradiol* 1994;15:1513-9.
11. Jellison BJ, Field AS, Medow J, Lazar M, Salamat MS, Alexander AL. Diffusion tensor imaging of cerebral white matter: a pictorial review of physics, fiber tract anatomy, and tumor imaging patterns. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2004;25:356-69.
12. Tamura H, Takahashi S, Kurihara N, Yamada S, Hatazawa J, Okudera T. Practical visualization of internal structure of white matter for image interpretation: staining a spin-echo T2-weighted image with three echo-planar diffusion-weighted images. *AJNR Am J Neuroradiol* 2003;24:401-9.
13. Provenzale JM, Liang L, DeLong D, White LE. Diffusion tensor imaging assessment of brain white matter maturation during the first postnatal year. *AJR Am J Roentgenol.* 2007;189:476-86.
14. Mamata H, Mamata Y, Westin CF, Shenton ME, Kikinis R, Jolesz FA, Maier SE. High-resolution line scan diffusion tensor MR imaging of white matter fiber tract anatomy. *AJNR Am J Neuroradiol* 2002;23:67-75.

15. Wei CW, Guo G, Mikulis DJ. Tumor effects on cerebral white matter as characterized by diffusion tensor tractography. *Can J Neurol Sci.* 2007;34:62-8.
16. Zamboni SL, Loenneker T, Boltshauser E, Martin E, Il'yasov KA. Contribution of diffusion tensor MR imaging in detecting cerebral microstructural changes in adults with neurofibromatosis type 1. *AJNR Am J Neuroradiol* 2007;28:773-6.
17. Van Engelen SJ, Krab LC, Moll HA et al. Quantitative differentiation between healthy and disordered brain matter in patients with neurofibromatosis type I using diffusion tensor imaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 2008;29:816-22.
18. DeBella K, Szudek J, Friedman JM. Use of the National Institutes of Health criteria for diagnosis of neurofibromatosis 1 in children. *Pediatrics* 2000;105:608-14.
19. Szudek J, Friedman JM. Unidentified bright objects associated with features of neurofibromatosis 1. *Pediatr Neurol* 2002;27(2):123-7.
20. Lopes Ferraz Filho JR, Munis MP, Soares Souza A, Sanches RA, Goloni-Bertollo EM, Pavarino-Bertelli EC. Unidentified bright objects on brain MRI in children as a diagnostic criterion for neurofibromatosis type 1. *Pediatr Radiol.* 2008 Mar;38(3):305-10.
21. DiMario FJ, Ramsby G. Magnetic resonance imaging lesion analysis in neurofibromatosis type 1. *Arch Neurol* 1998;55:500-5.
22. North K. Neurofibromatosis type 1. *Am J Med Genet* 2000; 97:119-27.

23. Barkovich AJ, Kjos BO, Jackson DE Jr, Norman D. Normal maturation of the neonatal and infant brain: MR imaging at 1.5 T. *Radiology* 1988;166:173-80.

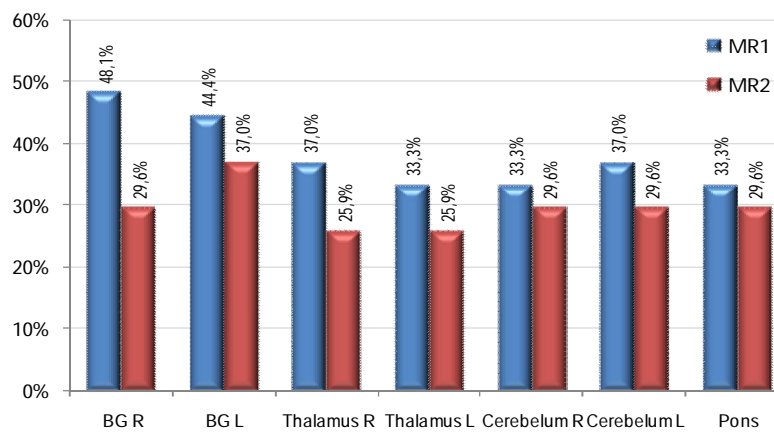


Fig 1. Frequency of UBOS in the 27 patients diagnosed with NF1 according to the anatomic region at RM1 and RM2.

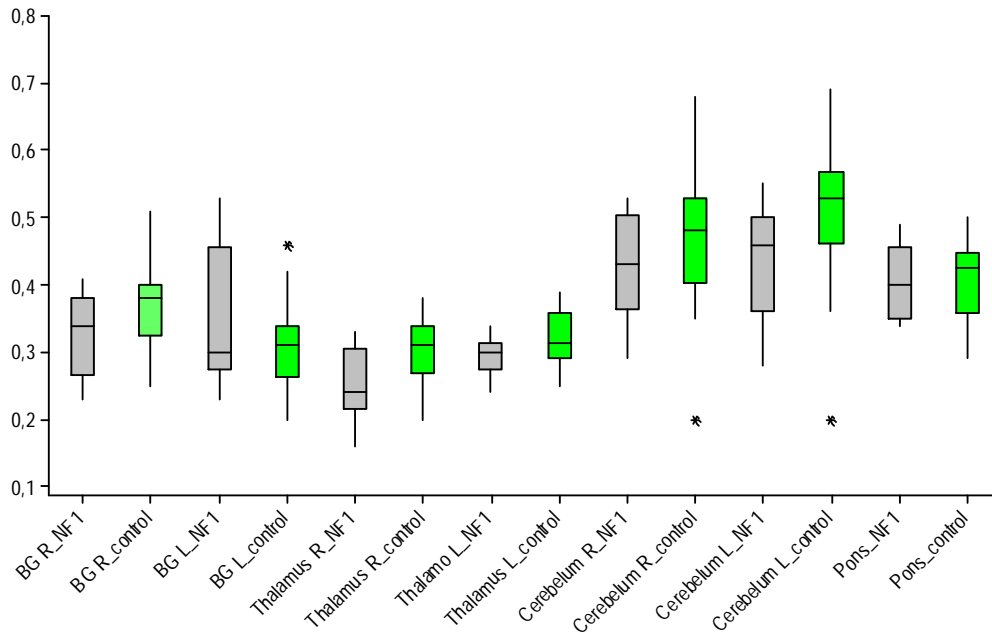


Fig 2. Box plot of FA by region of brain in patients for whom the UBOs decreased (gray) and the control group (green).

