

RACHEL PAES GUIMARÃES

Avaliação das escalas ICARS (*International Cooperative Ataxia Rating Scale*) e SARA (*Scale for the Assessment of Rating Ataxia*) e exames de ressonância magnética na doença de Machado-Joseph

CAMPINAS

Unicamp

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

Avaliação das escalas ICARS (*International Cooperative Ataxia Rating Scale*) e SARA (*Scale for the Assessment of Rating Ataxia*) e exames de ressonância magnética na doença de Machado-Joseph

Rachel Paes Guimarães

Tese de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Médica, área de concentração em Neurociências. Sob orientação do Prof. Dr. Fernando Cendes e co-orientação da Prof^a Dra. Iscia T. Lopes-Cendes.

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

G947a Guimarães, Rachel Paes, 1984 -
Avaliação das escalas ICARS (*International Cooperative Ataxia Rating Scale*) e SARA (*Scale for the Assessment of Rating Ataxia*) e exames de ressonância magnética na doença de Machado-Joseph / Rachel Paes Guimarães. – Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Fernando Cendes.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Ataxia. 2. Doença de Machado-Joseph. 3. Imagem por tensor de difusão. 4. Imagem por ressonância magnética. I. Cendes, Fernando. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Magnetic resonance imaging and ICARS and SARA assessment in Machado-Joseph disease.

Palavras-chave em inglês:

Ataxia

Machado-Joseph disease

Diffusion tensor imaging

Magnetic resonance imaging

Titulação: Mestre em Fisiopatologia Médica

Área de concentração: Neurociências

Banca examinadora:

Fernando Cendes [Orientador]

Antonio Carlos dos Santos

Luiz Eduardo Gomes Garcia Betting

Data da defesa: 31-01-2012

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

Banca examinadora de Tese de Mestrado

Rachel Paes Guimarães

Orientador(a): Prof. Dr. Fernando Cendes

Membros:	
Professor (a) Doutor (a) Antônio Carlos dos Santos	
Professor (a) Doutor (a) Luiz Eduardo Gomes Garcia Betting	
Professor (a) Doutor (a) Fernando Cendes	

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 31/01/2012

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fernando Cendes por ter possibilitado a realização desse trabalho e por ter acreditado em mim.

À Clarissa, Anelyssa e Marcondes por todo o apoio e ajuda durante a realização do projeto, sem vocês esse trabalho não seria o mesmo.

Aos amigos do laboratório Matheus, Tátilla, Daniela, Greize, Denise, Brunno, André, Carol e Marcinha por tornarem os dias de trabalho mais divertidos e alegres.

A minha família e ao Guilherme por sempre me apoiarem e pela ajuda nos momentos difíceis.

À **FAPESP** pela concessão da bolsa de estudos (processo #04/02090-8).

	PÁG.
RESUMO	<i>Xiii</i>
ABSTRACT	<i>Xvi</i>
1- INTRODUÇÃO	19
2 – JUSTIFICATIVA	25
2- OBJETIVOS	27
3- MATERIAL E MÉTODOS	29
4- RESULTADOS	35
5- DISCUSSÃO	58
6- CONCLUSÕES	65
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
8- ANEXOS	78

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>MJD</i>	Doença de Machado Joseph
<i>SCA</i>	Ataxia espino cerebelar
<i>SARA</i>	Escala para avaliação e graduação de ataxia.
<i>ICARS</i>	International Cooperative Ataxia Rating Scale
<i>SB</i>	Substância Branca
<i>SC</i>	Substância Cinzenta
<i>RM</i>	Ressonância magnética
<i>VBM</i>	Morfometria Baseada em Vóxel
<i>DTI</i>	Imagem por Tensor de Difusão
<i>TBSS</i>	<i>Tract-Based Spatial Statistics</i>
<i>FA</i>	Anisotropia Fracional
<i>MD</i>	Difusividade média
<i>AD</i>	Difusividade Axial
<i>RD</i>	Difusividade Radial
<i>T</i>	Tesla. É a unidade de <u>densidade de fluxo magnético</u> (ou <u>indução magnética</u>) no <u>SI</u> . A unidade recebeu o nome de <u>Nikola Tesla</u> , cientista <u>sérvio</u> que contribuiu com inúmeros estudos no campo do <u>eletromagnetismo</u> . 1 T = 10.000 G (Gauss, unidade antiga de medida de campo magnético).

- TI*** Tempo de relaxamento longitudinal, parâmetro utilizado na realização em exames de imagens por RM. Corresponde ao tempo necessário para que a magnetização longitudinal retorne a 63% de seu valor inicial.
- T2*** Tempo de relaxamento transversal, parâmetro utilizado na realização em exames de imagens por RM. Corresponde ao tempo necessário para que a magnetização transversal diminua de 63%.
- TE*** Tempo de echo: duração entre o pulso e a recepção do sinal de ressonância magnética.
- TR*** Tempo de repetição: duração do intervalo entre os trens de impulso em alta frequência.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados dos pacientes.....	36
Tabela 2 – Áreas onde houve redução de FA nos pacientes.....	37
Tabela 3 – Áreas onde houve aumento de AD nos pacientes.....	39
Tabela 4 - Áreas onde houve aumento de RD nos pacientes.....	41
Tabela 5 – Áreas de diminuição de densidade de SB através de análise de VBM pela ferramenta SUIT.....	44
Tabela 6 - Áreas de diminuição de densidade de SB através de análise de VBM pela ferramenta SUIT.....	45
Tabela 7 – Áreas de correlação entre diminuição da densidade de SB e o escore da escala ICARS.....	48
Tabela 8 – Áreas de correlação entre diminuição da densidade de SB e o escore da escala SARA.....	49
Tabela 9 – Áreas de correlação entre densidade de SB e o tempo de duração da doença	51
Tabela 10 – Áreas de correlação entre diminuição da densidade de SC e o escore da escala ICARS.....	52
Tabela 11 – Áreas de correlação entre diminuição da densidade de SC e o escore da escala ICARS.....	54
Tabela 12 - Áreas de correlação entre diminuição da densidade de SC e o tamanho da expansão CAG.....	55

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Mapa de FA encontrado após a comparação entre as médias do grupo controle e pacientes com MJD/SCA3. As áreas em vermelho representam regiões do cérebro onde houve significativa redução da FA nos pacientes com MJD/SCA3 em relação ao grupo controle. $p \leq 0.05$37
- Figura 2** - Mapa de AD encontrado após a comparação entre as médias do grupo controle e pacientes com MJD/SCA3. As áreas em vermelho representam regiões do cérebro onde houve significativo aumento da AD nos pacientes com MJD/SCA3 em relação ao grupo controle. $p \leq 0.01$38
- Figura 3** - Mapa de RD encontrado após a comparação entre as médias do grupo controle e pacientes com MJD/SCA3. As áreas em vermelho representam regiões do cérebro onde houve significativo aumento da RD nos pacientes com MJD/SCA3 em relação ao grupo controle. $p \leq 0.01$40
- Figura 4** - Correlação simples entre o valor de FA na região de ponte e o tempo de duração da doença, $p=0.01$, $r=0.4$42
- Figura 5** - Áreas de atrofia de SB encontradas em indivíduos com MJD/SCA3. $p \leq 0.001$ 43
- Figura 6** - Áreas de atrofia de SC encontradas em indivíduos com MJD/SCA3. $p \leq 0.001$ 46
- Figura 7** - Áreas de correlação negativa entre SB e o escore da escala ICARS. $p \leq 0.001$ 47
- Figura 8** - Áreas de correlação negativa entre SB e o escore da escala SARA. $p \leq 0.001$ 49
- Figura 9** - Áreas de correlação negativa entre SB e o tempo de duração da doença. $p \leq 0.001$50
- Figura 10** - Áreas de correlação entre SC e o escore da escala ICARS. $p \leq 0.001$52
- Figura 11** - Áreas de correlação entre SC e o escore da escala SARA. $p \leq 0.001$53
- Figura 12** - Áreas de correlação entre densidade de SC e tamanho da expansão CAG. $p \leq 0.001$55

Figura 13 – Correlação simples entre o escore da escala SARA e o tempo de duração da doença. $p=0.001$, $r=0.4$56

Figura 14 - Correlação simples entre o tamanho da expansão CAG e a idade de início dos sintomas, $p=0.0001$, $r=0.55$57

RESUMO

A doença de Machado Joseph (MJD) ou ataxia espinocerebelar tipo 3 (SCA3) é uma doença autossômica dominante e é o tipo de ataxia mais comum no Brasil. Os principais sintomas são ataxia, alterações de movimentação ocular, distonia, espasticidade e disfunção piramidal e fasciculações, além de disfagia e disartria. Estes usualmente tem início na idade adulta, entre os 30-40 anos. Apesar de ser frequente, existem poucos biomarcadores para a avaliação da progressão da doença.

O objetivo deste estudo foi avaliar a SB cerebelar e cerebral de indivíduos com MJD/SCA3 através da técnica de Imagem por tensor de difusão (DTI) e Morfometria baseada em Vóxel (VBM), além de correlacionar os dados de duas escalas específicas para ataxia, a *International Cooperative Ataxia Rating Scale (ICARS)* e a *Scale for the Assessment and Rating of Ataxia (SARA)* com as imagens de ressonância magnética.

Para tanto foram selecionados 38 pacientes com diagnóstico de MJD/SCA3, confirmado por meio de teste molecular, além de 38 indivíduos controles. Todos passaram por exame de ressonância magnética, e os acometidos pela MJD/SCA3 foram avaliados através de exame neurológico e as escalas ICARS e SARA.

As análises de DTI feitas através do *Tract-Based Spatial Statistics (TBSS)* demonstraram redução da anisotropia fracional em tronco cerebral, lobo cerebelar anterior, mesencéfalo, lobo cerebelar posterior à direita, nóculo, culmen, núcleo denteado e fastigial. Foram encontradas também áreas com aumento de difusividade radial e axial em tronco encefálico, ponte, mesencéfalo, lobo cerebelar anterior, núcleo denteado, fastigium e tálamo. Aumento de difusividade radial também foi encontrado em lobos frontal e temporal. Não foram encontradas áreas com alteração de difusividade média. Uma correlação positiva entre os valores de anisotropia fracional extraídos da ponte com o tempo de duração da doença foi encontrada.

Os resultados da VBM demonstraram atrofia de substância branca em tonsila, lobo cerebelar posterior, medula, tronco cerebral direito, ponte, culmen, declive, vermis, giro lingual, giro fusiforme, núcleo denteado, úvula e pirâmide. Foi encontrada uma correlação

negativa entre densidade de SB e os escores das escalas ICARS e SARA e tempo de duração da doença.

Atrofia de substância cinzenta em lobo cerebelar posterior, tonsila, medula, tronco encefálico, lóbulo semi-lunar inferior, declive, tuber e pirâmide. Correlações entre a densidade de SC e dados clínicos demonstraram correlação negativa com os escores das escalas ICARS e SARA e o tamanho da expansão CAG.

O presente estudo apresenta informações relevantes sobre alterações microestruturais em SB e macroestruturais em SB e SC na MJD/SCA3. Acreditamos que esses achados contribuam para um melhor entendimento sobre o processo neuropatológico desta doença.

ABSTRACT

Machado Joseph Disease or spinocerebellar ataxia type 3 (MJD/SCA3) is an autosomal dominant ataxia and it is the most common in Brasil and in the world. The main symptoms are ataxia, extraocular movement disorders, dystonia, disfagia, spasticity, pyramidal dysfunction and fasciculation. The symptoms usually appear between 30-40 years.

The objective of the present study was to assess cerebellar and cerebral white matter in MJD/SCA3 patients through Diffusion Tensor Imaging (DTI) and Voxel Based Morphometry (VBM) and to correlate clinical data obtained by two scales that are specific for ataxia, the International Cooperative Ataxia Rating Scale (ICARS) and Scale for the Assessment and Rating of Ataxia (SARA) with magnetic resonance imaging findings.

For that purpose we recruited 38 patients with a confirmed molecular diagnosis of MJD/SCA3 and 38 healthy individuals as a control group. All subjects were underwent MRI scan, and patients were assessed by neurological examination, ICARS and SARA.

DTI analysis with Tract-Based Statistical Analysis (TBSS) revealed fractional anisotropy (FA) reduction in the brainstem, the anterior and posterior cerebellar lobes, midbrain, culmen, dentate and fastigial. Areas with increased axial (AD) and radial diffusivity (RD) were found in brainstem, pons, midbrain, cerebellar anterior lobe and thalamus. Increased RD was also evidenced in frontal and temporal lobes. TBSS analysis revealed no alterations in mean diffusivity. A positive correlation between FA values extracted from pons and disease duration was found.

VBM results demonstrated white matter atrophy at tonsil, posterior cerebellar lobe, medulla, brainstem, pons, culmen, declive, vermis, lingual gyrus, fusiform gyrus, dentate, uvula and pyramis. We found a negative correlation between white matter density and SARA, ICARS scores and disease duration.

Grey matter atrophy was demonstrated at posterior cerebellar lobe, tonsil, medulla, brainstem, inferior semi-lunar lobule, declive, tuber and pyramis. A negative correlation between grey matter density, SARA and ICARS scores and CAG repeat size was found.

ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (parecer 503/2009).

Todos os participantes foram instruídos sobre os procedimentos a serem realizados e informados de que sua participação era voluntária. Informamos ainda que a desistência na participação poderia ocorrer a qualquer momento durante a duração da pesquisa, sem prejuízo no acompanhamento e tratamento do sujeito em questão.

Todos os indivíduos foram informados dos riscos e dos procedimentos e assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) antes da realização de qualquer atividade relacionada ao desenvolvimento do projeto. (anexo 3)

1- INTRODUÇÃO

A doença da Machado Joseph ou ataxia espinocerebelar tipo 3 (MJD/SCA3), é uma doença neurodegenerativa, autossômica dominante, causada pela expansão do triplete CAG no cromossomo 14q24.3, e é a forma de ataxia mais comum no Brasil e no mundo (França et al, 2008; Lopes-Cendes et al, 1997). Foi inicialmente descrita em 1972 em uma família de imigrantes portugueses em Massachussets que apresentava como principais sintomas ataxia, nistagmo, disartria leve, hiporreflexia e atrofia muscular (Romanul et al, 1972).

A ataxia é a principal manifestação clínica, e está presente em quase todos os indivíduos acometidos, entretanto outros sintomas como alterações de movimentação ocular, distonia, espasticidade, disfunção piramidal e fasciculações, além de disfagia e disartria são comumente encontrados (D'Abreu et al, 2008; Coutinho, 1994; Rosenberg, 1992). Essa variação demonstra um acometimento tanto central quanto periférico na MJD/SCA3 (França et al, 2010). França et al. demonstraram que a amplitude do potencial sensitivo no nervo sural de pacientes afetados diminuiu em um período de aproximadamente um ano, e que esta redução correlacionou-se com a progressão da ataxia e foi mais grave em indivíduos com expansões maiores.

