

DOENÇA DE ALZHEIMER E ESPECTROSCOPIA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DO HIPOCAMPO

Elias Engelhardt¹, Denise M. Moreira², Jerson Laks³, Valeska M. Marinho⁴, Marcia Rozenthal⁵, Amarino C. Oliveira Jr⁶

RESUMO - Objetivos: Obtenção de dados do espectro de metabólitos por ressonância magnética da formação hipocampal no idoso normal e com doença de Alzheimer (DA). **Método:** Os indivíduos foram pareados por idade, sendo 20 na amostra normal, CDR=0 e 40 com DA 3 CDR=1 e 2. Utilizou-se aparelho Signa Horizon LX-GE, 1.5T, ¹H-ERM com aplicativo automatizado PROBE/SV, VOI: hc (direito e esquerdo); voxel único (2x2x2cm); TR 1500ms/TE 50ms; PRESS; metabólitos: N-acetilaspártato (Naa), colina (Cho), creatina (Cr), mio-inositol (ml). **Resultados:** Os presentes dados se referem aos quocientes de Naa, Cho e ml, com Cr tomada como referência e relação ml/Naa. O estudo mostrou o Naa reduzido, o ml e a relação ml/Naa aumentados e os resultados em relação à Cho foram variados. Os resultados da amostra global dos pacientes com DA em comparação à média \pm dp da amostra normal foram significativos para Naa, ml e ml/Naa ($p < 0,01$). A precisão, tomando os valores de modo individual das duas amostras, mostrou sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo satisfatórios. **Conclusão:** Os presentes resultados podem ser usados como ferramenta útil para detectar alterações patológicas no hipocampo de pacientes com DA, permitindo diagnóstico de maior precisão e mais precoce da doença.

PALAVRAS-CHAVE: ressonância magnética, espectroscopia de prótons, hipocampo, doença de Alzheimer.

Alzheimer's disease and magnetic resonance spectroscopy of the hippocampus

ABSTRACT - Objective: Acquisition of data of magnetic resonance metabolite spectrum of the hippocampal formation (hippocampus-hc) in the elderly, normal and with Alzheimer's disease (AD). **Method:** Subjects matched for age: a. normal sample (n=20), CDR=0, and b. AD sample (n=40), CDR 1 and 2. Technique: Signa Horizon LX-GE, 1.5T, ¹H-MRS with automated software PROBE/SV, VOI: hc (right and left); single voxel (2x2x2cm); TR 1500ms/TE 50ms; PRESS; metabolites: N-acetylaspártate (Naa), choline (Cho), creatine (Cr), myo-inositol (ml). **Results:** The present data relate to the ratios of Naa, Cho and ml, with Cr taken as reference, and the ml/Naa ratio. The study showed reduction of Naa, increase of ml and of the ml/Naa ratio, and not consistent results for Cho. The results of the whole sample of AD patients compared to the pooled normal mean \pm sd were significant for Naa, ml and ml/Naa ($p < 0.01$). Accuracy in relation to the individual values of both samples showed satisfactory levels of sensitivity, specificity and positive predictive value. **Conclusion:** The present results can be used as a helpful tool to detect pathologic changes of the hippocampus in AD, and allowing greater accuracy and an earlier diagnosis of this disease.

KEY WORDS: magnetic resonance, proton spectroscopy, hippocampus, Alzheimer's disease.

A doença de Alzheimer (DA) é a causa da demência mais prevalente tanto no grupo etário pré-senil quanto no senil, observando-se seu aumento gradual com o envelhecimento. As manifestações características compreendem comprometimento cognitivo, sintomas psicológicos e do comportamento, sinais neurológicos e declínio nas atividades de vida

diária, de um modo progressivo. O seu diagnóstico é baseado em história clínica sugestiva, utilização de critérios sistematizados (DSM-IV, NINCDS-ADRDA), exames laboratoriais e de neuroimagem, permitindo finalmente, em vida, o diagnóstico mais próximo do correto que é de "doença de Alzheimer provável" ¹.