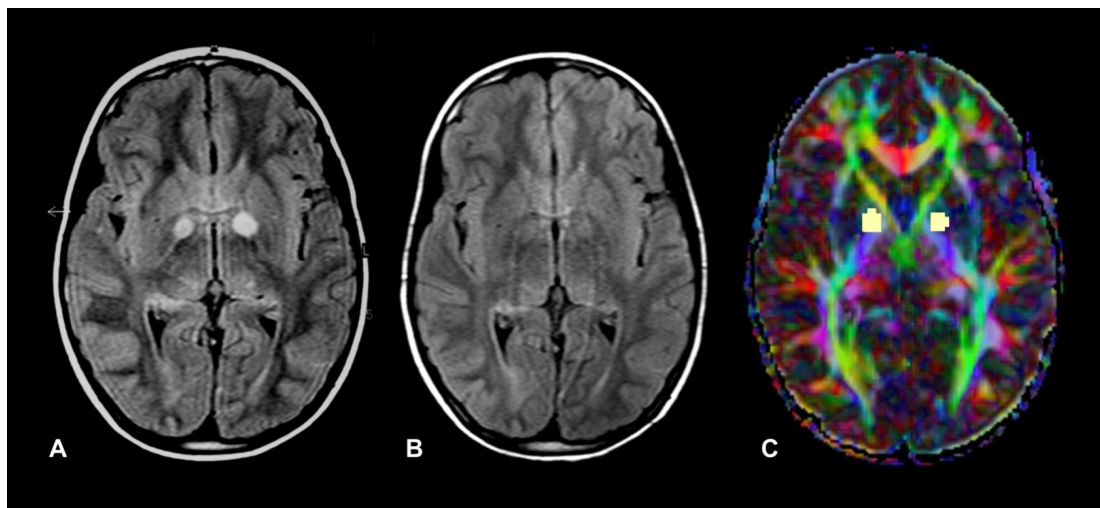


Fig 3. An 7 year old girl with NF1. (A) Axial T2-weighted MRI across the globus pallidus showing UBOs. (B) Follow-up MRI after 3 years showing disappears of UBOs and (C) color-encoded FA maps with circular regions of interest in the same region as UBOs.

Table 1. The evolution of UBOs at RM1 and RM2 stratified by age of NF1 patients.

RM1	RM2	Evolution of UBOs			Total
		Increase	No change	Decrease	
<10 years	<10 years	3 (37.5%)	5 (62.5%)	0	8
<10 years	>10 years	0	2 (40%)	3 (60%)	5
>10 years	>10 years	0	8 (57.1%)	6 (42.9%)	14
Total		03	15	9	27

Table 2. Comparison of the FA of patients for whom UBOs decreased between RM1 and RM2 and the control group.

	NF1 group	Control group	P-value
	(n=9)	(n = 20)	
	<i>(Student t-test)</i>		
	FA $\bar{x} \pm s$	FA $\bar{x} \pm s$	
Right BG	0.33 \pm 0.06	0.37 \pm 0.06	0.048*
Left BG	0.35 \pm 0.11	0.31 \pm 0.06	0.824
Right thalamus	0.25 \pm 0.06	0.30 \pm 0.05	0.023*
Left thalamus	0.30 \pm 0.03	0.32 \pm 0.04	0.042*
Right cerebellum	0.43 \pm 0.08	0.48 \pm 0.08	0.183
Left cerebellum	0.43 \pm 0.09	0.53 \pm 0.08	0.019*
Pons	0.41 \pm 0.05	0.41 \pm 0.07	0.467

*Significant p-value for a level of 0.05

Table 3. FA of the different regions of the brain in each patient for whom the UBOs disappeared between RM1 and RM2 compared to the control group.

Brain region	Control group		NF1 group
	$\bar{x} \pm s$	95% CI	Value FA
Right BG	0.37 ± 0.06	(0.34; 0.40)	0.29; 0.32; 0.38; 0.38; 0.40
Left BG	0.31 ± 0.06	(0.28; 0.33)	0.43; 0.53
Right thalamus	0.30 ± 0.05	(0.28; 0.32)	0.16; 0.20; 0.23; 0.33
Left thalamus	0.32 ± 0.04	(0.30; 0.34)	0.28; 0.29; 0.34
Right cerebellum	0.48 ± 0.08	(0.44; 0.52)	0.32; 0.49
Left cerebellum	0.53 ± 0.08	(0.49; 0.56)	0.28; 0.35; 0.55
Brainstem	0.41 ± 0.07	(0.38; 0.44)	0.34; 0.47; 0.49

ARTIGO 3

Título: Espectroscopia por RM em Neurofibromatose tipo 1 é capaz de detectar anormalidades metabólicas não reveladas no parênquima cerebral de aparência normal?

Autores: Ferraz-Filho JRL, da Rocha AJ; Muniz MP; Rodrigues-Junior ACP; Moreno-Junior W ; Santana-Netto PV; Goloni-Bertollo EM; Pavarino EC.

Periódico: Arquivos de neuropsiquiatria, a ser submetido para publicação.

Resumo

Objetivo: Avaliar os padrões metabólicos por meio da espectroscopia por ressonância magnética (ERM) da região palidal e suas correlações com a ocorrência de lesões focais de hipersinal em T2 (FHE-T2) em uma série de pacientes com Neurofibromatose Tipo1 (NF1). Material e Métodos: Foram analisados 42 indivíduos com NF1, e 25 controles saudáveis, pareados por gênero e idade. Analisamos a relação dos metabólitos colina/creatina (Co/Cr), N-acetil aspartato/creatina (Naa/Cr) e Mioinositol/creatina (Mi/Cr) e a ocorrência de FHE-T2 na região palidal em indivíduos com NF1. Resultados: Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos NF1 e controle quanto aos valores médios de Mi/Cr e Co/Cr ($P < 0,05$), com maiores valores dos metabólitos evidenciados no grupo NF1. Apenas a relação Mi/Cr permitiu discriminar os subgrupos NF1 com e sem FHE-T2. Para relação Naa/Cr, não se observou diferença estatisticamente significativa entre o grupo NF1 e controle. Conclusão: A ERM permite a caracterização de anormalidades teciduais não demonstráveis nas imagens estruturais de pacientes com NF1 por meio da análise dos metabólitos Co e Mi. Os valores inalterados de Naa podem refletir a estabilidade neuronal funcional da região e a ausência de manifestações clínicas dos FHE-T2.

Palavras-chave: Ressonância Magnética, Neurofibromatose Tipo 1, encéfalo, Espectroscopia por ressonância magnética, "Unidentified bright objects".

Abstract

Purpose: This study employed magnetic resonance spectroscopy (MRS) to evaluate the metabolic patterns of the brain in the presence of Unidentified Bright Objects (UBOs) in patients with Neurofibromatosis Type1 (NF1). **Patients and methods:** Forty-two NF1 patients and 25 healthy controls matched for age and gender were analyzed. The choline/creatine (Co/Cr), N-acetyl aspartate/creatine (NAA/Cr) and myo-inositol/creatine (MI/Cr) metabolite ratios were analyzed and related to occurrence of UBOs in the pallidal region of individuals with NF1 and controls. **Results:** There was a statistically significant difference in the MI/Cr and Co/Cr ratios (p -value < 0.05) between the NF1 and control groups with higher values in the NF1 group. In particular, the MI/Cr ratio enabled discrimination of NF1 subgroups with and without UBOs. There was no statistically significant difference in respect to the NAA/Cr ratio between the NF1 and control groups. **Conclusion:** MRS allows the characterization of tissue abnormalities not demonstrable in structural images of NF1 patients by an analysis of the Co and MI metabolites. Unchanged values of NAA may reflect neuronal functional stability of the region and the absence of clinical manifestations of UBOs.

Keywords: Magnetic resonance imaging, Neurofibromatosis Type1, Brain, Magnetic resonance spectroscopy, Unidentified bright objects.