Considerando essa variabilidade de sintomas a MJD/SCA3 foi dividida em subtipos: o subtipo 1, apresenta como sintomas mais comuns a ataxia axial associada à distonia e à espasticidade, os quais geralmente aparecem mais precocemente e tem rápida evolução; o subtipo 2, o mais comumente encontrado, apresenta ataxia axial importante e ocasionalmente espasticidade em membros inferiores (MMII); o terceiro subtipo apresenta início tardio, lenta progressão e é caracterizado pela associação entre ataxia e neuropatia periférica; o subtipo 4 é formado por pacientes que apresentam parkinsonismo (Münchau et al, 1999). Alguns autores sugerem ainda a existência de um quinto subtipo, caracterizado por paraplegia espástica progressiva pura. Entretanto este subtipo é raro e apresenta semelhanças com o subtipo 1 como início precoce e grandes expansões do triplete CAG (Sakai et al, 1996; Teive et al 2001). Sabe-se que existe uma correlação entre o número de repetições CAG e a gravidade destes sintomas (Shimohata et al, 2000). O início dos sintomas ocorre em grande parte na idade adulta, entre 30-40 anos, mas existem relatos na literatura com início na infância ou em idosos. A partir do início dos sintomas a sobrevida aproximada é de 17 anos (Fujigasaki et al, 2001). Classicamente considera-se que as

funções cognitivas estejam preservadas, no entanto existem casos na literatura que descrevem demência, manifestações psiquiátricas e alterações das funções executivas e emocionais (Klinkle, 2010; Braga Neto, 2011).

A utilização de escalas para avaliação quantitativa da ataxia é bastante difundida e duas dessas escalas são grandemente utilizadas, a ICARS (*International Cooperative Ataxia Rating Scale*), e a SARA (*Scale for the Assessment and Rating of Ataxia*), esta última mais atual.

A ICARS foi desenvolvida para avaliar a ataxia cerebelar e é dividida em quatro partes: 1: postura e distúrbios na marcha (7 itens, 34 pontos); 2: funções cinéticas do tronco (7 itens, 52 pontos); 3: alterações na fala (2 itens, 8 pontos) e 4: alterações oculomotoras (3 itens, 6 pontos). O escore total da escala é de 100 pontos e quanto maior a pontuação pior o desempenho do indivíduo (Schosch et al, 2007).

Já a SARA é uma escala mais recente, proposta por Schmitz-Hübisch et al. e avalia a ataxia de acordo com a incapacidade do paciente. Essa escala passou por um rigoroso processo de validação que incluiu três ensaios clínicos envolvendo grupos de indivíduos com SCA, com ataxia por outras etiologias e controles (Schmitz-Hübisch, 2006). A SARA é dividida em 8 partes: 1: marcha (0-8 pontos); 2: postura (0-6 pontos); 3: sentar (0-4 pontos); 4: alterações na fala (0-6 pontos); 5: teste índice-índice (0-4 pontos); 6: teste índice-nariz (0-4 pontos); movimentos alternados (0-4 pontos) e 8: teste calcâneo Joelho (0-4 pontos). Os subitens 5 a 8 são realizados bilateralmente e o escore é definido através das médias entre os lados direito e esquerdo. A pontuação total da escala é de 40 pontos e assim como na ICARS quanto maior a pontuação, pior o desempenho. Vários estudos em SCA utilizam essas escalas como parâmetro para avaliar a condição física do paciente.

Estudos anteriores demonstraram alterações cerebrais importantes em indivíduos com MJD/SCA3 através de exames de ressonância magnética (RM), tais como atrofia da ponte, putamen, núcleo caudado, pedúnculo cerebelar superior e globo pálido, além de um significativo aumento do IV ventrículo, diminuição do cerebelo e atrofia dos lobos frontal e temporal (Liang et al, 2009; Horimoto et al, 2008).

Um estudo recente avaliou 15 indivíduos com diagnóstico molecular de MJD/SCA3 por meio de volumetria e demonstrou uma redução volumétrica no mesencéfalo, ponte, bulbo, vérmis, hemisférios cerebelares e volume total do cerebelo. Correlações significativas entre idade, duração da doença, CAG e escore da escala ICARS foram observados com as medidas volumétricas de cerebelo e tronco (Camargo et al, 2011). Outro estudo demonstrou redução de 28.5% no volume do tronco e 18.7% em cerebelo, principalmente em vérmis (Schulz et al, 2010). Oliveira et al analisaram textura cerebral em 36 indivíduos, sendo 18 pacientes e 18 controles e encontraram diferenças significativas em núcleo caudado, tálamo e putâmem (Oliveira et al, 2011). Lukas et al demonstraram ainda atrofia medular em pacientes com MJD/SCA3 (Lukas et al, 2006). Estudos sugerem que a idade dos pacientes e o tempo de doença se correlacionam com as alterações volumétricas e de textura observadas em especial no tronco e cerebelo (Camargo et al, 2011; Oliveira et al, 2011).

Em um estudo de espectroscopia D'Abreu et al descreveram pela primeira vez anormalidades em substância branca (SB), o que pode indicar perda neuronal e axonal. Métodos de análise utilizados anteriormente como a morfometria baseada em voxel (VBM) demonstraram somente alterações de SB no cerebelo, mas não confirmaram alterações de SB nos hemisférios cerebrais (D'Abreu et al, 2011).

A técnica de VBM permite detectar diferenças na morfologia cerebral entre dois ou mais grupos. A análise de VBM pode ser realizada em grande número de indivíduos, geralmente comparando doentes e controles e por ser um processo totalmente automático, os resultados são bastante robustos (Yasuda et al, 2010; Whitwell, 2009).

A técnica de *diffusion-tensor imaging* (DTI) possibilita a visualização de microestruturas e quantifica a difusão de água nos tecidos de maneira não invasiva. DTI é baseada na teoria de que a água encontrada nos tecidos apresenta propriedades de difusão anisotrópicas, ou seja, a difusão não é igual em todas as direções. Através da utilização desta sequência de RM pode-se medir a tendência do movimento das moléculas de água em um dado meio. Na SB o movimento dessas moléculas é mais rápido quando acompanha o sentido das fibras e mais lento nas demais direções. Quando isso acontece diz-se que a difusão é anisotrópica (Rittner e Lotufo, 2010).

Nas imagens em DTI em cada voxel temos um tensor de difusão que é uma descrição matemática da direção e magnitude do movimento das moléculas de água em um determinado espaço tridimensional. Esses tensores além de descreverem a mobilidade das moléculas de água descrevem também a correlação entre as direções (Le Bihan et al, 2001). Se a matriz do tensor for diagonalizada encontramos autovalores, e associados a estes os autovetores que correspondem às direções principais da difusão e suas difusividades associadas (Widjaja et al, 2007). Cada tensor é representado por uma elipsóide, que é uma representação tridimensional da distância de difusão percorrida pelas moléculas em um dado tempo de difusão. A orientação da elipsóide é caracterizada pelos autovetores e sua forma é caracterizada pelos autovalores. O eixo principal da elipsóide que é o maior autovetor representa a direção principal em cada voxel (coincidindo com a direção das fibras), enquanto que a excentricidade da elipsóide nos fornece informações sobre o grau de anisotropia. Já os autovalores representam o grau de difusibilidade nas 3 direções da elipsóide. O maior autovalor está relacionado com a intensidade da difusividade da água ao longo das fibras, esse valor é denominado de difusividade axial. Os outros 2 autovalores são denominados difusividade radial e transversal. Estudo realizado com indivíduos que passaram por calosotomia sugere que a análise da difusividade radial e axial pode contribuir com informações mais específicas sobre o fenômeno biofísico responsável pela diminuição da anisotropia fracional (FA) em processos patológicos envolvendo SB (Della Nave et al, 2001).

Através das imagens obtidas pela difusão, pode-se chegar a duas medidas, a média de difusão (MD) e FA; a primeira representa a magnitude da difusão e a segunda quantifica a direção preferencial da difusão das moléculas de água através dos tratos de SB, além disso, pode-se calcular o coeficiente de difusão aparente (CDA) da água, que nos fornece informações sobre a fisiopatologia dos tecidos. Essas informações podem complementar àquelas conseguidas em exames ponderados em T1 ou T2 (Engelhardt et al, 2008).

Em um meio isotrópico a FA é 0 em um meio totalmente anisotrópico a FA é 1, portanto, redução dos valores de FA associados a um aumento dos valores de MD pode demonstrar perda axonal ou desmielinização (Zhang et al, 2007).

Estudos anteriores demonstram que a imagem por difusão ou tractografia é uma ferramenta importante na avaliação das doenças neurodegenerativas, pois a imagem consegue demonstrar a perda neuronal através de uma diminuição da anisotropia de difusão, mostrada através de valores mais baixos de FA e um valor aumentado de MD (Pierpaoli et al, 1996; Little et al, 2007).

Estudo recente avaliou 9 pacientes com SCA7 através de DTI usando o TBSS (*Tract Based Spatial Statistics*) em todo o cérebro, tronco cerebral e cerebelo para comparar a FA da difusão da água entre pacientes e controles. Foi encontrada uma diminuição da FA nos pacientes em SB cerebelar, tronco cerebral, pedúnculos cerebelares, mesencéfalo, cápsula interna, lobos frontal e temporal e corpo caloso (Alcauter et al, 2011).

Della Nave et al avaliaram 14 pacientes com SCA 2 através de TBSS e encontraram diminuição de FA nos pedúnculos cerebelares superiores, além de aumento das difusividades axial e radial na mesma área (DellaNave et al, 2011).

Ainda não existem dados na literatura avaliando achados de DTI em MJD/SCA3.

Como a maioria dos dados encontrados na literatura são sobre substância cinzenta na MJD/SCA3, nosso objetivo foi avaliar também possíveis alterações de SB tanto micro quanto macroestruturalmente e correlacioná-las com os dados clínicos desses indivíduos, em especial as escalas ICARS e SARA.

2 - JUSTIFICATIVA

Existem na literatura diversos dados sobre o acometimento da SC em MJD/SCA3. No entanto, os achados relacionados a SB são contraditórios. Enquanto alguns estudos anatomopatológicos e volumétricos sugerem ser o acometimento restrito a SB do cerebelo, estudos funcionais e metabólicos parecem apontar para o acometimento da SB também dos hemisférios cerebrais.

Há ainda uma grande necessidade de se identificar biomarcadores em doenças neurodegenerativas progressivas, e exames de imagem, devido sua segurança e pelo fato de não serem invasivos constituem ferramentas ideais nestes casos.

Desta forma, nos propomos a usar duas técnicas extremamente sensíveis de avaliação da SB em pacientes com MJD/SCA3 e correlacioná-la com marcadores clínicos da doença a fim de entender melhor sua fisiopatologia e em busca de possíveis biomarcadores.

2- OBJETIVOS

OBJETIVOS GERAIS:

Avaliar a SB cerebelar e cerebral de indivíduos com MJD/SCA3 através da técnica de DTI e VBM.

Objetivos específicos:

- 1- Correlacionar os achados de DTI e VBM com as escalas ICARS (anexo1) e SARA (anexo 2).
- 2- Correlacionar os achados de DTI e VBM com marcadores clínicos da doença (idade, idade de início, duração da doença, tamanho da expansão CAG).

3- MATERIAL E MÉTODOS

Pesquisa transversal realizada no Laboratório de Neuroimagem do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas).

Sujeitos

Os indivíduos foram recrutados, consecutivamente, por meio da lista de pacientes encaminhados ao Ambulatório de Neurogenética e Distúrbios do Movimento do Hospital das Clínicas da UNICAMP. Os critérios de inclusão foram: história clínica e exame neurológico compatíveis com o diagnóstico clínico de MJD/SCA3, teste molecular confirmatório, idade superior a 18 anos e assinatura do TCLE. Os critérios de exclusão para a participação no projeto de pesquisa foram: história de alcoolismo; doença cerebrovascular prévia ou patologia neurológica ou neurodegenerativa associada; portadores assintomáticos, gravidez; contra-indicações clínicas para a realização do exame de RM (marcapasso cardíaco, claustrofobia, implantes metálicos) e não aceitação dos termos previstos no TCLE. O grupo controle foi formado por voluntários do HC ou parentes não consanguíneos dos pacientes.

Procedimentos

Todos os pacientes passaram por avaliação clínica e exame de RM. Os indivíduos controle realizaram somente exame de RM.

Aplicação das escalas ICARS e SARA

As escalas foram aplicadas em todos os pacientes por um fisioterapeuta com especialização em Neurologia, previamente treinado por um neurologista especialista em Distúrbios do Movimento, e de acordo com as instruções previamente publicadas.

Aquisição da imagem

As imagens foram adquiridas em ressonância magnética 3T (Phillips Achieva) no Hospital das Clínicas da Unicamp. Imagens ponderadas em T1 e T2 foram adquiridas nos planos axial, coronal e sagital com cortes finos. Nós obtivemos duas sequências específicas que foram usadas posteriormente para as análises de VBM e DTI.

1. Imagem Volumétrica T1 (3D) gradiente eco – adquirida no plano sagittal com espessura de 1 mm (ângulo de *flip* = 35°, TR = 7.1 ms, TE = 3.2 ms, matriz = 240 x 240, FOV = 24 x 24 cm).
2. Diffusion tensor imaging – sequência não-colinear ecoplanar em 32 direções (ângulo de *flip* = 90°, tamanho do voxel = 2x2x2 mm³, TR = 8500 ms, TE = 61 ms, matriz = 128 x 128, FOV = 256 x 256 mm, 70 cortes com 3mm de espessura, b-valor = 1,000).

Análise de DTI

A DTI é uma ferramenta sensível às características de difusão da água e foi desenvolvida para investigar as propriedades de tecidos cerebrais, principalmente SB.

Utilizamos a ferramenta *Tract Based Spatial Statistics* (TBSS) que foi desenvolvida para realizar testes estatísticos de FA, difusividade média (MD), difusividade axial (AD) e difusividade radial (RD) visando aliviar os problemas de alinhamento encontrados em outras técnicas.

Os dados de FA de cada indivíduo são projetados em um espaço comum de maneira que não dependa de um registro linear perfeito. Isso é conseguido através de um registro não

linear inicial aproximado, seguido de uma projeção em uma representação dos tratos (esqueleto da média de FA). O esqueleto de FA representa o centro de todos os feixes de fibras comuns aos sujeitos envolvidos no estudo. Neste caso não há necessidade de suavização.

Passos do TBSS

- 1 – Identificação de um registro comum e alinhamento das imagens de FA de todos os indivíduos através de registro não linear.
- 2 – Criação de uma média das imagens de FA alinhadas.
- 3 – Projeção dos dados de FA de cada indivíduo para que seja criado um esqueleto da média principal de FA.
- 4 – Análise estatística voxel a voxel dos sujeitos através dos dados de FA do esqueleto.

Análise dos dados

Para que pudessem ser processados todos os dados das imagens foram transferidos para estações de trabalho Linux. As imagens estruturais foram inspecionadas visualmente por neurologistas com objetivo de identificar qualquer anormalidade estrutural.