Estudo realizado no Setor de Neurologia Cognitiva e do Comportamento do Instituto de Neurologia Deolindo Couto (INDC) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Centro de Atendimento para Pessoas com Doença de Alzheimer (CDA) do IPUB da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UFRJ) e Serviço de Radiologia do Hospital Pró Cardíaco, Rio de Janeiro RJ, Brasil; ¹Professor Titular da UFRJ, Coordenador do Setor de NCC do INDC/UFRJ; ²Professor Adjunto da UFRJ, responsável pelo Setor de Radiologia, INDC/UFRJ; ³Professor Adjunto da UERJ, Professor da Faculdade de Medicina da UNESA, Diretor Técnico do CDA, IPUB/UFRJ; ⁴Mestre em Psiquiatria, IPUB/UFRJ, médico do CDA, IPUB/UFRJ; ⁵Doutor em Psiquiatria, IPUB/UFRJ, Professor da Faculdade de Medicina da UNESA; ⁶Chefe do Setor de Radiologia, Hospital PróCardíaco e INCA.

Recebido 18 Junho 2001, recebido na forma final 30 Julho 2001. Aceito 3 Agosto 2001.

Dr. Elias Engelhardt - Av. N.S. Copacabana, 749/1101 - 22050-000 Rio de Janeiro RJ - Brasil.

Entre os recursos frequentemente utilizados para reforçar o diagnóstico da DA estão os exames de neuroimagem estrutural (por exemplo, volumetria do hipocampo) e os de neuroimagem funcional (por exemplo, espectroscopia por ressonância magnética/ERM).

A espectroscopia de prótons por ressonância magnética (^1H -ERM), no estudo de DA, foi introduzida por Shiino et al.², que relataram diminuição de N-acetilaspártato (Naa), considerado marcador de integridade neuronal, em pacientes com demência degenerativa primária. A partir dessa data, a ERM passou a ser frequentemente utilizada em termos de exame complementar para reforçar o diagnóstico. Miller et al.³ relataram o aumento também de outro metabolito, o mio-inositol (ml), pertencente à via metabólica dos inositídeos, além de marcador de neuroglia. O binômio diminuição de Naa-aumento de ml passou a ser considerado característico da DA. Variações da colina (Cho) também foram encontradas, porém de modo menos consistente, refletindo metabolismo de membrana de células gliais relacio-

nadas às áreas de degeneração neuronal. Finalmente deve ser mencionada a creatina (Cr), relacionada com atividade metabólica energética e que se mantém relativamente estável até fases muito adiantadas do processo degenerativo, servindo assim como referência interna para estabelecer relações (quocientes) com os outros metabolitos⁴⁻⁶. O índice ml/Naa foi proposto por Schonk et al.⁷, para dar maior sensibilidade aos resultados obtidos. Um número relativamente grande de estudos em pacientes com DA demonstrou redução de Naa, aumento de ml e da relação ml/Naa e eventualmente aumento da Cho em áreas corticais associativas posteriores (Tabela 1). Esses estudos foram realizados com ERM gráfico (ERMg) ou com ERM de imagem (ERMi)^{4,5,8}.

Estudos encontrados visando áreas límbicas são poucos (Tabela 1). Assim, Kantarci et al.⁹ examinaram a parte posterior do giro do cíngulo, com achados gerais semelhantes aos acima referidos, sugerindo ainda uma cronologia das variações, com aumento de ml em fases mais iniciais, diminuição de Naa e aumento de Cho em fases mais adiantadas da

Tabela 1. Principais estudos de ^1H -ERM: áreas estudadas, resultados obtidos, principais autores.

Áreas estudadas	Variação de metabolitos		Principais autores	
Associativas	redução	Naa	Shiino et al., 1993 ²	
	redução	Naa		
	aumento	ml	Miller et al., 1993 ³	
	redução	Naa		
	aumento	Cho	Meyerhoff et al., 1994 ¹⁷ Pfefferbaum et al., 1999 ²⁴	
	redução	Naa		
aumento	ml	Shonk et al., 1995 ⁷		
aumento	ml/Naa			
Límbicas	cíngulo	redução	Naa	Lazeyras et al., 1998 ²⁵
		aumento	ml	
		aumento	Cho	
	hipocampo	redução	Naa	Kantarci et al., 2000 ⁹
		aumento	ml	
		aumento	Cho	Block et al., 1995 ¹⁰
		redução	Naa	
		variado	Cho	Schuff et al., 1997 ¹¹ Jessen et al., 2000 ¹²
		redução	Naa	
		aumento	ml	Engelhardt et al., 2000 ¹⁴
aumento	Cho			
aumento	ml/Naa			