Introdução

A Neurofibromatose tipo 1 (NF1) é uma doença genética autossômica dominante com frequência de 1 em 3000 nascidos vivos. (1) O diagnóstico da NF1 pode ser obtido por meio de dados clínicos e de imagem com base nos critérios estabelecidos pelo *National Institutes of Health* (NIH). (2,3)

Lesões encefálicas não-neoplásicas podem ser detectadas pela ressonância magnética (RM) e correspondem a lesões focais de hipersinal no encéfalo na ponderação T2 (FHE-T2), iso/ hiperintensos em T1, sem efeito de massa ou impregnação pelo contraste intravenoso, também chamadas de “Unidentified Bright Objects” (UBOs).(4) Os FHE-T2 têm distribuição mais freqüente no cerebelo, tronco encefálico e núcleos da base, particularmente de crianças e adolescentes (5,6).

A natureza exata dos FHE-T2 ainda não está clara, mas é sabido tratar-se de alteração transitória, que tende a desaparecer com a progressão da idade e da mielinização.(7-13) A correlação com estudos histopatológicos é muito escassa e sugere tratar-se de áreas de alteração vacuolar e espongiótica na substância branca compatível com edema intramielínico.(6)

A espectroscopia por ressonância magnética (ERM) já se mostrou útil na detecção de anormalidades metabólicas do encéfalo em diversas afecções neurológicas, mesmo na ausência de anormalidades estruturais detectáveis às seqüências convencionais de RM.(14) Contudo, ainda não está definido o papel da ERM no estudo das lesões não-neoplásicas do encéfalo de indivíduos

com NF1.

Este estudo tem como objetivo avaliar os padrões metabólicos por meio da ERM da região palidal e suas correlações com a ocorrência de FHE-T2 em uma série de pacientes com NF1.

Materiais e métodos

Foram incluídos 42 indivíduos com diagnóstico de NF1, de acordo com os critérios estabelecidos pelo *National Institute of Health* (NIH), que se encontravam em acompanhamento no ambulatório especializado, no período de 2007 a 2009. Os pacientes foram divididos de acordo com a presença ou não de FHE-T2 na região palidal.

O grupo controle foi composto por 25 indivíduos saudáveis sem história clínica ou familiar de NF1, cujo exame de RM não demonstrou anormalidades estruturais. O estudo foi aprovado pelo Comitê Institucional de Ética em Pesquisa e os responsáveis assinaram o termo de consentimento informado.

Na suspeita de neoplasia glial primária, foram excluídos do estudo aqueles indivíduos cuja imagem estrutural demonstrava efeito expansivo, hipossinal em T1 ou impregnação pelo contraste paramagnético intravenoso.

Os exames foram realizados em aparelho Philips 1.5T Intera (Scanner hardware release 11) utilizando uma bobina específica de cabeça com 8 canais. O protocolo incluiu seqüências T1 e T2/FLAIR, bem como a injeção de contraste paramagnético intravenoso em T1, para a avaliação global do encéfalo. Para o propósito de localização das alterações estruturais (FHE-T2)

de interesse no estudo foram analisadas as imagens FLAIR axial (TR / TE/ TI = 6000/ 120/ 2000 ms), espessura de corte 5 mm com GAP 1 mm, FOV 250x80, matrix 256x512, NSA 3. A ERM foi realizada com técnica de *voxel* único (1,5 x 1,5x 1,5mm) que incluía os FHE-T2 palidais nos doentes e o globo pálido nos doentes e controles, empregando aquisição da técnica PRESS, com TE 23 m/s e pulso de inversão para supressão da água.

A avaliação das imagens estruturais foi realizada por radiologista com conhecimento específico que procedeu à busca ativa dos FHE-T2 nos globos pálidos visando o posicionamento do *voxel* da espectroscopia. A espectroscopia foi realizada de forma automatizada que permitiu a avaliação quantitativa dos picos dos metabólitos por meio das relações colina/creatina (Co/Cr), N-acetil aspartato/creatina (Naa/Cr) e Mioinositol/creatina (Mi/Cr).

A espectroscopia foi realizada em apenas um dos lados na região palidal em ambos os grupos (NF1 e controle). No grupo NF1, quando a lesão era unilateral o *voxel* foi posicionado no lado da lesão e nas lesões bilaterais o *voxel* foi posicionado na lesão de maiores dimensões. No grupo controle, o posicionamento de *voxel* foi padronizado no lado esquerdo na região palidal.

Para análise estatística das alterações metabólicas para Mi/Cr, Co/Cr e Naa/Cr, foi calculado o intervalo de confiança de 95% e utilizado o teste t de *Student* para amostras independentes, visando comparar os pacientes com NF1 e controles. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi empregado no estudo do efeito da lesão, considerando os três grupos de pacientes: NF1/com FHE-T2, NF1/sem FHE-T2 e controles. Quando apropriado foi efetuado o *post hoc* da mediana para comparar cada grupo de NF1 (com e sem FHE-T2) com o

grupo controle.

Boxplot, *dotplot* e gráfico de setores foram construídos para ilustração dos resultados. As análises foram realizadas utilizando o software estatístico Minitab® 15. Para os testes estatísticos adotou-se um nível de significância de 0,05.

Resultados

Um total de 67 indivíduos foi incluído neste estudo, divididos em dois grupos (NF1 e controle). O grupo NF1 foi composto por 42 indivíduos, enquanto 25 indivíduos saudáveis formaram o grupo controle. No grupo de estudo, 50% dos indivíduos eram do sexo masculino e 50% do sexo feminino e 48% dos indivíduos no grupo controle eram homens e 52% mulheres. A idade dos pacientes do grupo NF1 variou de 4 a 24 anos, com média 13,2 anos e desvio padrão de 5,9 anos. Pacientes no grupo controle tinha média de 13,9 anos e desvio padrão de 5,7 anos, estando compreendidos no intervalo de 2 a 23 anos. No grupo controle, a media de idade foi de 14 anos e para o grupo NF1 foi de 12,5 anos. Nenhum paciente com NF1 incluído no estudo apresentou manifestações clínicas atribuíveis ao comprometimento dos globos pálidos.

Os FHE-T2 no globo pálido foram demonstrados em 18/42 (43%) pacientes com NF1, com comprometimento palidal bilateral em 10 indivíduos. (Tabela1)

Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto

aos valores médios de Mi/Cr e Co/Cr ($P < 0,001$ pelo teste *t de Student*). Valores aumentados de Mi/Cr e Co/Cr foram observados para o grupo NF1, embora não foi possível a definição de um valor de corte que permita assegurar tal comportamento. (Tabela 2)

No caso da relação Naa/Cr, os valores médios não discriminam estatisticamente os grupos NF1 e controle, resultado confirmado pelo teste *t Student* ($P = 0,168$). Observou-se, ainda, superioridade nas estimativas de desvio padrão (s) e coeficiente de variação (cv) relativos ao grupo NF1, o que revela que nesses pacientes as relações estudadas apresentam valores com maior variabilidade entre os pacientes.