O pré-processamento e análise dos dados de difusão foram feitos através de ferramentas do software *FSL 4.1* (<http://www.fmrib.ox.ac.uk/fsl/>).

Inicialmente, todas as imagens no formato DICOM foram convertidas em arquivos Nifti através do software *MRICroN* (<http://www.cabiatl.com/mricro/mricron/>). Todas as imagens foram corrigidas quanto à presença de irregularidades e /ou artefatos. As imagens b0 foram alinhadas a uma imagem b0 de referência e as transformações lineares resultantes das matrizes foram então aplicadas para imagens ponderadas em difusão seguindo cada imagem b0 inicial. Após correção através da ferramenta *eddycurrents*, três repetições foram

calculadas para melhorar a relação sinal- ruído. Uma máscara binária possibilitou a diferenciação entre o cérebro e a calota craniana, sendo calculada para a extração do cérebro e aplicada a todas as imagens através da ferramenta *Brain Extraction* (BET). Em seguida a FA, MD, AD e RD foram geradas através do algoritmo *DTIfit* (Smith et al., 2006).

Para a realização da análise estatística voxel a voxel nós utilizamos a ferramenta TBSS, que também faz parte do programa FSL (<http://www.fmrib.ox.ac.uk/fsl/tbss/index.html>). Essa ferramenta é restrita aos tratos de SB, portanto, possíveis mudanças que possam existir na SC de indivíduos com MJD/SCA3 não são detectadas.

Primeiramente os mapas de FA foram escalados para um intervalo de intensidade aproximada entre 0 e 1 para as etapas posteriores do processamento. Em seguida, todos os mapas de FA foram alinhados para o espaço padrão (FMRIB58) $1 \times 1 \times 1$ mm usando um template de FA com registro não-linear (RUECKERT et al., 1999). Através da média dos mapas individuais de FA, uma imagem média de FA é gerada. Um esqueleto representando os tratos mais importantes é então derivado de mapas de FA e visualmente inspecionado, para determinar um limite adequado (um limiar de 0,2 foi utilizado). O limiar final do esqueleto de FA para indivíduo (Contida em uma imagem 4D-Nifti) é calculado e utilizado para a realização da estatística baseada em voxel. A análise dos grupos foi realizada utilizando FSL randomise com 10000 permutações. Todos os parâmetros utilizados foram sugeridos pelos autores (SMITH et al 2006).

Os valores de FA foram extraídos da ponte e posteriormente correlacionados com dados clínicos como os escores das escalas ICARS e SARA, tempo de duração da doença e tamanho da expansão CAG. Foi realizada uma regressão múltipla no software Systat9, e um $p \leq 0.05$ foi considerado significativo.

VBM – SUIT

A técnica de VBM permite a identificação de pequenas diferenças na composição local de volume dos tecidos cerebrais através de comparações realizadas voxel a voxel.

Nós utilizamos a ferramenta SUI (Diedrichsen, 2006) que permite uma melhor avaliação das estruturas infra-tentoriais. A análise de VBM através do SUI apresenta duas vantagens importantes: a sobreposição das estruturas cerebelares foi melhorada, e por ser uma ferramenta específica para cerebelo e tronco, as regiões supra-tentoriais não interferem nos resultados.

Etapas do VBM

As imagens em DICOM foram convertidas para Nifti através do software dcm2nii (<http://www.cabiatl.com/mricro/mricron/dcm2nii.html>).

Através da ferramenta SUI do SPM8 nós realizamos um isolamento das estruturas infra-tentoriais e foi gerado um mapa de segmentação. Em seguida foi realizada normalização das imagens para o espaço padrão do atlas SUI. Esse passo tem como objetivo encontrar a melhor correspondência com o template do atlas. O próximo passo é a projeção no atlas SUI.

Nós realizamos modulação dos mapas probabilísticos de SB e SC para compensar alterações de volume que possam ter ocorrido durante a normalização espacial. Em seguida foi realizada a suavização das imagens.

A análise estatística foi realizada com o software SPM 8/DARTEL (<http://www.fil.ion.ucl.ac.uk>). Nós realizamos uma regressão simples para avaliar correlações entre áreas com diminuição de densidade com os escores das escalas ICARS e SARA, tempo de duração da doença e tamanho da expansão CAG. Nós consideramos um limiar de $p \leq 0.001$ não corrigido e um tamanho mínimo do cluster de 50 voxels.

4- RESULTADOS

Os dados demográficos dos indivíduos participantes estão na tabela 1.

O grupo controle foi formado por 38 indivíduos saudáveis (20 homens, 46.86 ± 12.07 anos).

Tabela 1. Dados dos pacientes.

<i>Dados</i>	<i>Pacientes</i>
Idade	$49,32 \pm 10,65$
CAG	$68,08 \pm 4,52$
Idade início	$40,2 \pm 11,48$
Duração	$9,4 \pm 4,31$
ICARS	$31,7 \pm 13,79$
SARA	$14,65 \pm 7,33$

Nós utilizamos o TBSS para analisar as diferenças em FA, MD, AD e RD de 38 pacientes comparados com 38 indivíduos controles. Foi encontrada diminuição de FA em tronco cerebral bilateralmente, medula, ponte, lobos cerebelares anterior e posterior, tonsila, nódulo, núcleo denteado, fastigium e lingual (figura 1). Os dados estão descritos na tabela 2.

Tabela 2. Áreas onde houve redução de FA nos pacientes.

<i>P</i> (corrigido)	X	Y	Z	Região
≤0.05	-1	-32	-36	Tronco cerebral, ponte
≤0.05	-1	-28	-29	Tronco cerebral, ponte
≤0.04	-1	-27	-23	Tronco cerebral, ponte
≤0.04	7	-34	-23	Tronco cerebral, ponte
≤0.03	8	-54	-23	Lobo cerebelar anterior, fastigium
≤0.04	9	-54	-30	Lobo cerebelar anterior, nóculo
≤0.03	-7	-54	-22	Lobo cerebelar anterior

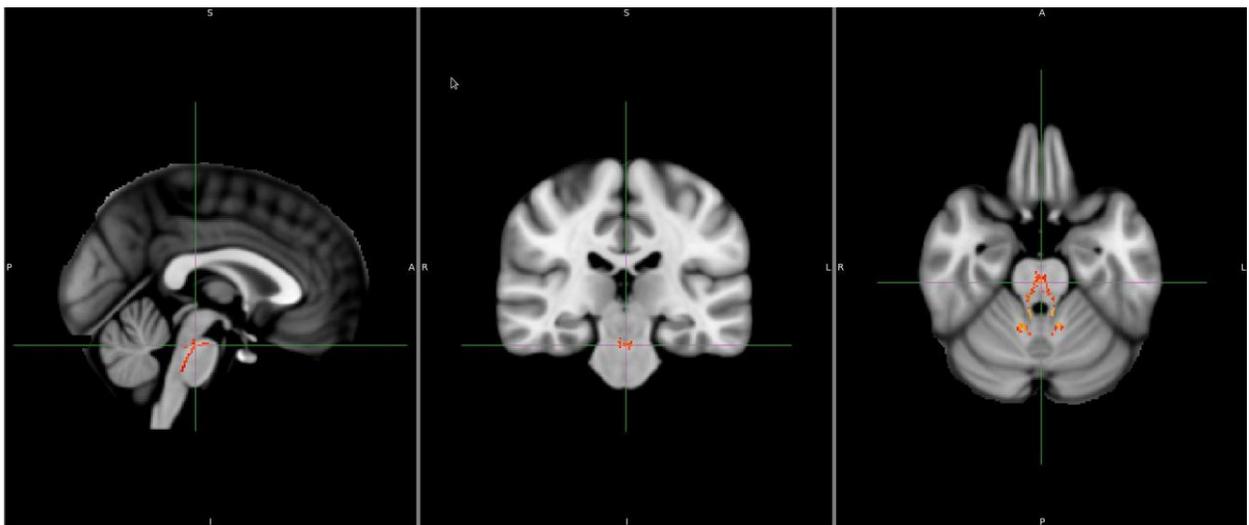


Figura 1. Mapa de FA encontrado após a comparação entre as médias do grupo controle e pacientes com MJD/SCA3. As áreas em vermelho representam regiões do cérebro onde houve significativa redução da FA nos pacientes com MJD/SCA3 em relação ao grupo controle. $p \leq 0.05$.

As alterações de AD foram encontradas em lobos cerebelares anterior e posterior, lóbulo semilunar inferior, tonsila, tronco cerebral, medula, pirâmide, culmen, úvula, vérmis, ponte, declive, vermis, fastigium e tálamo (figura 2). Os dados estão descritos na tabela 3.

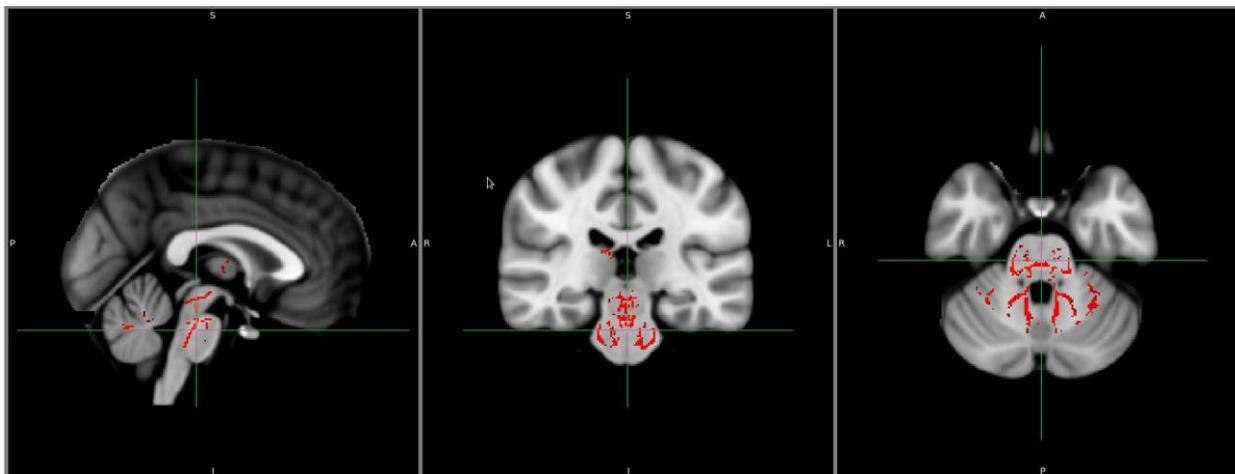


Figura 2. Mapa de AD encontrado após a comparação entre as médias do grupo controle e pacientes com MJD/SCA3. As áreas em vermelho representam regiões do cérebro onde houve significativo aumento da AD nos pacientes com MJD/SCA3 em relação ao grupo controle. $p \leq 0.01$.

Tabela 3. Áreas onde houve aumento de AD nos pacientes.

P(corrigido)	X	Y	Z	Região
≤0.01	9	-41	-35	Tronco cerebral, ponte
≤0.01	7	-41	-27	Tronco cerebral, ponte
≤0.01	6	-41	-23	Lobo cerebelar anterior, cúlmen
≤0.01	-9	-31	-33	Tronco cerebral, ponte
≤0.01	1	-22	-11	Tronco cerebral, mesencéfalo
≤0.01	-1	-25	-12	Tronco cerebral, mesencéfalo
≤0.01	7	-54	-22	Lobo cerebelar anterior
≤0.01	-7	-54	-21	Lobo cerebelar anterior
≤0.01	4	-5	8	Tálamo
≤0.01	3	-9	-1	Tálamo
≤0.01	5	-7	9	Tálamo

As alterações de RD foram encontradas em lobos cerebelares anterior e posterior, lóbulo semi-lunar inferior, tonsila, tronco cerebral, culmen, medula, pirâmide, úvula, núcleo denteado, declive, fastigium. Além dessas alterações em cerebelo e tronco, foi encontrado aumento de RD em lobos frontal e parietal e corpo caloso (figura 3). Os dados estão descritos na tabela 4.

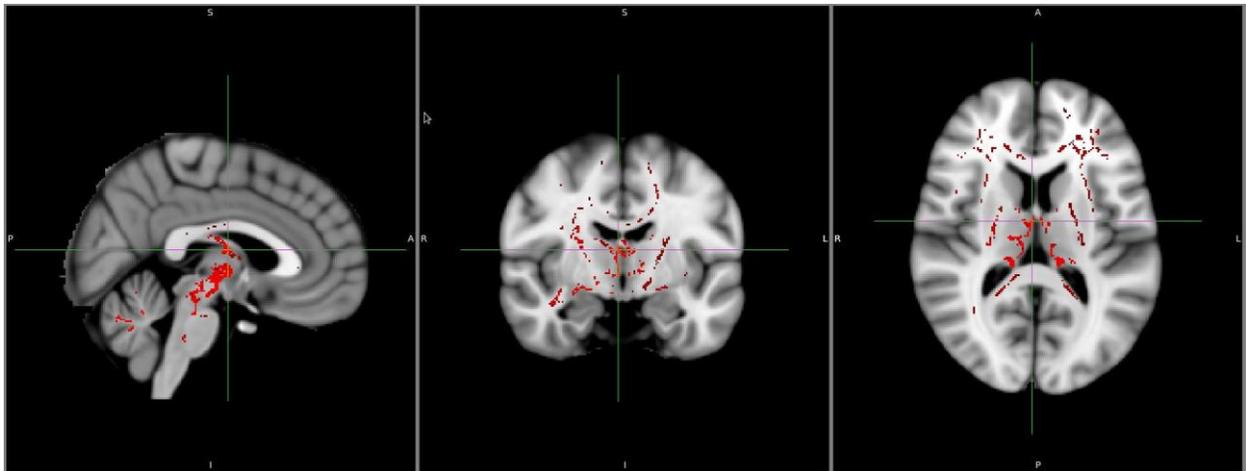


Figura 3. Mapa de RD encontrado após a comparação entre as médias do grupo controle e pacientes com MJD/SCA3. As áreas em vermelho representam regiões do cérebro onde houve significativo aumento da RD nos pacientes com MJD/SCA3 em relação ao grupo controle. $p \leq 0.01$.

Tabela 4. Áreas onde houve aumento de RD nos pacientes.

P(corrigido)	X	Y	Z	Região
≤0.01	-30	-50	-39	Lobo cerebelar posterior, tonsila
≤0.01	13	-39	9	Corpo caloso
≤0.01	-19	-6	-10	Núcleo lentiforme, globo pálido
≤0.01	-36	-26	-2	Lobo Frontal
≤0.01	-12	-57	25	Lobo Parietal
≤0.01	53	-39	26	Lobo Parietal, lóbulo parietal inferior
≤0.01	-18	12	-22	Lobo Frontal
≤0.01	43	-39	28	Lobo Parietal
≤0.01	43	-41	23	Lobo Parietal
≤0.01	11	-58	-32	Lobo cerebelar anterior
≤0.01	-7	-54	-28	Lobo cerebelar anterior, denteado
≤0.01	-6	-27	-37	Tronco cerebral, ponte
≤0.01	-6	-11	-14	Tronco cerebral, mesencéfalo
≤0.01	-6	-10	-1	Tálamo

Na nossa amostra não foram encontradas alterações significativas de MD entre controles e pacientes.