Naa, N-acetilaspártato; ml, mio-inositol; Cho, colina.

evolução. Até recentemente, apenas dois grupos relataram resultados de ERMi do hipocampo (formação hipocampal), o de Block e o de Schuff. O primeiro centrou o estudo na Cho, cujo ciclo inclui o metabolismo da acetilcolina¹⁰. O segundo estudou o Naa e Cho. Outro trabalho do grupo de Block foi com ERMg, mostrando resultados semelhantes aos de Shuff¹¹. Não foram obtidos, nos trabalhos citados, resultados do ml, já que o tempo de eco utilizado foi alto. Desse modo não foi considerado o ml, aumentado frequentemente na DA e apontado como importante no diagnóstico, assim como o índice ml/Naa^{3,6}. Os estudos de Jessen et al.¹² e os preliminares de Engelhardt et al.^{13,14} foram realizados com equipamento e aplicativo que permitem exames em situação clínica. Os dados obtidos em relação ao Naa, Cho e Cr nesses estudos apresentaram padrão geral semelhante aos relatados para áreas associativas (diminuição de Naa e variação de Cho). Os dados relacionados ao ml e conseqüentemente à relação ml/Naa, índices considerados importantes para o diagnóstico da DA, foram obtidos apenas por Engelhardt et al.^{13,14}, mostrando-se elevados em número significativo de pacientes.

Lembrando que o processo degenerativo na DA tem início em áreas límbicas da região temporal medial (formação hipocampal, região rinal) e se correlaciona com as manifestações clínicas iniciais (comprometimento de memória)^{15,16}, pode-se considerar que o exame dessa região deve mostrar alterações em fase mais precoce que as obtidas em áreas associativas. Grande número de estudos consideraram o hipocampo do ponto de vista estrutural, procurando reconhecer medidas indicativas de sua atrofia. A perda neuronal, no entanto, decorrente do processo degenerativo, é frequentemente acompanhada por gliose reativa que atenua a atrofia tissular. Assim, apenas os achados volumétricos podem subestimar a extensão de tal perda. Por outro lado, a espectroscopia, técnica sensível a variações de metabolitos, poderia se constituir em marcador mais específico

de perda neuronal em comparação à atrofia observada pela neuroimagem estrutural^{11,17,18}. A utilização de tal técnica, tendo como alvo o hipocampo, pode reforçar a precisão diagnóstica e permitir o seu estabelecimento mais precoce na DA.

MÉTODO

Sujeitos. Foram estudadas duas amostras: a) normal: n=20 (m=10/f=10); idade: 73,5±5,0 (66 a 86) anos; sem queixas cognitivas ou psiquiátricas; mini-exame do estado mental (MEEM): 28,6±1,0 (27 a 30); estágio clínico de dementia rating (CDR) = 0; b) DA provável (critérios da DSM-IV e da NINCDS-ADRDA): n=40 (m=18/f=22); idade: 75,7±5,9 (66 a 87) anos; MEEM:22,2±4,1 (11 a 28); escore isquêmico (Hachinski) <4 (0-3); estágio: CDR 1 e 2.

Técnicas. Foi utilizado aparelho Signa Horizon LX-GE, 1.5T, obtenção de espectro de prótons (¹H-ERM) com ajuda de aplicativo PROBE/SV^{19,20}; gráfico de metabolitos evidenciando N-acetilaspártato, colina, creatina, mio-inositol; região de interesse: hipocampus (direito e esquerdo); voxel único de 2x2x2cm (8 ml); tempo de repetição (TR) 1500 ms / tempo de eco (TE) 50 ms; PRESS.

Estatística. Foram realizados cálculos básicos de média, desvio-padrão, teste de significância, teste de precisão para os valores obtidos²¹.

Ética. O protocolo referente à amostra normal foi aprovado pela Comissão de Ética (CEP-IPUB/UFRJ); a amostra com DA foi constituída a partir de casos avaliados em situação clínica de rotina.

RESULTADOS

Os dados obtidos se referem aos valores da amostra com DA em comparação à normal, considerando-se as relações de Naa, Cho e ml com Cr tomado como referência interna, além da relação ml/Naa.