Em relação aos intervalos de 95% de confiança, foi observada diferença entre NF1 e controle para Mi/Cr com variação entre -0,26 e -0,06, revelando a influência do grupo NF1 no aumento médio de Mi/Cr. Para Co/Cr, as médias foram de -0,18 e -0,05 (IC=95%), também indicando valores aumentados de Co/Cr no grupo NF1. Para Naa/Cr, a diferença média entre NF1 e controle não foi estatisticamente significativa.

A análise estatística não paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis foi realizada para cada variável separadamente. Os três grupos analisados foram: NF1 com FHE-T2, NF1 sem FHE-T2 e controles. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para Mi/Cr ($P = 0,001$) e Co/Cr ($P = 0,008$). (Tabela 3)

Os testes de comparação múltipla (teste *post hoc*) sugeriram que a presença dos FHE-T2 é um diferencial substancial para Mi/Cr. Tanto para pacientes com FHE-T2 como para aqueles sem FHE-T2 houve diferença

estatisticamente significante do grupo controle. Além disso, pacientes com FHE-T2 apresentam maiores valores que aqueles sem FHE-T2. No caso de Co/Cr, os dois grupos de NF1 com e sem FHE-T2 diferiram estatisticamente do controle. Porém, neste caso, o FHE-T2 não determinou aumento nos valores de Co/Cr como notado com Mi/Cr. Para a relação Naa/Cr, verificou-se que os grupos não diferem estatisticamente ($P=0,256$). (Tabela 3)

Discussão

A natureza exata dos FHE-T2 ainda não está clara, devido à escassez de estudos anatomopatológicos em crianças com NF1.(6) O emprego de novas técnicas de RM pode representar uma oportunidade para o entendimento deste padrão de acometimento do encéfalo nesta doença. Contudo, ainda não está definido na literatura atual o papel da ERM na avaliação dos FHE-T2 em NF1.

Os FHE-T2 tendem a aparecer após os três anos de idade e raramente são vistos após os 20 anos.(15,16) Em nosso estudo, essas lesões foram diagnosticadas em 43% dos pacientes com NF1, com idade entre dois a 24 anos, se aproximando dos dados previamente publicados, que apontavam uma incidência estimada em 50 a 80% para esta faixa etária.(17,18,19)

DiPaolo *et al.*(6) baseou-se em exames histopatológicos de necropsia de três pacientes, e relatou que os FHE-T2 são secundários à alteração vacuolar e espongíótica na substância branca ocasionada por edema intramielínico, sem dano axonal. Apesar da escassez de estudos anatomopatológicos sobre as bases dos FHE-T2 (6), modernas técnicas de RM já permitiram a

demonstração *in vivo* de anormalidades microestruturais, mesmo na ausência de alteração às sequências convencionais de RM, permitindo especular sobre a presença de anormalidades microestruturais no encéfalo em pacientes com NF1 resultante de mutação genética em regiões susceptíveis (cerebelo, tronco encefálico, tálamo e núcleos da base).(20,21) Estudos longitudinais têm demonstrado o desaparecimento dos FHE-T2 com o avanço da idade, confirmando o padrão transitório desta anormalidade. (15,16)

A análise por ERM no presente estudo demonstrou aumento da relação dos metabólicos Co/Cr e Mi/Cr na região palidal, independente da ocorrência de FHE-T2, no grupo de indivíduos com NF1. Demonstramos ainda diferenças entre os subgrupos NF1 (com e sem FHE-T2) especificamente para a relação Mi/Cr.

Utilizando metodologia semelhante, Alkan *et al.*(20) também demonstraram aumento nas relações Co/Cr e Mi/Cr na substância branca aparentemente normal das regiões frontal e parietal posterior em pacientes com ou sem FHE-T2, sugerindo que o dano microestrutural possa ser ainda mais extenso, sendo os FHE-T2 apenas parte do espectro de manifestações encefálicas da NF1.

Jones *et al.*(22) analisaram seis pacientes assintomáticos portadores de NF1 e encontraram aumento da relação Co/Cr e redução de Naa nas regiões de núcleos da base e cerebelo de indivíduos com FHE-T2, e em áreas correspondes de parênquima cerebral aparentemente normal na RM de um paciente que apresentava FHE-T2 em exame de RM prévio. Em estudo de Imamura *et al.* (14), encontraram diferenças significativas entre regiões

encefálicas normais e com FHE-T2 em uma única criança estudada, com redução das relações de Naa/Cr e Co/Cr nos globos pálidos na presença de FHE-T2. Os autores documentaram o caráter transitório das alterações metabólicas demonstrando a normalização dos valores dos metabólicos com o desaparecimento progressivo das lesões.

Wilkinson *et al.* (23) por meio de análise semi-quantitativa estudaram vinte paciente com idade inferior à 16 anos com NF1 e observaram aumento de Co e Mi em tumores/lesões atípicas comparados a lesões típicas de NF1 e, também em relação ao controle. Foi evidenciado também diminuição dos valores de Naa nos pacientes portadores de NF1 com FHE-T2 em comparação com os controles, fato esse que pode ser explicado pela concorrência de lesões neoplásicas com o grupo NF1. Wang *et. al* avaliaram nove pacientes com NF1, cinco deles com FHE-T2 na região talâmica que demonstravam um padrão de alteração dos metabolitos relacionados a idade dos pacientes, com aumento de Co e relativa preservação de Naa em pacientes mais jovens (menos de 10 anos de idade), e redução de Naa e Co normal em pacientes mais velhos (24).

O Naa tem sido interpretado como marcador de viabilidade neuronal e pode estar diminuído em lesões ou doenças que reduzem ou substituem a população neuronal (processos encefaloclásticos ou neoplasias).(23) Nosso estudo não demonstrou diferença da relação Naa/Cr nos diferentes grupos. Sugerimos que a presença de variabilidade individual do dano microestrutural e a estabilidade dos níveis de Naa em nossa casuística possa refletir maior preservação da função neuronal. Acreditamos que o

comprometimento do Naa seja menos exacerbado no contexto da NF1, resultando em variações menos expressivas na ERM e, em última análise, na ausência de correlação clínica das lesões.(11)

Para um melhor conhecimento das alterações metabólicas no parênquima cerebral em portadores de NF1, grandes series devem ser avaliadas por ERM. Os resultados apresentados contribuem para o entendimento das bases dos FHE-T2 e do comprometimento encefálico na NF1. A realização de estudos futuros com maior correlação clínica e anatomopatológica poderá consolidar as observações metabólicas e a estimativa de alterações microestruturais do encéfalo nesta doença.

Conclusão

A ERM permitiu a caracterização de anormalidades metabólicas, mesmo na ausência de lesões estruturais demonstráveis pelas sequências convencionais de RM em uma série de pacientes com NF1.

Sugerimos que as relações dos metabólitos Co/Cr e Mi/Cr sejam os parâmetros metabólitos mais úteis para o entendimento do comprometimento palidal não-neoplásico em NF1. O menor acometimento dos valores de Naa nesta série pode refletir a estabilidade neuronal funcional da região e a ausência de manifestações clínicas dos FHE-T2.