Nós encontramos uma correlação positiva entre os valores de FA na região da ponte e o tempo de duração da doença ($p=0.01$, $r=0.4$) (figura 4).

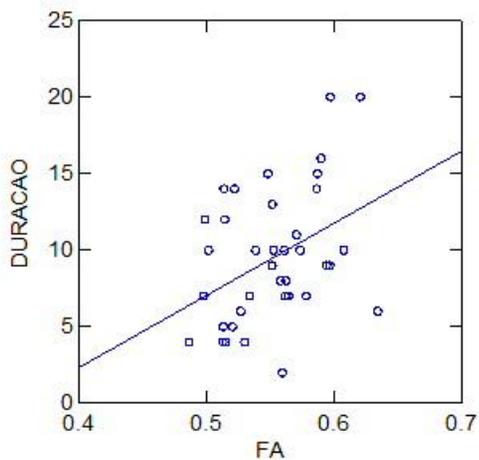


Figura 4. Correlação simples entre o valor de FA na região de ponte e o tempo de duração da doença, $p=0.01$, $r=0.4$.

As análises de VBM, através da ferramenta SUIIT, demonstraram atrofia de SB em lobo cerebelar anterior, culmen, lobo cerebelar posterior e declive (figura 5). Os dados estão descritos na tabela 5.

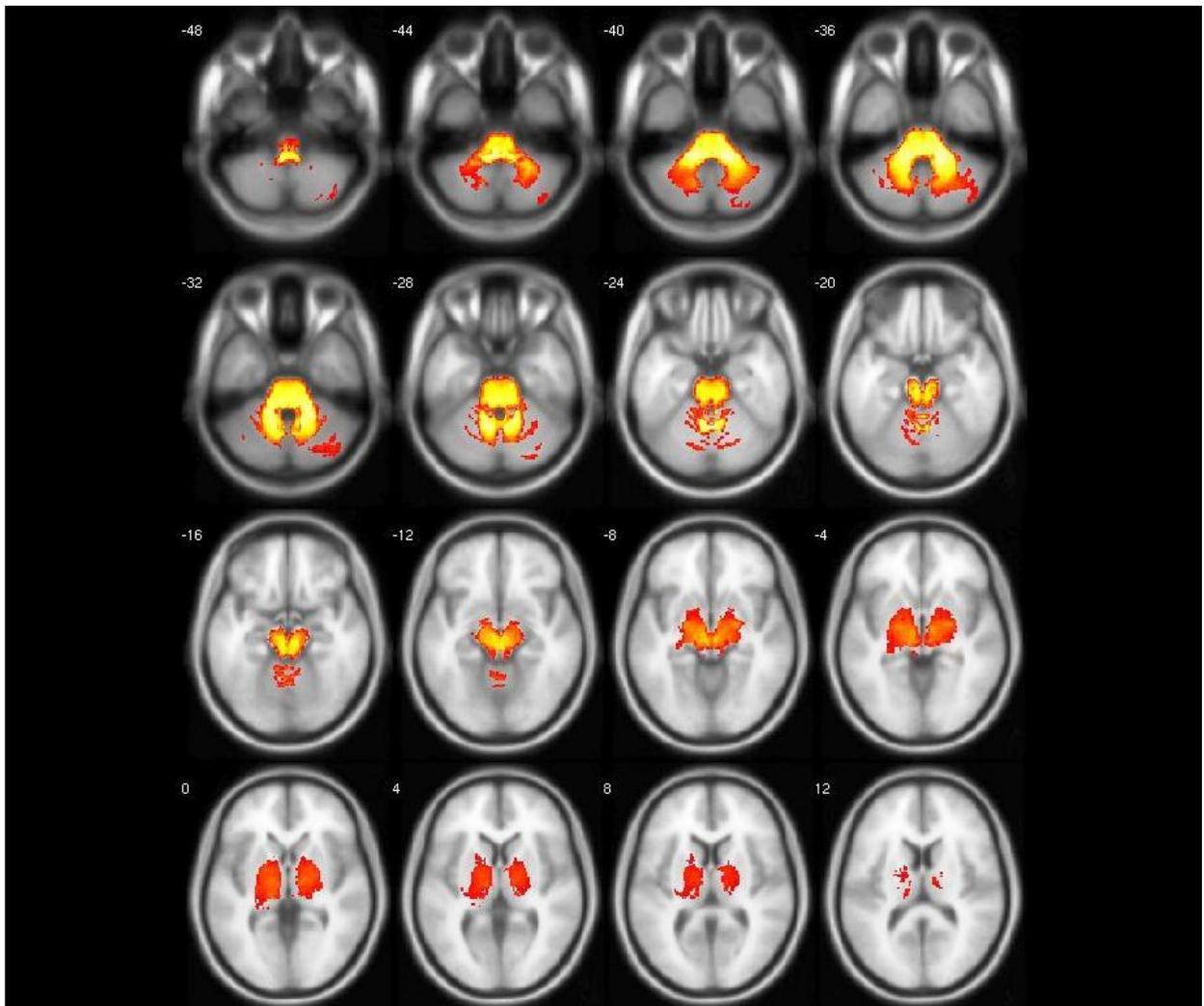


Figura 5. Áreas de atrofia de SB encontradas em indivíduos com MJD/SCA3. $p \leq 0.001$.

Tabela 5. Áreas de diminuição da densidade de SB através da análise de VBM pela ferramenta SUIIT.

Cluster	P (unc)	T	X,Y,Z	Região
26197	≤ 0.001	18.65	10,-40,-42	Tronco cerebral, lobo cerebelar posterior, tonsila
	≤ 0.001	18.62	0,-55,-26	Lobo cerebelar anterior, tonsila cerebelar
	≤ 0.001	18.02	-12,-42,-44	Lobo cerebelar posterior, tonsila cerebelar
199	≤ 0.001	4.90	39,-75,-45	Não indentificado
	≤ 0.001	4.70	34,-74,-53	Não indentificado
	≤ 0.001	3.98	40,-66,-48	Não indentificado

Atrofia de SC foi encontrada em lobos cerebelares anterior e posterior, tonsila, medula, tronco cerebral, lóbulo semi-lunar inferior, declive, vérmis, fastigium, úvula, culmen, tuber, giro lingual e pirâmide, núcleo denteado (figura 6). Os dados estão descritos na tabela 6.

Tabela 6. Áreas de diminuição da densidade de SC através da análise de VBM pela ferramenta SUII.

Cluster	P (unc)	T	X,Y,Z	Região
43982	≤ 0.001	11.32	6,-48,-59	Não identificado
	≤ 0.001	10.88	-33, -73, -41	Lobo cerebelar posterior, lóbulo semilunar
	≤ 0.001	10.23	-39, -63, -45	Não identificado
107	≤ 0.001	4.32	-18, -99, -6	Giro lingual
517	≤ 0.001	4.23	12, 16,10	Caudado
77	≤ 0.001	3.74	-34, -96,1	Não identificado
108	≤ 0.001	3.74	-20, -36,57	Não identificado

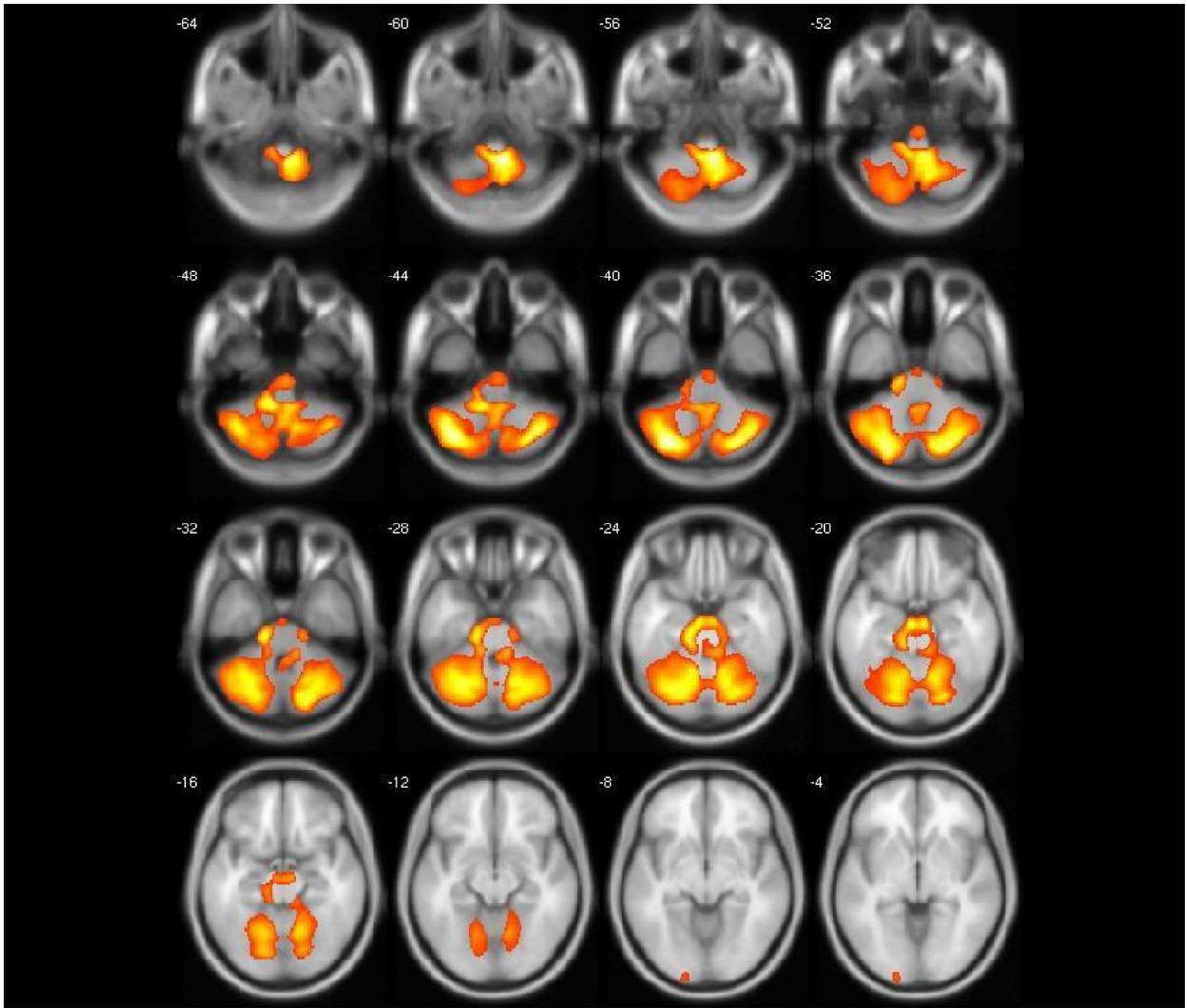


Figura 6. Áreas de atrofia de SC encontradas em indivíduos com MJD/SCA3. $p \leq 0.001$.

Nós encontramos uma correlação negativa entre densidade de SB com o escore das escalas ICARS e SARA em tronco cerebral bilateral. (Figuras 7 e 8). Os dados estão descritos nas tabelas 7 e 8.

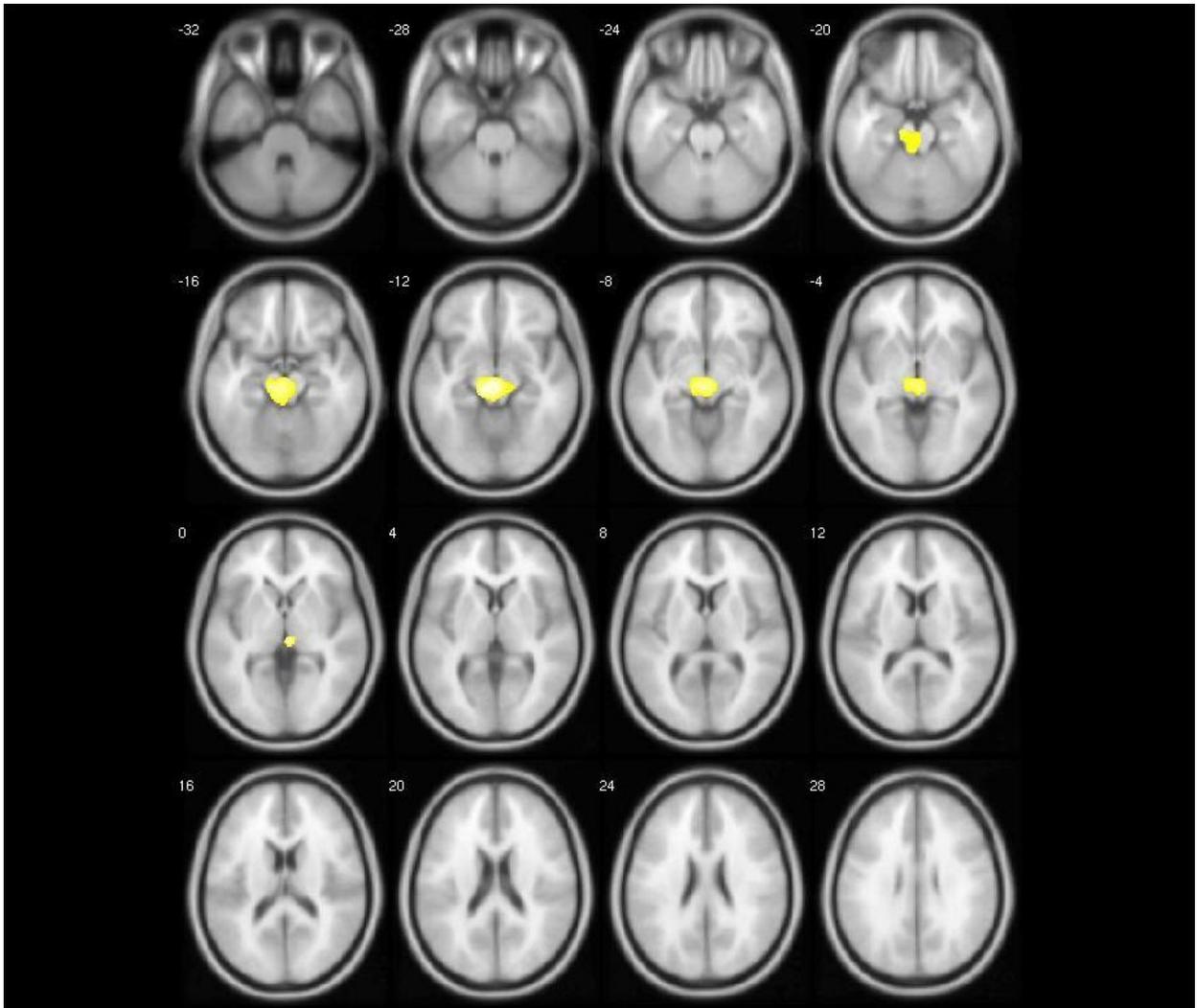


Figura 7. Áreas de correlação negativa entre SB e o escore da escala ICARS. $p \leq 0.001$.