Os resultados obtidos são expressos de duas maneiras: globais e individuais.

a. globais - considerando que não foi encontrada diferença estatística significativa entre os valores dos hipocampus direito e esquerdo, assim como feminino e masculino, os resultados globais serão considerados aos dados reunidos da amostra inteira, normal em comparação à patológica (Tabela 2).

Tabela 2. Valores das relações de metabolitos obtidos a partir dos dados reunidos, em sujeitos normais e com DA provável (hipocampus direito e esquerdo, masculino e feminino).

	Naa/Cr	ml/Cr	Cho/Cr	Cho/Naa
Normal	1.46±0.14	0.51±0.12	0.95±0.14	0.36±0.09
DA prvel	1.33±0.18	0.60±0.12	0.94±0.12	0.47±0.09
Teste t	α=0.01	α=0.01	ns	α=0.01

prvel, provável; teste t de significância entre os normais e os patológicos (p<0.01).

Tabela 3. Teste de precisão dos valores dos metabolitos obtidos em uma amostra de pacientes com DA (n=40) em comparação a sujeitos normais (n=20).

Metblto	dp	s	e	vp+
Naa/Cr	-1	0.80	0.75	0.80
nN=20*	-1.5	0.60	0.95	0.96
nDA=40**	-2	0.35	0.95	0.93
ml/Cr	+1	0.42	0.82	0.82
nN=17*	+1.5	0.27	0.82	0.75
nDA=33**	+2	0.15	0.88	0.71
Cho/Cr	+1	0.17	0.70	0.53
nN=20*	+1.5	0.05	0.85	0.40
nDA=39**	+2	0.02	0.95	0.50
ml/Naa	+1	0.65	0.70	0.80
nN=17*	+1.5	0.50	0.82	0.84
nDA=32**	+2	0.31	0.90	0.83

Metblto, metabolitos (quocientes); dp, desvio padrão; s, sensibilidade; e, especificidade; vp+, valor preditivo positivo. *valores encontrados normais; **valores encontrados com DA.

b. individuais - foram calculadas a precisão dos valores obtidos (sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo), expressos na Tabela 3 e os percentuais para cada parâmetro referente a um desvio padrão (dp), mostrados na Tabela 4.

DISCUSSÃO

A prevalência crescente de pacientes com DA, as possibilidades terapêuticas existentes e as novas, que vêm surgindo, levam à necessidade de diagnóstico mais precoce e preciso da doença. A ¹H-ERM do cérebro pode ser considerada instrumento valioso de pes-

quisa e clínica por permitir conhecer a composição de metabolitos de amostra(s) de tecido nervoso normal ou patológico in vivo e de modo não-invasivo, permitindo uma compreensão dos mecanismos fisiológicos e fisiopatológicos em condições normais e na doença²².

A importância de focalizar o estudo no hipocampo decorre da sequência da progressão patológica da doença de Alzheimer. Assim a degeneração tem início em áreas límbicas da região medial do lobo temporal (córtex entorrinal e formação hipocampal), progredindo para as áreas associativas temporoparietais e frontais, as áreas primárias sendo acometidas apenas nos estágios mais avançados¹⁵. Desse modo, ao se visar o diagnóstico precoce, aspecto dos mais desejáveis para intervenções terapêuticas igualmente precoces, o foco do exame deve ser dirigido para a região hipocampal, inicialmente atingida pelo processo degenerativo. Considerando que poucos estudos com foco no hipocampo foram encontrados na literatura¹⁰⁻¹², possivelmente pelas dificuldades técnicas envolvidas no estudo dessa região, os dados apresentados no presente estudo poderão ser de valia para ajudar na detecção de alterações precoces na DA. Os dados comparativos entre os diversos estudos visando o hipocampo se encontram na Tabela 5.

O estudo de Block et al.¹⁰ mostrou que 7/12 (58%) pacientes apresentaram redução de Naa em comparação a um grupo controle. Encontraram ainda um aumento significativo de Cho, o que não foi verificado em novo estudo do grupo¹². O trabalho de Schuff et al.¹¹ mostrou que o Naa hipocampal permitiu classificar corretamente 80% dos pacientes

Tabela 4. Relação entre casos positivos e o número de casos e percentual encontrados para 1 dp para os diversos quocientes de metabolitos. Positividade (positiv) se refere ao número de casos positivos em pelo menos um parâmetro (Naa/Cr, ml/Cr, ml/Naa) por total.