Referências Bibliográficas

1. Jett K, Friedman JM. Clinical and genetic aspects of neurofibromatosis 1. *Genet Med.* 2010;12:1-11.
2. Williams VC, Lucas J, Babcock MA, Gutmann DH, Korf B, Maria BL. Neurofibromatosis Type 1 Revisited. *Pediatrics* 2009;123:124-33.
3. Mentzel HJ, Seidel J, Fitzek C, Eichhorn A, Vogt s, Reichenbach JR, et al. Pediatric brain MRI in neurofibromatosis type I. *Eur Radiol* 2005;15:814-22.
4. Brown EW, Riccardi VM, Mawad M, Handel S, Goldman A, Bryan RN. MR imaging of optic pathways in patients with neurofibromatosis. *AJNR Am J Neuroradiol.*1987;8:1031-5.
5. Aoki S, Barkovich J, Nishimura K, Kjos BO, Machida T, Cogen P, et al. Neurofibromatosis types 1 and 2: Cranial MR findings. *Radiology* 1989;172:527- 34.
6. DiPaolo DP, Zimmerman RA, Rorke LB, Zackai EH, Bilaniuk LT, Yachnis AT. Neurofibromatosis type 1: Pathologic substrate of high signal intensity foci in the brain. *Radiology* 1995;195:721-4.
7. Rosenbaum T, Engelbrecht V, Krolls W, Van Dorsten FA, Berlage MH, Lenard GH. MRI abnormalities in neurofibromatosis type 1 (NF1): a study of men and mice. *Brain Dev* 1999;21:268-73.
8. Tognini G, Ferrozzi F, Garlaschi G, Piazza P, Patti A, Viridis R, et al. Brain apparent diffusion coefficient evaluation in pediatric patients with neurofibromatosis type 1. *J Comput Assist Tomogr* 2005;29:298-304.
9. Hyman SL, Gill DS, Shores EA, Steinberg A, Joy P, Gibikote SV, et al.

- Natural history of cognitive deficits and their relationship to MRI T2 - hiperintensities in NF1. *Neurology* 2003;60:1139-45.
10. Mukonoweshuro W, Griffiths PD, Blaser S. Neurofibromatosis type 1: the role of neuroradiology. *Neuropediatrics* 1999;30:111-9.
 11. Porto L, Hattingen E, Pilatus U., Kieslich M., Bing Y., Schwabe D., Zanella F. E., Lanfermann H. Proton magnetic resonance spectroscopy in childhood brainstem lesions. *Childs Nerv Syst* 2007; 23:305–314.
 12. Barkovich AJ, Kjos BO, Jackson DE Jr, Norman D. Normal maturation of the neonatal and infant brain: MR imaging at 1.5 T. *Radiology* 1988;166:173-80.
 13. Ballesteros MC, Hansen PE, Soila K. MR imaging of the developing human brain. Part 2. Postnatal development. *Radiographics* 1993;13:611-22.
 14. Imamura A, Matsuo N, Okuda M, Morita H, Iwata M, Yamazaki Y, et al. Serial MR imaging and 1H-MR spectroscopy of unidentified bright objects in a case of neurofibromatosis type 1. *Brain & Development* 2005;27:595-7.
 15. Itoh T, Magnaldi S, White RM, Denckla MB, Hofman K, Naidu S, et al. Neurofibromatosis type 1; the evolution of deep gray and white matter MR abnormalities. *AJNR* 1994;15:1513-9.
 16. Kraut MA, Gerring JP, Cooper KL, Thompson RE, Denckla MB, Kaufmann WE. Longitudinal evolution of unidentified bright objects in children with neurofibromatosis-1. *Am J Med Gen A* 2004;129:113-9.
 17. DeBella K, Poskitt K, Szudek J, Triedman J. Use of "unidentified bright objects" on MRI for diagnosis of neurofibromatosis 1 in children. *Neurology* 2000;54:1646-51.

18. DeBella K, Szudek J, Friedman JM. Use of the National Institutes of Health criteria for diagnosis of neurofibromatosis 1 in children. *Pediatrics* 2000;105:608-14.
19. Lopes Ferraz Filho JR, Munis MP, Soares Souza A, Sanches RA, Goloni-Bertollo EM, Pavarino-Bertelli EC. Unidentified bright objects on brain MRI in children as a diagnostic criterion for neurofibromatosis type 1. *Pediatr Radiol.* 2008;38:305-10.
20. Alkan A, Sarac K, Kutlu R, Yakinci C, Sigirci A, Aslan M. ProtonMR spectroscopy features of normal appearing white matter in neurofibromatosis type Magn Reson Imaging 2003;21:1049-53.
21. Van Engelen SJ, Krab LC, Moll HA et al. Quantitative differentiation between healthy and disordered brain matter in patients with neurofibromatosis type I using diffusion tensor imaging. *AJNR* 2008;29:816-22.
22. Jones AP, Gunawardena WJ, Coutinho CM. 1H MR Spectroscopy evidence for the varied nature of asymptomatic focal brain lesions in neurofibromatosis type 1. *Neuroradiology* 2001;43:62-7.
23. Wilkinson ID, Griffiths PD, Wales JKH. Proton magnetic resonance spectroscopy of brain lesions in children with neurofibromatosis type 1. *Magnetic Resonance Imaging* 2001;19:1081-89.
24. Wang PY, Kaufmann WE, Koth CW et al. Thalamic involvement in neurofibromatosis type 1: evaluation with proton magnetic resonance spectroscopic imaging. *Ann Neurol* 2000;47:477-484.

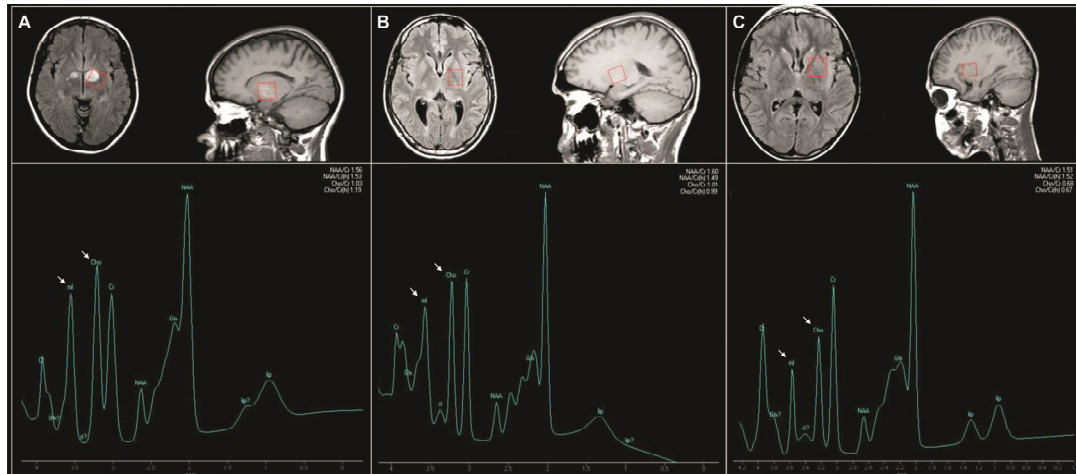


Figura 1. (A) Paciente com NF1 apresentando FHE-T2 na região palidal e ERM que evidenciou aumento da relação Co/Cr e Mi/Cr (setas). (B) Paciente com NF1 sem lesão encefálica na imagem de RM convencional e com ERM que evidenciou discreto aumento de Co e Mi (setas). (C) Paciente controle, não portador NF1, com RM encefálica e ERM sem alterações.