Tabela 7. Áreas de correlação entre diminuição da densidade de SB e o escore da escala ICARS.

Cluster	<i>P</i> (unc)	T	X,Y,Z	Região
2051	≤ 0.001	5.20	4,-25,1	Tronco cerebral
	≤ 0.001	5.10	-2, 21, -12	Cérebro, lobo frontal
	≤ 0.001	4.92	-9, -25, -12	Tronco cerebral, mesencéfalo
655	≤ 0.001	4.94	4,-36,-54	Não identificado

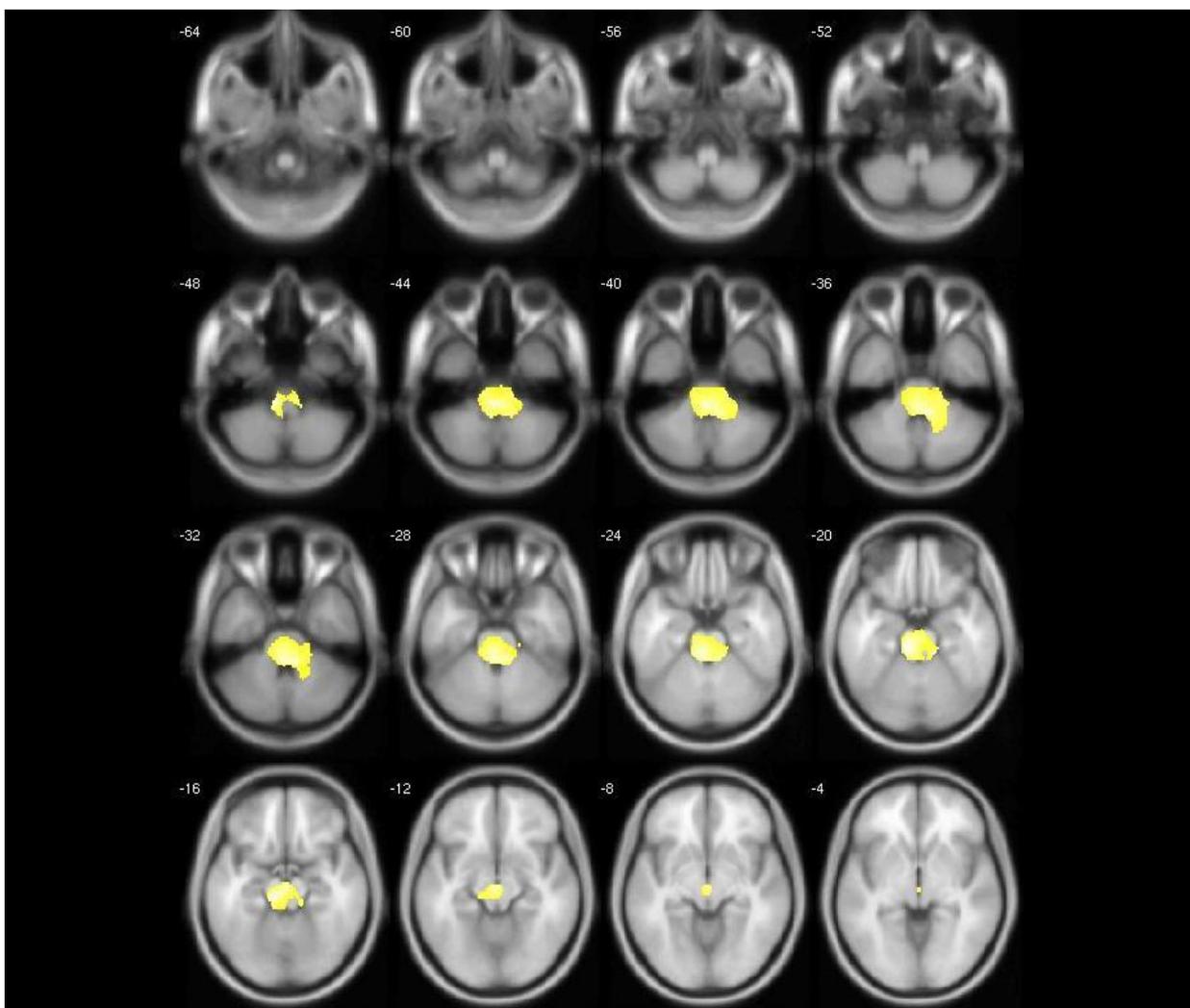


Figura 8. Áreas de correlação negativa entre SB e o escore da escala SARA. $p \leq 0.001$.

Tabela 8. Áreas de correlação entre diminuição da densidade de SB e o escore da escala SARA.

Cluster	P (unc)	T	X,Y,Z	Região
7323	≤ 0.001	4.79	-12, -27, -17	Tronco cerebral, mesencéfalo
	≤ 0.001	4.60	-9, -33, -50	Não identificado
	≤ 0.001	4.56	-9, -33, -21	Tronco cerebral, ponte

Encontramos também correlação negativa entre SB e o tempo de duração da doença em tronco cerebral bilateral, lobo cerebelar anterior e posterior, vérmis e tonsila (figura 9). Os dados estão descritos na tabela 9.

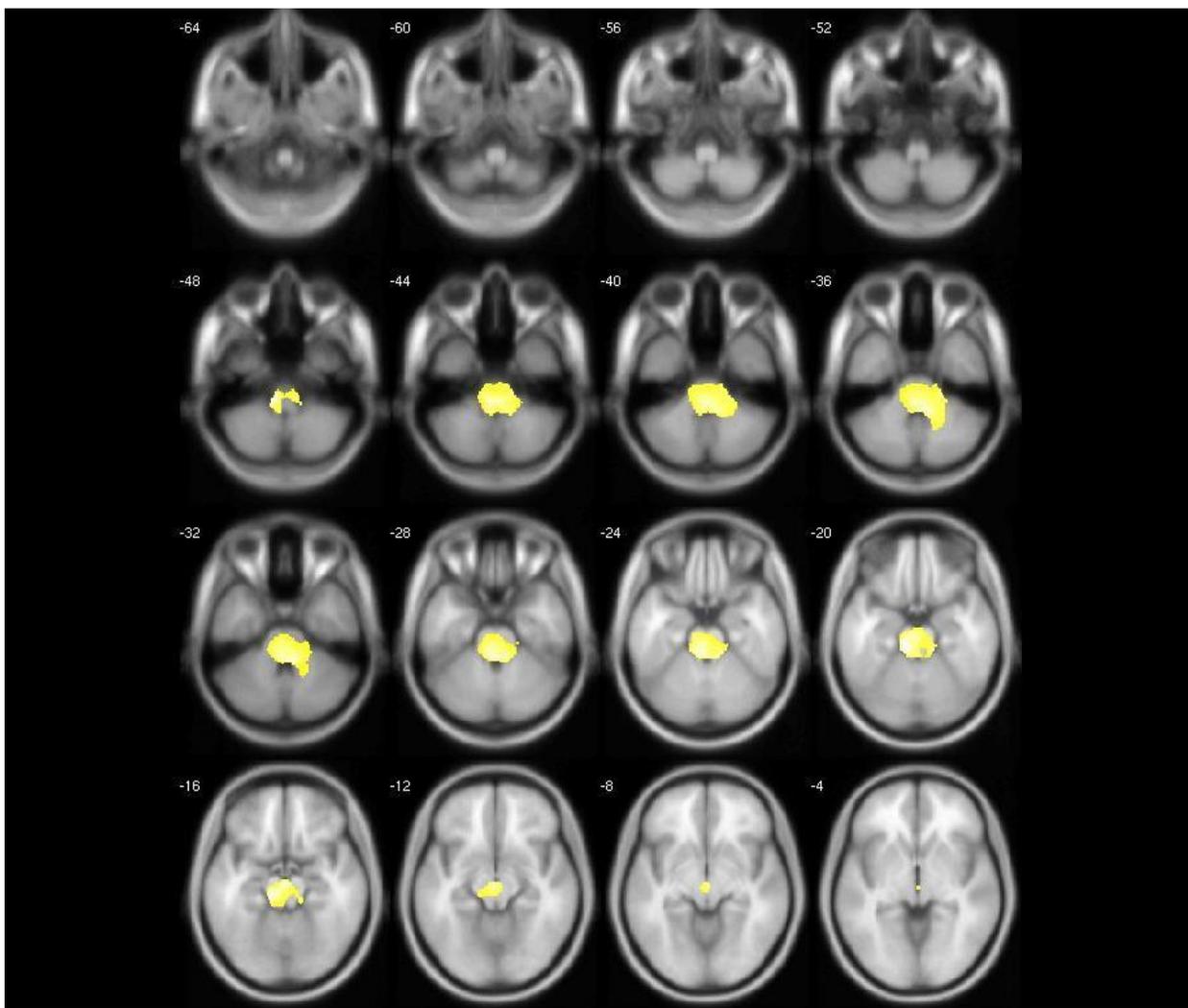


Figura 9. Áreas de correlação negativa entre SB e o tempo de duração da doença. $p \leq 0.001$.

Tabela 9. Áreas de correlação entre diminuição da densidade de SB e o tempo de duração da doença.

Cluster	P (unc)	T	X,Y,Z	Região
7323	≤ 0.001	4.79	-12, -27, -17	Tronco cerebral, mesencéfalo
	≤ 0.001	4.60	-9, -33, -50	Não identificado
	≤ 0.001	4.56	-9, 33, -21	Tronco cerebral, ponte

Encontramos correlação entre SC e as escalas ICARS e SARA em tronco cerebral, lobo cerebelar anterior e posterior e ponte (Figuras 10 e 11). Os dados estão descritos nas tabelas 10 e 11.

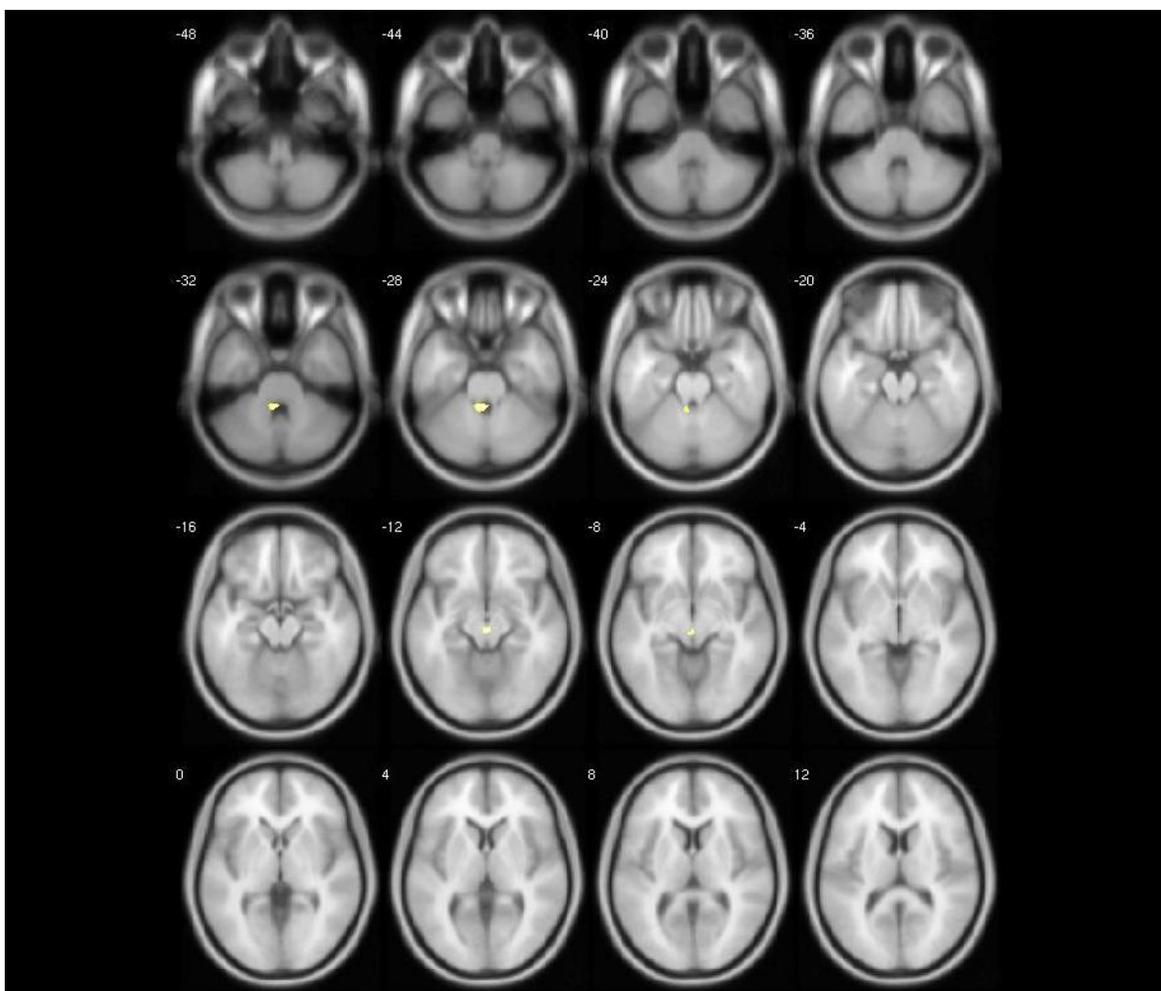


Figura 10. Áreas de correlação entre SC e o escore da escala ICARS. $p \leq 0.001$.