	Naa/Cr	ml/Cr	Cho/Cr	ml/Naa	positiv	
dp	-1	+1	+1	-1	+1	
Normal						
x/n	5/20	3/17	6/20	4/20	5/17	9/20
%	25	17	30	20	39	55
DA						
y/n	32/40	14/33	7/39	5/39	21/32	36/40
%	80	42	18	12	65	90

x/n, normal; y/n, DA.

Tabela 5. Estudos do hipocampo - dados comparativos dos estudos realizados.

Autores	DA n/idade	Controle n/idade	ERM	Naa	ml	Cho	ml/Naa
Block et al., 1994	12/48-78	17/30-73	imagem	redzdo	-	aumtdo	-
Schuff et al., 1997	12/55-82	17/nd	imagem	redzdo	-	ns	-
Jessen et al., 2000	20/69.8±8.1	18/65.6±7.8	gr-vx17.5	redzdo	-	redzdo	-
Engelhardt et al., 2001	40/75.7±5.9	20/73.5±5.0	gr-vx08.0	redzdo	aumtdo	ns	aumtdo

gr-vx08.0, gráfico-voxel de 8.0ml; gr-vx17.5, gráfico-voxel de 17.5ml; nd, não descrito; redzdo, reduzido; aumtdo, aumentado; ns, não significativo.

com DA e 75% dos sujeitos controle. O presente estudo mostrou redução de Naa em 32/40 (80%) dos pacientes, aumento de ml em 14/33 (42%) e o índice ml/Naa encontrou-se aumentado em 21/32 (65%). A positividade em 1 ou mais desses 3 parâmetros chegou a 36/40 (90%) pacientes, índice que pode ser considerado elevado. Foi possível ainda calcular teste de precisão dos valores dos metabolitos, encontrando-se na Tabela 3 os índices de sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo para 1, 1.5 e 2 dp. Pode-se considerar, de modo geral, que os melhores índices correspondem aos encontrados para 1 dp, podendo essas cifras serem consideradas satisfatórias. Esse aspecto é coerente considerando a margem estreita de variação dos metabolitos, tanto em condições normais, como em patológicas.

Finalmente, deve-se considerar a presença de superposição de valores (DA vs normal), observado pela maioria dos autores que estudaram a questão e também no presente estudo. Deve-se certamente à limitada variação dos metabolitos nas diversas condições, normais e patológicas, como já assinalado. A procura de um marcador biológico, sem ser a verificação neuropatológica (biópsia de tecido cerebral, obtida em condições excepcionais) para confirmar o diagnóstico, tem sido exaustiva, porém até agora não encontrado. Entretanto, lançam-se mão de exames especializados que permitem refinar o diagnóstico e torná-lo "mais provável". Para tanto podem ser utilizados "marcadores substitutos" (bioquímicos, neuroimagem)²³. A ERM é exame de neuroimagem que pode ser um bom candidato como marcador substituto e os seus resultados encontrados para o hipocampo podem ser considerados importantes para refinar o diagnóstico da DA.

CONCLUSÃO

A amostra de pacientes com DA em comparação a um grupo controle caracterizou-se pela redução de Naa, aumento de ml e da relação ml/Naa, en-

quanto os valores em relação à Cho foram variáveis.

Os valores da amostra patológica mostraram-se significativos, tanto de modo global, como individual, o que permite a utilização desses resultados, principalmente conjugados, para aumentar a precisão do diagnóstico e para obtê-lo de modo mais precoce, considerando as características da região estudada.

A ¹H-ERM do hipocampo pode portanto ser considerada um instrumento importante por permitir conhecer a composição de metabolitos de amostra(s) de tecido nervoso normal e patológico in vivo e de modo não invasivo, permitindo uma melhor compreensão dos mecanismos fisiológicos e fisiopatológicos com objetivos clínicos e de pesquisa.