Tabela 1. Percentuais relativos ao lado da lesão em que foi realizada a espectroscopia em pacientes do grupo NF1 com FHE-T2.

Lado da lesão (espectroscopia)	NF1/com FHE-T2	
	Lesão Bilateral	Lesão Unilateral
Direito	02 (20%)	02 (25%)
Esquerdo	08 (80%)	06 (75%)
Total (18)	10	08

Tabela 2. Análise univariada relativa à comparação entre os grupos controle e NF1.

Variável	Grupo	n	$\bar{x} \pm s$	Mediana	Extremos	cv	IC(95%)	Valor P (teste t Student)
Mi/Cr	Controle	25	0,43±0,09	0,41	0,26 – 0,65	21,55	(-0,26;-0,06)	0,001*
	NF1	42	0,63±0,28	0,56	0,12 – 1,31	45,60		
Co/Cr	Controle	25	0,71±0,10	0,69	0,50 – 0,87	13,94	(-0,18;-0,05)	0,001*
	NF1	42	0,86±0,24	0,82	0,37 – 1,64	28,31		
Naa/Cr	Controle	25	1,52±0,22	1,54	1,13 – 1,93	14,18	(-0,04;0,21)	0,168
	NF1	42	1,44±0,32	1,51	0,64 – 2,26	22,34		

*Significant p-value for a level of 0.05

Tabela 3. Análise comparativa não paramétrica entre os três grupos NF1/com FHE-T2, NF1/sem FHE-T2 e controle.

Variável	NF1/com FHE-T2		NF1 /sem FHE-T2		Controle		Valor P (teste de Kruskal-Wallis)
	n	Mediana	n	Mediana	n	Mediana	
Mi/Cr	18	0,63 ^a	24	0,49 ^b	25	0,41 ^c	0,001*
Co/Cr	18	0,80 ^b	24	0,82 ^b	25	0,69 ^a	0,008*
Naa/Cr	18	1,41 ^a	24	1,52 ^a	25	1,54 ^a	0,256

*Valor -p significante de 0.05

A,b,c - letras distintas assinaladas em superíndice sinalizam diferença estatisticamente significante em relação ao grupo controle pelo teste *post hoc* de Dunnett.

3. Conclusões

Conclusões

- A técnica de *DTI* confirma que os FHE-T2 estejam relacionados às alterações da microestrutura do tecido cerebral em pacientes com NF1 e permite a caracterização de anormalidades teciduais que não são demonstradas em seqüências convencionais de RM.
- A RM possibilita o adequado monitoramento da distribuição no tempo e espaço dos FHE-T2 em pacientes com NF1. *DTI* evidencia alterações no valor de *FA* mesmo com o desaparecimento ou redução dos FHE-T2, confirmando a hipótese de alterações microestruturais em regiões cerebrais específicas em pacientes com NF1.
- A ERM permite a caracterização de anormalidades teciduais não demonstráveis nas seqüências convencionais de RM em pacientes com NF1 por meio da análise dos metabólitos Co e Mi.

4. Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

1. Jett K, Friedman JM. Clinical and genetic aspects of neurofibromatosis 1. *Genet Med.* 2010;12:1-11.
2. Williams VC, Lucas J, Babcock MA, Gutmann DH, Korf B, Maria BL. Neurofibromatosis Type 1 Revisited. *Pediatrics* 2009;123:124-33.
3. Mentzel HJ, Seidel J, Fitzek C, Eichhorn A, Vogt s, Reichenbach JR, et al. Pediatric brain MRI in neurofibromatosis type I. *Eur Radiol* 2005;15:814-22.
4. Valero MC, Martín Y, Hernández-Imaz E, Marina Hernández A, Meleán G, Valero AM, Javier Rodríguez-Álvarez F, Tellería D, Hernández-Chico C. A highly sensitive genetic protocol to detect NF1 mutations. *J Mol Diagn.* 2011; 13:113-22.
5. Declue JE, Cohen BD, Lowy DR. Identification and characterization of the neurofibromatosis type 1 protein product. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9914-8.
6. Gutmann DH, Wood DL, Collins FS. Identification of the neurofibromatosis type 1 gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9658-62.
7. Viskochil D. Genetics of neurofibromatosis 1 and the NF1 gene. *J Child Neurol* 2002;17:562-70.
8. Wallace MR, Marchuk DA, Andersen LB, Letcher R, Odeh HM, Saulino AM et al. Type 1 Neurofibromatosis Gene: Identification of a Large Transcript Disrupted in Three NF1 Patients. *Science* 1990;249:181-6.

9. Suzuki Y, Suzuki H, Kayama T, Yoshimoto T, Shibahara S. Brain tumors predominantly express the neurofibromatosis type 1 gene transcripts containing the 63 base insert in the region coding for GTPase activating protein-related domain. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;181:955-61.
10. Daston MM, Scrabble H, Nordlund M, Sturbaum AK, Nissen LM, Ratner N. The protein product of the neurofibromatosis type 1 gene is expressed at highest abundance in neurons, Schwann cells, and oligodendrocytes. *Neuron* 1992;8:415-28.
11. Nordlund M, Gu X, Shipley MT, Ratner N. Neurofibromin is enriched in the endoplasmic reticulum of CNS neurons. *J Neurosci* 1993;13:1588-600.
12. Martin GA, Viskochil D, Bollag G, McCabe PC, Crosier WJ, Haubruck H, et al. The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21. *Cell* 1990;63:843-9.
13. Trovó-Marqui AB, Tajara EH. Neurofibromin: a general outlook. *Clin Genet*. 2006;70:1-13.
14. Arun D, Gutmann DH. Recent advances in neurofibromatosis type 1. *Curr Opin Neurol* 2004;17:101-5.
15. Boguski MS, McCormick F. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 1993;366:643-54.
16. Trovó AB, Goloni-Bertollo EM, Tajara EH. Neurofibromatose: uma revisão. *HB Cient* 2002;9:98-110.
17. Weiss B, Bollag G, Shannon K. Hiperactive Ras as a therapeutic target in neurofibromatosis type 1. *Am J Med Genet* 1999;89:14-22

18. Sherman LS, Atit R, Rosenbaum T, Cox AD, Ratner N. Single cell Ras-GTP analysis reveals altered Ras activity in a subpopulation of neurofibroma Schwann cells but not fibroblasts. *J Biol Chem* 2000;275:30740-5.
19. Dasgupta B, Gutmann DH. Neurofibromatosis 1: closing the GAP between mice and men. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13:20-7.
20. Gutmann DH, Collins FS. Recent progress toward understanding the molecular biology of Von Recklinghausen neurofibromatosis. *Ann Neurol* 1992;31:555-61.
21. Patrakitkomjorn S, Kobayashi D, Morikawa T, Wilson MM, Tsubota N, Irie A, Ozawa T, Aoki M, Arimura N, Kaibuchi K, Saya H, Araki N. Neurofibromatosis type 1 (NF1) tumor suppressor, neurofibromin, regulates the neuronal differentiation of PC12 cells via its associating protein, CRMP-2. *J Biol Chem*. 2008;283:9399-413.
22. Rasmussen SA, Friedman JM. NF1 Gene and neurofibromatosis 1. *Am J Epidemiol* 2000;151:33-40.
23. Lau N, Feldkamp LM, Roncari L, Loehr Ah, Shannon P, Guman DH, et al. Loss of neurofibromin is associated with activation of RAS/MAPK and PI3-K/AKT signaling in a neurofibromatosis 1 astrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000;59:759-67.
24. NIH Consensus development conference: Neurofibromatosis. *Arch Neurol* 1988;45:575-8.
25. Mulvihill JJ, Parry DM, Sherman JL, Pikus A, Kaiser-Kupfer MI, Eldridge R. NIH conference neurofibromatosis 1 (Recklinghausen disease) and

neurofibromatosis 2 (bilateral acoustic neurofibromatosis): an update. *Ann Intern Med* 1990;113:39-52.