Tabela 10. Áreas de correlação entre diminuição da densidade de SC e o escore da escala ICARS

Cluster	P (unc)	T	X,Y,Z	Região
207	≤ 0.001	4.49	-1, -22, -11	Troco cerebral, mesencéfalo
531	≤ 0.001	4.30	-3, -43, -29	Lobo cerebelar anterior

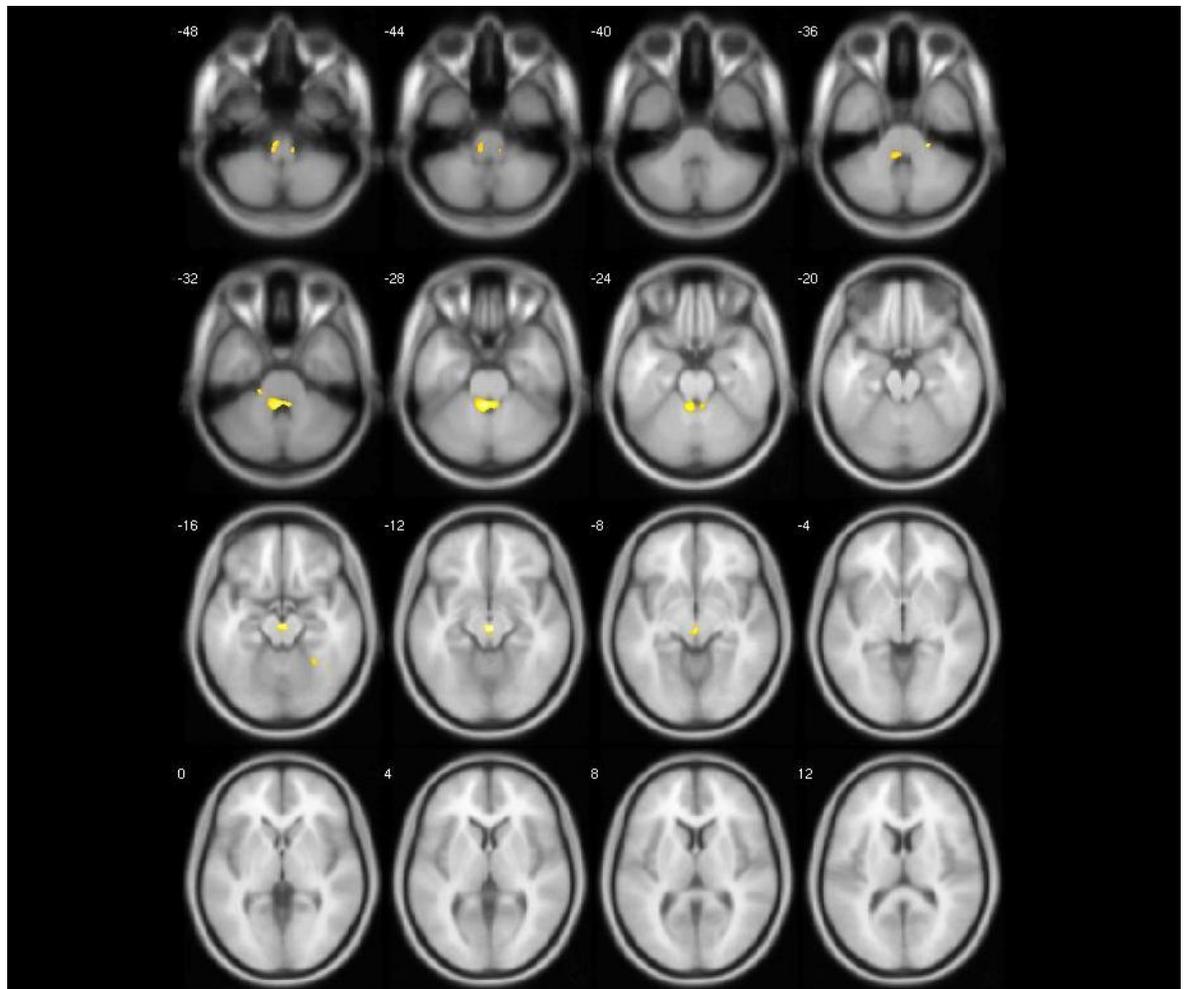


Figura 11. Áreas de correlação entre SC e o escore da escala SARA. $p \leq 0.001$.

Tabela 11. Áreas de correlação entre diminuição da densidade de SC e o escore da escala SARA

Cluster	P (unc)	T	X,Y,Z	Região
511	≤ 0.001	6.22	1,-21,-13	Tronco cerebral, mesencéfalo
1829	≤ 0.001	5.72	-3, -43, -29	Lobo cerebelar anterior
62	≤ 0.001	4.33	22, -32, -37	Não indentificado
342	≤ 0.001	4.05	-6, -30, -48	Não indentificado
80	≤ 0.001	4.03	10, -36, -47	Não indentificado
111	≤ 0.001	4.02	-19, -31, -33	Tronco cerebral, ponte
75	≤ 0.001	3.69	29, -51, -15	Lobo cerebelar anterior, culmen

Encontramos também correlação entre SC e o tamanho da expansão CAG em lobo cerebelar anterior e tronco cerebral (figura 12). Os dados estão descritos na tabela 12.

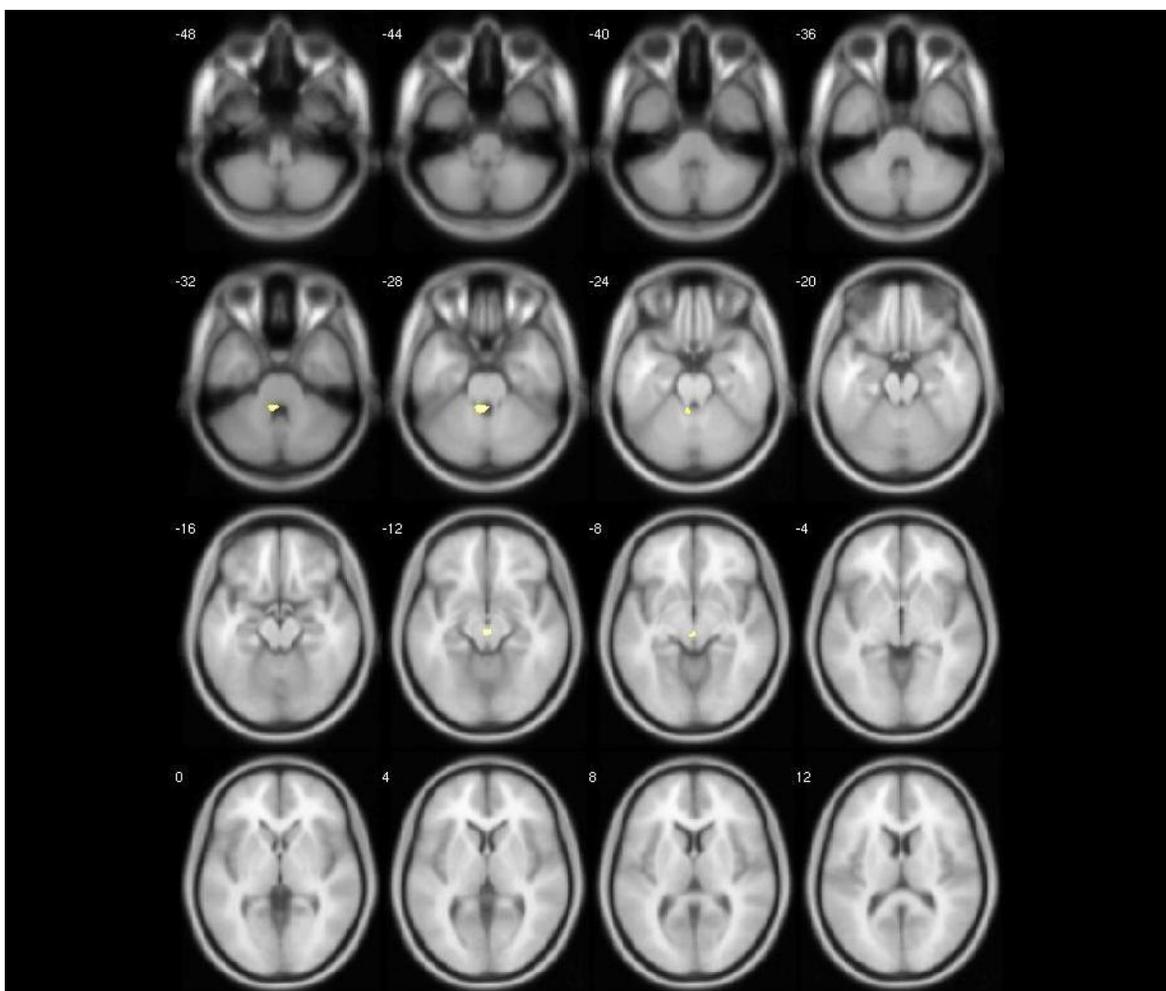


Figura 12 – Áreas de correlação entre densidade de SC e tamanho da expansão CAG. $p \leq 0.001$.

Tabela 12. Áreas de correlação entre diminuição da densidade de SC e o tamanho da expansão CAG

Cluster	$P(\text{unc})$	T	X,Y,Z	Região
207	≤ 0.001	4.49	-1, -22, -11	Tronco cerebral, mesencéfalo
531	≤ 0.001	4.30	-3, -43, -29	Lobo cerebelar anterior

Encontramos correlação positiva entre o escore da escala SARA e o tempo de duração da doença ($r=0.4$, $p=0.003$) (figura 12), e uma correlação negativa entre o tamanho da expansão CAG e a idade de início dos sintomas ($p=0.000$, $r=-0.55$) (figura 13).

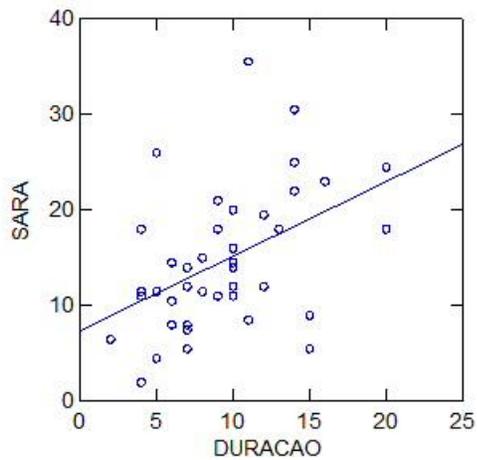


Figura 13. Correlação simples entre o escore da escala SARA e o tempo de duração da doença, $p=0.003$, $r=0.4$.

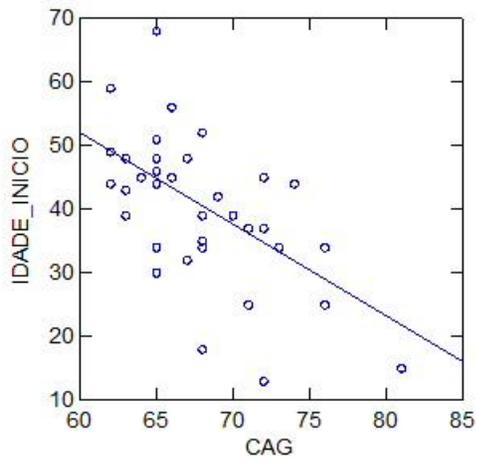


Figura 14. Correlação simples entre o tamanho da expansão CAG e a idade de início dos sintomas, $p=0.0001$, $r=0.55$.

5- DISCUSSÃO

O principal objetivo do estudo foi encontrar alterações cerebrais microestruturais em SB e correlacioná-las com os dados clínicos e genéticos, em especial as escalas ICARS e SARA.

A MJD/SCA3 é o tipo de ataxia mais comum no Brasil e é caracterizada por grande variedade de sintomas, entretanto, as manifestações motoras são usualmente as primeiras a aparecer e as mais incapacitantes. Por isso, uma avaliação clínica quantitativa é de grande importância no acompanhamento e tratamento desses indivíduos. Além dos dados clínicos a avaliação das alterações cerebrais é extremamente importante para um completo entendimento sobre o processo fisiopatológico. Atualmente existem modernas técnicas de análise de imagens de RM que permitem avaliações mais detalhadas e complexas do cérebro.

No presente estudo nós utilizamos duas técnicas de análise de RM, DTI e VBM. O uso da primeira é recente e ainda não existem dados na literatura sobre o seu uso em MJD/SCA3. A segunda já é bastante difundida na literatura, e existem diversos estudos, também em MJD/SCA3.

A DTI permite melhor diferenciação das estruturas anatômicas quando comparada com outros métodos mais convencionais de RM (Shepherd et al 2006;. Zhang et al 2002). Com isso algumas áreas que poderiam ser negligenciadas com a utilização de outras técnicas são detectadas através dessa sequência. No nosso trabalho utilizamos o TBSS que permite uma análise total do cérebro através da quantificação das alterações das moléculas de águas nos tecidos. O TBSS possibilita que os parâmetros da sequência de DTI sejam comparados através de análises estatísticas sem que exista um conhecimento *a priori*. Isto apresenta vantagens em relação a métodos mais convencionais como a capacidade de analisar o cérebro como um todo, sem a necessidade de serem predefinidos voxels ou regiões de interesse, com isso os dados de FA são tomados somente a partir de voxels relevantes (Smith et al, 2006). Algumas das vantagens sobre a utilização do TBSS é que ocorre um melhor alinhamento dos tratos de SB e menos alterações em relação à suavização, o que ocorre com outras técnicas de processamento de imagens como a VBM. Em alguns casos, quando a patologia de determinada doença ainda não é totalmente conhecida, o uso do TBSS permite um melhor entendimento do responsável pelo desenvolvimento e progressão

de certas doenças (Sierra et al., 2011). Por meio da projeção de FA em um esqueleto, a FA se torna mais gaussiana e com menor variabilidade, o que torna a análise mais sensível e robusta (Smith et al, 2006). Através da seleção de um valor de limiar específico é possível a visualização de SB ao redor da região subcortical, já que a SC apresenta valores baixos de FA (Lee et al, 2004).

Entretanto, também existem certas limitações como, por exemplo, a movimentação da cabeça dentro do aparelho de RM que pode causar borramento da imagem, alterando assim a mensuração dos valores das componentes da difusão. Outro ponto que exige atenção são os locais onde ocorre cruzamento de vias ou junção de tratos. A mensuração nessas áreas ainda é limitada, pois a redução do valor de uma das componentes nessas áreas pode ser devido a um aumento de FA em outro trato. Outra limitação é a possibilidade de que algumas áreas que podem ser potencialmente interessantes possam ser indevidamente, excluídas da análise. Isso pode ocorrer, por exemplo, devido à aplicação de um limiar, o que influencia diretamente o resultado da média de FA do esqueleto. Porém a probabilidade de que isso aconteça é pequena já que na maioria das patologias uma análise voxel a voxel entre os indivíduos é apropriada.

Na análise de DTI nós encontramos alterações em três das quatro componentes: FA, AD e RD. FA estava reduzida em tronco cerebral bilateralmente, medula, lobos cerebelares anterior e posterior, tonsila, nódulo, núcleo denteado, fastigium e lingual. A maior redução de FA foi vista em tronco cerebral. Apesar de não existirem estudos avaliando as alterações microestruturais de SB em MJD/SCA3 *in vivo*, nossos resultados estão de acordo com um estudo patológico que demonstrou alterações de SB em cerebelo, tronco cerebral e medula (Rüb et al, 2008).

Sabe-se que outras ataxias como SCA1, SCA2 e SCA7 são causadas por uma expansão de CAG, porém em *loci* gênicos diferentes. Quando comparamos nossos resultados com outras ataxias, nós encontramos algumas similaridades com SCA1, SCA2, SCA6 e SCA7. Alcauter et al avaliaram 9 indivíduos com diagnóstico molecular de SCA7 e SCA9 através de análise de DTI e encontraram redução de FA em SB cerebelar, tronco cerebral, pedúnculos cerebrais e cerebelares, cápsula interna anterior e posterior, corpo caloso e

lobos frontal, temporal e occipital (Alcauter et al, 2011). Outro estudo que avaliou indivíduos com SCA1 demonstrou uma redução de FA nos pedúnculos cerebelares superior, médio e inferior (Prakash, 2009).