REFERÊNCIAS

- McKham G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. *Neurology* 1984;34:939-944.
- Shiino A, Matsuda M, Morikawa S, Inubushi T, Akiguchi I, Handa J. Proton magnetic resonance spectroscopy with dementia. *Surg Neurol* 1993; 39:143-147.
- Miller BL, Moats RA, Shonk T, Ernst T, Woolley S, Ross BD. Alzheimer disease: depiction of increase cerebral myo-inositol with proton mr spectroscopy. *Radiology* 1993;187:433-437.
- Engelhardt E, Moreira DM, Laks J, Rozenthal M. Espectroscopia de prótons (¹H) por ressonância magnética, neuroquímica cerebral e diagnóstico de doenças neurológicas. *Rev Bras Neurol* 2000; 36:11-25.
- Valenzuela MJ, Perminder S. Magnetic resonance spectroscopy in AD. *Neurology* 2001;56:592-598.
- Ross BD, Bluml S. Magnetic Resonance spectroscopy of the human brain. *Anat Rec (New Anat)* 2001;265:54-84.
- Schonk TK, Moats RA, Gifford P et al. Probable alzheimer's disease: diagnosis with proton mr spectroscopy. *Radiology* 1995;195:65-72.
- Ross BD, Bluml S, Cowan R et al. In vivo MR spectroscopy of human dementia. *Neuroimaging Clin N Am* 1998;8:809-822.
- Kantarci K, Jack CR Jr, Xu YC, et al. Regional metabolic patterns in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a ¹H MRS study. *Neurology* 2000; 55:210-217.
- Block W, Träber F, Kuhl CK et al. ¹H-MR-spektroskopische Bildgebung bei Patienten mit Klinisch gesichertem Morbus Alzheimer. *Fortschr Röntgenstr* 1995;163:230-237.
- Schuff N, Amend D, Ezekiel BA, et al. Changes of hippocampal N-acetyl aspartate and volume in Alzheimer's disease: a proton MR spectroscopic imaging and MRI study. *Neurology* 1997;49:1513-1521.
- Jessen F, Block W, Träber F, et al. Proton MR spectroscopy detects a relative decrease of N-acetylaspartate in the medial temporal lobe of patients with AD. *Neurology* 2000;55:684-688.

13. Engelhardt E, Moreira DM, Laks J, Marinho VM, Rozenthal M, Oliveira Jr AC. Proton magnetic resonance spectroscopy of the hippocampus: normalization in the elderly. Abstracts - World Alzheimer Congress (2000). *Neurobiol Aging* 2000;21(Suppl):S41.
14. Engelhardt E, Moreira DM, Laks J et al. Proton magnetic resonance spectroscopy of the hippocampus in Alzheimer's disease. Abstracts - Joint Meeting - International Psychogeriatric Association and Brazilian Association of Geriatric Neuropsychiatry - JBNPG 2000;edição especial:43.
15. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 1991;82:239-259.
16. Grober E, Dickson D, Sliwinski MJ et al. Memory and mental status correlates of modified Braak staging. *Neurobiol Aging* 1999;20:573-579.
17. Meyerhoff DJ, MacKay S, Constans JM et al. Axonal injury and membrane alterations in Alzheimer's disease suggested by in vivo proton magnetic resonance spectroscopic imaging. *Ann Neurol* 1994;36:40-47.
18. Schuff N, Amend D, Meyerhoff DJ et al. Alzheimer's disease: quantitative H-1 MR spectroscopic imaging of frontoparietal brain. *Radiology* 1998;207:91-102.
19. Kohler S. Signal advantage applications guide. PROBE/SV. GE Medical Systems. Milwaukee: General Electric Co, 1993.
20. Moats RA, Shonk T. Evaluation of automated MR spectroscopy: application in Alzheimer disease. *AJNR* 1995;16:1779-1782.
21. Dawson-Saunders B, Trapp RG. Basic and clinical biostatistics. Norwalk:Appleton & Lange, 1990.
22. Danielsen ER, Ross B. Magnetic resonance spectroscopy diagnosis of neurological diseases. New York:Marcel Dekker, 1999.
23. Blennow K, Vanmechelen E. Combination of the different biological markers for increasing specificity of in vivo Alzheimer's testing. *J Neural Transmis* 1998;53(Suppl):223-235.
24. Pfefferbaum A, Adalsteinsson E, Spielman D, Sullivan EV, Lim KO. In vivo brain concentrations of n-acetyl compounds, creatine, and choline in Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry* 1999;56:185-192.
25. Lazeyras F, Charles HC, Tuples LA, et al. Metabolic brain mapping in Alzheimer's disease using proton magnetic resonance spectroscopy. *Psychiatry Res: Neuroim Sec* 1998;82:95-106.