26. DeBella K, Szudek J, Friedman JM. Use of the National Institutes of Health criteria for diagnosis of neurofibromatosis 1 in children. *Pediatrics* 2000;105:608-14.

27. Lynch TM, Gutmann DH. Neurofibromatosis 1. *Neurol Clin* 2002;20:841-65.

28. Palmer C, Szudek J, Joe H, Riccardi VM, Friedman JM. Analysis of neurofibromatosis 1 (NF1) lesions by body segment. *Am J Med Genet A* 2004;125:157-61.

29. Gutmann DH, Aylsworth A, Carey JC, Korf B, Marks J, Pyeritz RE, et al. The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. *JAMA* 1997;278:51-7.

30. Ruggieri M, Huson SM. The Neurofibromatosis: an overview. *Ital J Neurol Sci* 1999;20:89-108.

31. Gutmann DH, Rasmussen SA, Wolkenstein P, MacCollin MM, Guha A, Inskip PD, et al. Gliomas presenting after age 10 in individuals with neurofibromatosis type 1 (NF1). *Neurology* 2002;59:759-61.

32. Huson SM. Neurofibromatosis 1: a clinical and genetic overview. In: Huson SM, Hughes RAC, editores. *The neurofibromatoses: a pathogenetic and clinical overview*. London: Chapman and Hall Medical; 1994. p. 160-203.

33. Farris SR, Grove AS. Orbital and eyelid manifestations of neurofibromatosis: a clinical study and literature review. *Ophthal Plast Reconstr Surg* 1996;12:245-59.

34. Ruggieri M, Huson SM. The clinical and diagnostic implications of mosaicism in the neurofibromatosis. *Neurology* 2001;56:1433-43.
35. Lin V, Daniel S, Forte V. Is a plexiform neurofibroma pathognomonic of neurofibromatosis type I? *Laryngoscope* 2004;114:1410-4.
36. Khong PL, Goh WHS, Wong VCN, Fung CW. MR imaging of spinal tumors in children with Neurofibromatosis I. *AJR Am J Roentgenol* 2003;180:413-7.
37. Ruggieri M, Huson SM. What s new in neurofibromatosis. *Curr Pediatr* 1997;7:167-76.
38. Korf BR, Schneider G, Poussaint TY. Structural anomalies revealed by neuroimaging studies in the brain of patients with neurofibromatosis type 1 and large deletions. *Genet Med* 1999;1:136-40.
39. Listernick R, Louis DN, Packer RJ, Gutmann DH. Optic pathway gliomas in children with neurofibromatosis 1: consensus statement from the NF1 Optic Pathway Glioma Task Force. *Ann Neurol* 1997;41:143-9.
40. Ruggieri M, Packer RJ. Why do benign astrocytomas become malignant in NF1. *Neurology* 2001;56:827-9.
41. Listernick R, Charrow J, Gutmann DH. Intracranial gliomas in neurofibromatosis type 1. *Am J Med Genet* 1999;89:38-44.
42. Mukonoweshuro W, Griffiths PD, Blaser S. Neurofibromatosis type 1: the role of neuroradiology. *Neuropediatrics* 1999;30:111-9.
43. Koeller KK, Rushing EF. From the Archives of the AFIP: pilocytic astrocytoma: radiologic-pathologic correlation. *RadioGraphics* 2004;24:1693-708.

44. Thiagalingam S, Flaherty M, Billson F, North K. Neurofibromatosis type 1 and Optic Pathway Gliomas. *Ophthalmology* 2004;111:568-77.
45. Ozturk M, Ozyazgan I, Mavili E, Orhan S. Spontaneous regression of basal ganglia lesions in a case of neurofibromatosis type 1 (case report). *Tani Girisim Radyol* 2003;9:439-42.
46. Aoki S, Barkovich J, Nishimura K, Kjos BO, Machida T, Cogen P, et al. Neurofibromatosis types 1 and 2: Cranial MR findings. *Radiology* 1989;172:527- 34.
47. DiPaolo DP, Zimmerman RA, Rorke LB, Zackai EH, Bilaniuk LT, Yachnis AT. Neurofibromatosis type 1: Pathologic substrate of high signal intensity foci in the brain. *Radiology* 1995;195:721-4.
48. DeBella K, Poskitt K, Szudek J, Triedman J. Use of "unidentified bright objects" on MRI for diagnosis of neurofibromatosis 1 in children. *Neurology* 2000;54:1646-51.
49. Kraut MA, Gerring JP, Cooper KL, Thompson RE, Denckla MB, Kaufmann WE. Longitudinal evolution of unidentified bright objects in children with neurofibromatosis-1. *Am J Med Gen A* 2004;129:113-9.
50. Rosenbaum T, Engelbrecht V, Krolls W, Van Dorsten FA, Berlage MH, Lenard GH. MRI abnormalities in neurofibromatosis type 1 (NF1): a study of men and mice. *Brain Dev* 1999;21:268-73.
51. Hyman SL, Gill DS, Shores EA, Steinberg A, Joy P, Gibikote SV, et al. Natural history of cognitive deficits and their relationship to MRI T2 - hiperintensities in NF1. *Neurology* 2003;60:1139-45.

52. Kim BS, Illes J, Kaplan RT, Reiss A, Atlas SW. Incidental findings on pediatric MR images of the brain. *AJNR Am J Neuroradiol* 2002;23:1674-7.
53. Mirowitz SA, Sartor K, Gado M. High-intensity basal ganglia lesions on T1-weighted MR images in neurofibromatosis. *AJNR Am J Neuroradiol* 1989;10:1159-63.
54. Terada H, Barkovich AJ, Edwards MS, Ciricillo SM. Evolution of high-intensity basal ganglia lesions on T1-weighted MR in neurofibromatosis type 1. *AJNR Am J Neuroradiol* 1996;17:755-60.
55. Griffiths PD, Blaser S, Mukonoweshuro W, Armstrong D, Milo-Mason G, Cheung S. Neurofibromatosis bright objects in children with neurofibromatosis type 1: a proliferative potential? *Pediatrics* 1999;104:49.
56. Lopes Ferraz Filho JR, Munis MP, Soares Souza A, Sanches RA, Goloni-Bertollo EM, Pavarino-Bertelli EC. Unidentified bright objects on brain MRI in children as a diagnostic criterion for neurofibromatosis type 1. *Pediatr Radiol*. 2008;38:305-10
57. Tognini G, Ferrozzi F, Garlaschi G, Piazza P, Patti A, Viridis R, et al. Brain apparent diffusion coefficient evaluation in pediatric patients with neurofibromatosis type 1. *J Comput Assist Tomogr* 2005;29:298-304.
58. Mukonoweshuro W, Griffiths PD, Blaser S. Neurofibromatosis type 1: the role of neuroradiology. *Neuropediatrics* 1999;30:111-9.
59. Gurless RG. Use of "unidentified bright objects" on MRI for diagnosis of neurofibromatosis 1 in children. *Neurology* 2000;55:1067-8.