Uma redução nos valores de FA pode indicar redução da densidade de mielina dos axônios (Takahashi et al., 2002), alteração de mielina com preservação dos axônios (Gulani et al., 2001; Song et al., 2002) ou degradação das membranas axonais, mielina e axônios (Beaulieu et al., 1996; Pierpaoli et al., 2001).

Nós não encontramos alterações de MD nos pacientes em relação aos controles. FA e MD são os dois parâmetros escalares principais e caracterizam alterações na bainha de mielina e integridade da membrana celular, entretanto essas medidas não são específicas para perda de mielina ou perda axonal. As coordenadas da matriz do tensor podem ser diagonalizadas para que sejam extraídos três autovalores λ_1 , λ_2 , e λ_3 . Através da combinação desses autovalores encontramos dois outros parâmetros, a AD, que segue paralelamente às fibras axonais, e a RD, que é perpendicular às fibras axonais (Rimkus et al., 2011). O aumento nesses valores aparentemente indica perda axonal e desmielinização respectivamente (Wheeler-Kingshott et al., 2009, Song et al., 2002).

Na nossa amostra nós encontramos aumento de AD em tronco cerebral, cerebelo e tálamo. Existem dados na literatura demonstrando um aumento da AD no envelhecimento, porém ainda existem poucos achados com relação a doenças neurodegenerativas. Em relação a outras doenças os dados ainda são contraditórios. Na doença de Alzheimer (DA), por exemplo, um estudo demonstrou aumento de AD em tratos de associação córtico-cortical, tratos interhemisféricos e tratos córtico-espinais (Agosta et al., 2011), e um outro não evidenciou diferenças (Cosottini et al., 2005). Della Nave et al avaliaram pacientes com SCA2 e encontraram aumento de AD em região de tronco (Della Nave et al., 2011).

Até o presente momento não existem dados sobre as alterações de AD em MJD/SCA3, entretanto as alterações em cerebelo e tronco já foram amplamente discutidas e alterações em tálamo já foram encontradas através de outros métodos de análise (Oliveira et al, 2010; D'Abreu et al, 2011). Um estudo realizado com tomografia por emissão de pósitron (PET) utilizando o radiofármaco $[^{11}\text{C}]\text{MP4P}$ revelou redução significativa da atividade da

acetilcolinesterase no tálamo de pacientes com MJD/SCA3 (Hirano et al, 2008). Outro estudo demonstrou alterações de textura nessa região (Oliveira et al., 2011).

Em relação a RD nós encontramos aumento no cerebelo e tronco cerebral mas também em tálamo, SB cerebral e lobos frontal e temporal. Existem evidências de que as alterações em RD estejam associadas a danos na mielina. O aumento de RD encontrado nos lobos frontal e temporal pode estar relacionado às alterações neuropsicológicas descritas em pacientes com MJD/SCA3 (Klinkle et al., 2010; Braga-Neto et al., 2011). Na nossa amostra a RD foi a componente que apresentou maior diferença em relação aos indivíduos controle. Em um estudo realizado com Esclerose Lateral Amiotrófica (Metwalli et al., 2010) e outro com SCA2 (Della Nave et al., 2011) essa componente também foi a mais expressiva. Isso pode ter ocorrido devido a uma maior sensibilidade da RD ao processo neurodegenerativo dessas doenças. Considerando a hipótese de que ela está associada a danos na mielina, podemos especular que na MJD/SCA3 o dano na mielina aconteça antes ou de maneira mais agressiva do que a perda axonal. Isto sugere que o processo degenerativo na MJD/SCA3 afetaria paralelamente a substância branca e substância cinzenta e que a degeneração axonal poderia ocorrer também por lesão miélica e não somente por um processo secundário à perda neuronal (degeneração Walleriana) como é o conceito corrente.

Nós encontramos uma correlação positiva entre os valores de FA da região de ponte e o tempo de duração da doença, entretanto esse resultado pode causar estranheza, visto que esta correlação parece sinalizar que indivíduos com menor duração de doença tenham menores valores de FA. No entanto, vale lembrar que indivíduos jovens, em geral apresentam menor duração de doença, porém quadro mais grave, enquanto pacientes com duração de doença acima de 15 anos, por exemplo, sinalizam quadros mais leves com menor comprometimento clínico (Solodkin et al., 2011).

Nosso estudo em muito contribuiu para um melhor entendimento do acometimento de SB em MJD/SCA3, visto que até então havia poucos dados na literatura em relação às alterações de SB. Um estudo que avaliou 40 indivíduos acometidos com MJD/SCA3 através de espectroscopia demonstrou uma diminuição da relação de N-acetilaspártato (NAA) – creatina (Cr) (NAA/Cr), indicando comprometimento da SB profunda dos

hemisférios cerebrais (D'Abreu et al., 2009). Apesar de esse estudo ter se baseado somente em uma região de interesse, esses achados corroboram os nossos resultados já que evidenciaram um padrão mais difuso de alteração de SB em MJD/SCA3.

Nós também encontramos alterações de SB através de VBM em regiões como lobos cerebelares anterior e posterior, tonsila, medula, tronco cerebral, lóbulo semi-lunar inferior, declive, vérmis, fastigium, úvula, culmen, tuber, giro lingual, pirâmide e núcleo denteado.

Apesar da técnica de VBM ser mais apropriada para analisar alterações de SC, pois a intensidade do sinal T1 não se correlaciona com a integridade de SB, é possível uma avaliação macroestrutural de SB. Lukas et al avaliaram 18 indivíduos com diagnóstico de MJD/SCA3 e encontraram alterações em SB em ponte, região ao redor de núcleo denteado e pedúnculos cerebelares. Outro estudo também avaliou SB em MJD/SCA3 através de VBM e encontrou alterações somente em cerebelo (D'Abreu et al, 2011 [Epub ahead of print]).

Nossa análise demonstrou um número maior de áreas acometidas. Acreditamos que isso tenha ocorrido devido a algumas diferenças metodológicas entre os trabalhos. Nós utilizamos RM de 3T ao passo que estes estudos anteriores utilizaram 1.5T e 2T respectivamente; além de termos utilizado uma versão mais recente do SPM e uma ferramenta específica para cerebelo.

Nós encontramos uma correlação negativa entre densidade de SB em tronco cerebral e os scores das escalas ICARS e SARA. Este achado é de extrema importância, pois demonstra que a escala clínica traduz de forma indireta o grau de acometimento do sistema nervoso central. Se confirmados, estes achados podem eventualmente ser utilizados como marcadores para acompanhamento tanto da progressão da doença, quanto para avaliar possíveis tratamentos.

Assim como encontramos na DTI, encontramos também correlação negativa entre densidade de SB e tempo de duração de doença.

Acreditamos que esse trabalho tem grande relevância, pois conseguimos encontrar importantes alterações de SB que não haviam sido descritas anteriormente, o que pode

mudar o conceito fisiopatológico desta doença. Além disso, encontramos correlações entre as alterações encontradas nas imagens com dados clínicos dos pacientes, Através de uma técnica mais avançada para análise de SB, e de uma análise específica para estruturas infra-tentoriais, confirmamos resultados previamente descritos, porém de uma maneira mais detalhada.

6- CONCLUSÕES

A análise de SB através da técnica de DTI demonstrou alterações de SB em regiões que ainda não descritas em MJD/SCA3. Além disso, encontramos correlações entre as imagens de RM e alguns dados clínicos; esses achados podem contribuir para que se encontre um biomarcador na MJD/SCA3. Em relação a SC, através de uma técnica específica para análise de estruturas infra-tentoriais encontramos dados semelhantes aos descritos anteriormente, porém de maneira mais detalhada.

O presente estudo apresenta informações relevantes sobre alterações microestruturais em SB e macroestruturais em SB e SC na MJD/SCA3. Acreditamos que esses achados contribuam para um melhor entendimento sobre o processo neuropatológico desta doença.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Abe Y, Tanaka F, Matsumoto M, Doyu M, Hirayama M, Kachi T, Sobue G. CAG repeat number correlates with the rate of brainstem and cerebellar atrophy in Machado-Joseph disease. *Neurology* 1998; 51: 882-884.
- 2 Agosta F et al. White Matter damage in frontotemporal lobar degeneration spectrum. *Cereb Cortex* 2011; [Epub ahead of print]
- 3 Alcauter F, Barrios SA, Diaz R, Fernandez-Ruiz J. Gray and white matter alterations in spinocerebellar ataxia type 7: an in vivo DTI and VBM study. *Neuroimage* 2011; 55: 1-7.
- 4 Ashburner J, Friston KJ. Voxel based morphometry: the methods. *Neuroimage* 2000; 11: 805-821.
- 5 Beaulieu C. The basis of anisotropic water diffusion in the nervous system – a technical review. *NMR Biomed.* 2002; 15:435-455.
- 6 Braga - Neto P, et al. Cerebellar Cognitive Affective Syndrome in Machado Joseph Disease: Core Clinical Features. *Cerebellum* 2011; DOI 10.1007/s12311-011-0318-6.
- 7 Camargo S, Marques - Jr W, Santos AC. Brainstem and cerebellum volumetric analysis of Machado Joseph Disease Patients. *Arq Neuropsiquiatr* 2011; 69:292-296.
- 8 Ching-Po L, Wen-Yih I T, Hui-Cheng J-H C. Validation of diffusion tensor magnetic resonances axonal fiber imaging with registered manganese-enhanced optic tracts. *Neuroimage* 2001; 14:1035-1047.
- 9 Cosottini M, et al. Diffusion-tensor MR imaging of corticospinal tract in amyotrophic lateral sclerosis and progressive muscular atrophy. *Radiology* 2005; 237:258–264.
- 10 Coutinho P. História da doença de Machado-Joseph. In: Coutinho P, ed. *Doença de Machado-Joseph: estudo clínico, patológico e epidemiológico de uma doença*

neurológica de origem portuguesa. Porto, Bial editora; 1994: 25-41.

- 11 D'Abreu A, et al. Neocortical Atrophy in Machado-Joseph Disease: A Longitudinal Neuroimaging Study. *J Neuroimaging*. 2011; doi: 10.1111/j.1552-6569.2011.00614.x. [Epub ahead of print]
- 12 D'Abreu A, França MC Jr, Paulson H, Lopes-Cendes I. Caring for Machado Joseph Disease: Current understanding and how to help patients. *Parkinsonism Relat Disord* 2010; 16:2-7.
- 13 D'Abreu A, França Jr M, Appenzeller S, Lopes-Cendes I, Cendes F. Axonal Dysfunction in the Deep White Matter in Machado-Joseph Disease. *J Neuroimaging* 2009; 19:9-12.
- 14 D'Abreu A, Franca M Jr, Lopes-Cendes I, Cendes F. The international cooperative ataxia rating scale in Machado-Joseph disease. Comparison with the unified multiple system atrophy rating scale. *Mov Disord*. 2007; 22:1976-1979.
- 15 Della Nave R, Ginestrone A, Diciotti S, Salvatore E, Soricelli A, Mascalchi M. Axial diffusivity is increased in the degenerating superior cerebellar peduncles of Friedreich's ataxia. *Neuroradiology* 2011; 53: 367-372.
- 16 Diedrichsen J, Balsters J H, Flavell J, Cussans E, & Ramnani N. A probabilistic atlas of the human cerebellum. *Neuroimage* 2009; 46:39-46.
- 17 Diedrichsen J. A spatially unbiased atlas template of the human cerebellum. *Neuroimage* 2006; 33:127-138.
- 18 Engelhardt E, Moreira M D. A substância Branca Cerebral. Localização dos principais feixes com anisotropia fracionada direcional. *Revista Brasileira de Neurologia* 2008; 44: 19-34.
- 19 França MC Jr, D'Abreu A, Friedman JH, Nucci A, Lopes-Cendes I. Chronic pain in Machado-Joseph disease: a frequent and disabling symptom. *Arch Neurol*. 2007; 64:1767-1770.

- 20 França MC Jr, D'Abreu A, Nucci A, Cendes F, Lopes-Cendes I. Prospective study of peripheral neuropathy in Machado Joseph disease. *Muscle Nerve* 2009; 40:1012–1018.
- 21 França MC Jr, D'Abreu A, Nucci A, Lopes-Cendes I. Clinical correlates of autonomic dysfunction in patients with Machado-Joseph disease. *Acta Neurol Scand.* 2010; 121: 422–425.
- 22 França MC Jr, D'Abreu A, Nucci A, Lopes-Cendes I. Muscle excitability abnormalities in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol* 2008; 65:525-529.
- 23 Fujigasaki H, et al. CAG repeat expansion in the TATA box-binding protein gene causes autosomal dominant cerebellar ataxia. *Brain.* 2001; 124: 1939-1947.
- 24 Globas C, du Montcel ST, Baliko L, Boesch S, Depondt C, DiDonato S, et al. Early symptoms in spinocerebellar ataxia type 1, 2, 3, and 6. *Mov Disord.* 2008; 23:2232–8.
- 25 Gulani V, Webb AG, Duncan ID, Lauterbur PC. Apparent diffusion tensor measurements in myelin-deficient rat spinal cords. *Magn Reson Med* 2001; 45:191-5.
- 26 Hirano S, et al. PET Study of Brain Acetylcholinesterase in Cerebellar Degenerative Disorders. *Movem. Disord* 2008; 23: 1154-1160.
- 27 Horimoto Y, Matsumoto M, Yuasa H, Kojima A, Nokura K, Katada E, et al. Brainstem in Machado-Joseph disease: atrophy or small size? *Eur J Neurol* 2008; 15102-15105.
- 28 Ikeda K, Kubota S, Isashiki Y, Eiraku N, Osame M, Nakagawa M. Machado-Joseph disease with retinal degeneration and dementia. *Acta Neurol Scand* 2001; 104:402-405.
- 29 Ishikawa A, Zawacki TM, Grace J, Friedman JH, Sudarsky L. Executive and emotional dysfunction in Machado-Joseph disease. *Mov Disord* 2002; 17: 1004-1010.