60. Itoh T, Magnaldi S, White RM, Denckla MB, Hofman K, Naidu S, et al. Neurofibromatosis type 1; the evolution of deep gray and white matter MR abnormalities. *AJNR Am J Neuroradiol* 1994;15:1513-9.
61. Mamata H, Mamata Y, Westin CF, Shenton ME, Kikinis R, Jolesz FA, Maier SE. High-resolution line scan diffusion tensor MR imaging of white matter fiber tract anatomy. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2002;23:67-75.
62. Zamboni SL, Loenneker T, Boltshauser E, Martin E, Il'yasov KA. Contribution of diffusion tensor MR imaging in detecting cerebral microstructural changes in adults with neurofibromatosis type 1. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2007;28:773-6.
63. Imamura A, Matsuo N, Okuda M, Morita H, Iwata M, Yamazaki Y, et al. Serial MR imaging and ¹H-MR spectroscopy of unidentified bright objects in a case of neurofibromatosis type 1. *Brain & Development* 2005;27:595-7.
64. Alkan A, Sarac K, Kutlu R, Yakinci C, Sigirci A, Aslan M. ProtonMR spectroscopy features of normal appearing white matter in neurofibromatosis type Magn Reson Imaging 2003;21:1049–53.
65. Jones AP, Gunawardena WJ, Coutinho CM. ¹H MR Spectroscopy evidence for the varied nature of asymptomatic focal brain lesions in neurofibromatosis type 1. *Neuroradiology* 2001;43:62-7.
66. Wilkinson ID, Griffiths PD, Wales JKH. Proton magnetic resonance spectroscopy of brain lesions in children with neurofibromatosis type 1. *Magnetic Resonance Imaging* 2001;19:1081-89.

67. Porto L, Hattingen E, Pilatus U., Kieslich M., Bing Y., Schwabe D., Zanella F. E., Lanfermann H. Proton magnetic resonance spectroscopy in childhood brainstem lesions. *Childs Nerv Syst* 2007;23:305–314.
68. Jellison BJ, Field AS, Medow J, Lazar M, Salamat MS, Alexander AL. Diffusion tensor imaging of cerebral white matter: a pictorial review of physics, fiber tract anatomy, and tumor imaging patterns. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2004;25:356-69.
69. Tamura H, Takahashi S, Kurihara N, Yamada S, Hatazawa J, Okudera T. Practical visualization of internal structure of white matter for image interpretation: staining a spin-echo T2-weighted image with three echo-planar diffusion-weighted images. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2003;24:401-9.
70. Provenzale JM, Liang L, DeLong D, White LE. Diffusion tensor imaging assessment of brain white matter maturation during the first postnatal year. *AJR Am J Roentgenol.* 2007;189:476-86.
71. Wei CW, Guo G, Mikulis DJ. Tumor effects on cerebral white matter as characterized by diffusion tensor tractography. *Can J Neurol Sci.* 2007;34:62-8.
72. Van Engelen SJ, Krab LC, Moll HA et al. Quantitative differentiation between healthy and disordered brain matter in patients with neurofibromatosis type I using diffusion tensor imaging. *AJNR* 2008;29:816-22.

5. Anexos

Anexos

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
 FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
 AUTARQUIA ESTADUAL – LEI No. 8899, de 27/09/94
 (Reconhecida pelo Decreto Federal no. 74.179, de 14/06/74)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
 (Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96)

Nome do(a) participante: _____
 Representante legal: _____
 RG do prontuário médico: _____
 Nome do(a) pesquisador(a) responsável: _____

Declaro que consinto em participar como voluntário do projeto de pesquisa "Ressonância magnética com imagem de tensor de difusão no estudo dos focos de hipersinal no encéfalo em crianças com neurofibromatose tipo 1" sob responsabilidade do pesquisador, Dr. José Roberto Lopes Ferraz Filho (CRM 95426). Declaro que fui satisfatoriamente esclarecido que:

- A) será realizado exame de imagem por Ressonância Magnética do encéfalo (imagens da cabeça). Para isso, o paciente deve deitar-se no aparelho de exame e permanecer imóvel durante o tempo do exame. Se necessário, serão utilizados métodos para que o paciente não se movimente durante o exame (sedação específica, realizada pelo anestesista na rotina deste serviço de radiologia para que o paciente durma);
- B) os riscos referentes à Ressonância Magnética são relacionados as contra indicações para realização do próprio exame, por exemplo a presença de algum tipo de metal no paciente como próteses cardíacas, marca-passo cardíaco, próteses metálicas e aparelho de audição. No caso de necessidade de sedação os riscos serão relacionados ao procedimento anestésico de rotina.
- C) que posso consultar o pesquisador responsável em qualquer época, pessoalmente ou pelo telefone (0xx17) 3201-5000, ramal 1501 ou 1502, para esclarecimento de qualquer dúvida;
- D) que estou livre para, a qualquer momento, deixar de participar da pesquisa e que não preciso apresentar justificativas para isso;
- E) que todas as informações por mim fornecidas e os resultados obtidos serão mantidos em sigilo e que estes últimos só serão utilizados para divulgação em reuniões e revistas científicas;
- F) que serei informado de todos os resultados obtidos, independentemente do fato destes poderem mudar meu consentimento em participar da pesquisa;
- G) que este estudo é importante porque pode trazer benefícios no diagnóstico clínico da Neurofibromatose.

Assim, consinto em participar do projeto de pesquisa em questão.


São José do Rio Preto, _____ de _____ de 20_____.

Telefone do comitê de ética e pesquisa (CEP): 17- 32015813.

6. Apêndices

Apêndices

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
Autarquia Estadual - Lei n.º 8899 de 27/09/94
(Reconhecida pelo Decreto Federal n.º 74.179 de 14/06/74)

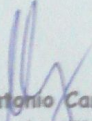
Parecer n.º 074/2008

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Protocolo n.º 1447/2008 sob a responsabilidade de José Roberto Lopes Ferraz Filho com o título "Ressonância magnética com imagem de Tensor de Difusão no estudo dos focos de Hipersinal no Encéfalo na ponderação T2 em crianças com Neurofibromatose tipo I" está de acordo com a resolução CNS 196/96 e foi aprovado por esse CEP.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.

São José do Rio Preto, 08 de abril de 2008.


Prof. Dr. Antonio Carlos Pires
Coordenador do CEP/FAMERP