- 30 Jacobi H, et al. Spinocerebellar ataxia types 1,2,3 and 6: The clinical spectrum of ataxia and morphometric Brainstem and cerebellar findings. *Cerebellum*. 2011; Epub ahead of print.
- 31 Jardim L B, Pereira ML, Silveira I, et al. A survey of spinocerebellar ataxia in South Brazil: 66 new cases with Machado Joseph Disease, SCA 7, SCA8 or unidentified disease causing mutations. *J Neurol* 2001; 248:870-876.
- 32 Kawai Y, Takeda A, Abe Y, Washimi Y, Tanaja F, Sobue G. Cognitive impairments in Machado-Joseph Disease. *Arch. Neurol* 2004; 61:1757-1760.
- 33 Kawakami H. et al. Unique features of the CAG repeats in Machado-Joseph disease. *Nature Genet* 1995; 9: 344-345.
- 34 Kitamura K, Nakayama K, Kosada S, Yamada E, Shimada H, Miki K, Inoue Y. Diffusion tensor imaging of the cortico-ponto-cerebellar pathway in patients with adult-onset ataxic neurodegenerative disease. *Neuroradiology* 2008; 50:285–292.
- 35 Klinker I, et al. Neuropsychological Features of Patients with Spinocerebellar Ataxia (SCA) Types 1, 2, 3, and 6. *Cerebellum* 2010; 9: 433–442.
- 36 Le BIHAN, D et al. Diffusion Tensor Imaging: Concepts and application. *J Magn Reson Imaging* 2001; 13: 534-546.
- 37 Liang X, Jiang H, Chen C, Zhou G, Wang J, Zhang S, Lei L, Wang X, Tang B. The correlation between magnetic resonance imaging features of the brainstem and cerebellum and clinical features of spinocerebellar ataxia 3/Machado-Joseph disease. *Neurol India* 2009; 57:578-83.
- 38 Little DM, Holloway RG. Diffusion tensor imaging: Scientific advance, clinical tool or just a pretty picture? *Neurology* 2007; 68: 9-10.
- 39 Lopes-Cendes I, et al. Molecular characteristics of Machado-Joseph Disease mutation in 25 newly described Brazilian families. *Braz. J. Genet.* 1997; 20: 712-724.

- 40 Lu M, et al. Movement-related cortical potentials in patients with Machado–Joseph disease. *Clinical Neurophysiology* 1999; 41:496-500.
- 41 Lukas C. Spinalcord atrophy in spinocerebellar ataxia type 3 and 6. *J Neurol* 2008; 255:1244–1249.
- 42 Lukas et al. Dissociation of grey and white matter reduction in spinocerebellar ataxia type 3 and 6: a voxel-based morphometry study. *Neurosci Lett.* 2006; 408:230-5.
- 43 Madden D, Whiting W, Huettel S, White L, MacFall J, Provenzale J. Diffusion tensor imaging of adult age differences in cerebral white matter: relation to response time. *Neuroimage* 2004; 21:1174-1181.
- 44 Mandelli ML, et al, Diffusion tensor imaging of spinocerebellar ataxia types 1 and 2. *Am J Neuroradiol* 2007; 1996-2000.
- 45 Maruyama H, et al. Molecular features of the CAG repeats and clinical manifestation of Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet* 1995; 4:807-812.
- 46 Mechelli A, Price CJ, Friston KJ, Ashburner J. Voxel-Baed Morphometry of the Human Brain: Methods and Applications. *Current Medical Imaging Reviews* 2005; 1: 00-00.
- 47 Melhem ER, et al. Diffusion tensor MR imaging of the human brain. *Radiology* 1996; 201: 637-648.
- 48 Metwalli NS, Benatar M, Nair G, Usher S, Hu X, Carew JD. Utility of axial and radial diffusivity from diffusion tensor MRI as markers of neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res.* 2010; 1348:156-64.
- 49 Moseley ME, et al. Early detection of ischemic injury: comparison of spectroscopy, diffusion-, T2-, and magnetic susceptibility-weighted MRI in cats. *Acta Neurochir* 1990; 51:207-209.

- 50 Münchau A, Dressler D, Bhatia KP, Vogel P, Zühlke C. Machado-Joseph disease presenting as severe generalized dystonia in a German patient. *J Neurol* 1999; 246:840-842.
- 51 Murata Y, Yamaguchi S, Kawakami H, Imon Y, Maruyama H, Sakai T, et al. Characteristic magnetic resonance imaging findings in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol* 1998; 55:33-37.
- 52 Oliveira S, D'Abreu A, França M, Lopes-Cendes I, Cendes F, Castellano G. MRI-Texture analysis of corpus callosum, thalamus, putamem, and caudate in Machado-Joseph disease. *J Neuroimaging* 2010 Dec 1. doi: 10.1111/j.1552-6569.2010.00553.x. [Epub ahead of print].
- 53 Onodera O, Idezuka J, Igarashi S, Takiyama Y, Endo K, Takano H et al. Progressive atrophy of cerebellum and brainstem as a function of age and the size of the expanded CAG repeats in the 1 gene in Machado-Joseph disease. *Ann Neurol* 1998; 43:288-296.
- 54 Pierpaoli C, et al. Diffusion tensor MR imaging of the human brain. *Radiology* 1996; 201:637-648.
- 55 Poupon C, Clark C, Frouin V, Regis J, Bloch I, Le Bihan D, Mangin J-F. Regularization of diffusion-based direction maps for tracking of brain white matter fascicles. *Neuroimage* 2000; 12:184-195.
- 56 Prakash N, Hageman N, Hua X, Toga AW, Perlman SL, Salamon N. Patterns of fractional anisotropy changes in white matter of cerebellar peduncles distinguish spinocerebellar ataxia-1 from multiple system atrophy and other ataxia syndromes. *Neuroimage* 2009; 47 Suppl 2:T72-81.
- 57 Rimkus CdeM, et al. Corpus callosum microstructural changes correlate with cognitive dysfunction in early stages of relapsing-remitting multiple sclerosis: axial and radial diffusivities approach. *Mult Scler Int* 2011; 2011:304875. Epub 2011 Jul 10.

- 58 Rittner L, Lotufo RA. Processamento de imagens de tensores de difusão. *Neurociências e Epilepsia* vol 2 2010; 81-85.
- 59 Romanul FC, Fowler HL, Radyany J, Feldman RG, Feingold M. Azorean Disease of the nervous system. [N Engl J Med.](#) 1977; 296:1505-8
- 60 Rosas HD, Lee SY, Bender AC et al. Altered white matter microstructure in the corpus callosum in Huntington's disease: implications for cortical “disconnection”. *Neuroimage* 2010; 49:2995–3004.
- 61 Rosenberg RN. Machado Joseph disease: an autosomal dominant motor system degeneration. *Mov. Disord* 1992; 7:193-203.
- 62 Rosenberg RN. Machado-Joseph disease: autosomal dominant motor system degeneration. *Mov Disord* 1992; 7:193-203.
- 63 Rüb U, Brunt E R, Deller T. New insights into the pathoanatomy of spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease). *Curr Opin Neurol* 2008; 21:111-116.
- 64 Rueckert D, Sonoda LI, Hayes C, Hill DL, Leach MO, Hawkes DJ. Nongrid registration using free-form deformations: application to breast MR images. *IEEE Trans Med Imaging* 1999; 18:712-721.
- 65 Sakai T, Kawakami H. Machado-Joseph disease: A proposal of spastic paraplegic subtype. *Neurology* 1996; 46:846-847.
- 66 Schmitz-Hübsch et al. Scale for the assessment and rating of ataxia. *Neurology* 2006; 66: 1717–1720.
- 67 Schosch B, et al. Reliability and Validity of ICARS in focal cerebellar lesions. *Mov Disord* 2007; 22: 2162-2169.
- 68 Schoth F, et al. Diffusion-tensor imaging in septo-optic dysplasia. *Neuroradiology* 2004; 46: 759-763.
- 69 Schulz JB, et al. Visualization, quantification and correlation of brain atrophy with

- clinical symptoms in spinocerebellar ataxia types 1, 3 and 6. *Neuroimage* 2010; 49:158-68. Epub 2009 Jul 22.
- 70 Shepherd TM, Ozarslan TM, King MA, Mareci TH, Blackband SJ. Structural insights from high-resolution diffusion tensor imaging and tractography of the isolated rat hippocampus. *Neuroimage* 2006; 32:1499-509.
- 71 Shimohata T, et al. Expanded polyglutamine stretches interact with TAF_{II}130, interfering with CREB-dependent transcription. *Nature Genet* 2000; 26: 29-36.
- 72 Sierra A, Laitinen T, Lehtimaki K, Rieppo L, Pitkanen A, Grohn O. Diffusion tensor MRI with tract-based spatial statistics and histology reveals undiscovered lesion areas in kainate model of epilepsy in rat. *Brain Struct Funct* 2011; 216:123-35.
- 73 Smith S.M, et al. Tract-based spatial statistics: Voxelwise analysis of multi-subject diffusion data. *Neuroimage* 2006; 31:1487-1505.
- 74 Solodkin A, Peri E, Chen E, Bem-Jacob E, Gomez C. Loss of Intrinsic Organization of Cerebellar Networks in Spinocerebellar Ataxia Type 1: Correlates with Disease Severity and Duration. *Cerebellum* 2011; 10:218-232.
- 75 Song SK, Sun SW, Ramsbottom MJ, Chang C, Russel J, Cross AH. Dysmyelination revealed through MRI as increased radial (but unchanged axial) diffusion of water. *Neuroimage* 2002; 17:1429-36.
- 76 Sotak CH. Nuclear magnetic resonance (NMR) measurement of the apparent diffusion coefficient (ADC) of tissue water and its relationship to cell volume changes in pathological states. *Neurochem Int* 2004; 45: 569-582.
- 77 Storey E. Dominant inherited ataxias. Part II. *J. Clin. Neurosc* 1998; 5: 369-377.
- 78 Sutherland G R, Richards R I. Simple tandem DNA repeats and human genetic diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1995; 92: 3636-3641.

- 79 Takahashi M et al. Magnetic Resonance Microimaging of intraaxonal water diffusion in live excised lamprey spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:16192-6.
- 80 Takiyama Y et al. Evidence for inter-generational instability in the CAG repeat in the MJD 1 gene and for conserved haplotypes at flanking markers amongst Japanese and Caucasian subjects with Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 1137-1146.
- 81 Taoka T, et al. Diffusivity and diffusion anisotropy of cerebellar peduncles in cases of spinocerebellar degenerative disease. *Neuroimage* 2007; 37: 387-397.
- 82 Teive HA, Iwamoto FM, Camargo CH, Lopes-Cendes I, Werneck LC. Machado-Joseph disease versus hereditary spastic paraplegia: case report. *Arq Neuropsiquiatr* 2001; 59:809-11.
- 83 Weyer A, et al. Reliability and validity of the Scale for the assessment and rating of ataxia: a study in 64 ataxia patients. *Mov Disord* 2007; 22: 1633-1637.
- 84 Wheeler-Kingshott CA, Cercignani M. About "axial" and "radial" diffusivities. *Magn Reson Med* 2009; 61:1255-60.
- 85 Whitwell JL. Voxel-based morphometry: an automate technique for assessing structural changes in the brain. *J Neurosci* 2009; 29: 9661-9664.
- 86 Widjaja E, *et al.* Evaluation of Subcortical White Matter and Deep White Matter Tracts in Malformations of Cortical Development. *Epilepsia* 2007; 48:1460-9.
- 87 Yasuda CL, Betting LE, Cendes F. Voxel based morphometry and epilepsy. *Expert Rev. Neurother* 2010; 10: 975-984.
- 88 Zhang Y. et al. Diffusion tensor imaging of cingulum fibers in mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Neurology* 2007; 68: 13-19.
- 89 Zhou et al. Related factors of ICARS and SARA scores on spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease. *Journal of Central South University* 2011; 06:498-

503.

- 90 Zoghbi H Y, Orr H T. Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annurev Neuro* 2000; 23: 217-247.
- 91 Diedrichsen, Maderwald S, Küper M, Thürling M, Rabe K, Gizewski ER, Ladd M, Timmann D (under review). Imaging the deep cerebellar nuclei: A probabilistic atlas and normalization procedure. *Neuroimage* 2011; 54(3):1786-94.

8- ANEXOS

Anexo 1

ICARS

DATA:

I) Postura e distúrbios de marcha

1) Capacidade de caminhar

0= normal

1= normal, mas incapacidade de andar em posição tandem

2= anda sem apoio, mas claramente anormal e irregular

3= anda sem apoio, mas com considerável titubeio; dificuldades em meia-volta

4= caminhada com suporte autônomo impossível; paciente usa esporadicamente a parede para o teste de 10-metros

5= necessita de bengala

6= necessita de suporte com pelo menos duas bases de apoio

7= anda somente com acompanhante

8= uso restrito de cadeira de rodas

Score_____

2) Velocidade de caminhada

(pacientes com scores 4 ou mais no quesito anterior automaticamente recebem score 4 neste teste)

0= normal

1= levemente reduzida

2= moderadamente reduzida

3= extremamente lenta

4= caminhada com suporte autônomo impossível

Score_____

3) Capacidade de manter-se em pé, olhos abertos

0= normal, paciente consegue se apoiar em um pé só por mais de 10 segundos

1= capaz de se equilibrar posição pé ante pé, mas não em um pé só por 10 segundos

2= capaz de se equilibrar com pés juntos, mas não em pé-antepé

3= incapaz de se equilibrar com pés juntos, mas capaz de se equilibrar em posição natural, sem suporte, sem ou com titubeio moderado

4= capaz de se equilibrar em posição natural, sem suporte, com titubeio significativo e muitas correções de postura.

5= incapaz de se equilibrar em posição natural sem apoio considerável em um braço.

6= incapaz de manter-se de pé, mesmo com suporte em ambos os braços.

Score_____

4) Em pé em posição natural sem suporte, olhos abertos

0= normal (<10 centímetros)

1= base levemente alargada (>10 cm)

2= base claramente alargada (25 cm<base<35 cm)

3= base>35 cm

4= incapaz de se equilibrar em posição natural

Score_____

5) Astasia com pés juntos, olhos abertos

0= normal

1= poucas oscilações

2= oscilações moderadas (<10 cm ao nível da cabeça)

3= oscilações severas (>10 cm ao nível da cabeça)

4= queda imediata

Score_____

6) Astasia com pés juntos, olhos fechados

0= normal

1= poucas oscilações

2= oscilações moderadas (<10 cm ao nível da cabeça)

3= oscilações severas (>10 cm ao nível da cabeça)

4= queda imediata

Score_____

7) Qualidade da posição sentada

0= normal

1= pequenas oscilações do tronco

2= moderadas oscilações do tronco e pernas

3= desequilíbrio severo

4= impossível

Score_____

SCORE ESTÁTICO_____/34

II) Funções cinéticas

8) Teste calcâneo-tíbia (decomposição de movimento e tremor intencional)

0= normal

1= movimento do calcanhar em realizado em eixo contínuo, mas aquele é decomposto em diversas fases, sem movimentos anormais ou em baixa velocidade.

2= movimento irregular no eixo

3= movimento irregular com deslocamentos laterais

4= movimentos laterais extremos ou impossíveis de realizar teste

Score(D)_____

Score (E)_____

9) Tremor de ação no teste calcâneo joelho

0= sem problemas

1= tremor pára imediatamente quando calcanhar atinge o joelho

2= tremor pára <10 segundos após alcançar o joelho

3= tremor continua >10 segundos ao alcançar o joelho

4= tremor ininterrupto ou impossível realizar teste.

Score(D)_____

Score (E)_____

10) Teste índex-naso: decomposição e dismetria

0= sem problemas

1= oscilação do movimento sem decomposição do mesmo

2= movimento segmentado em duas fases e/ou dismetria moderada ao atingir nariz

3= movimento segmentado em duas fases e/ou dismetria severa ao atingir nariz

4= dismetria impede que paciente atinja nariz

Score(D)_____

Score (E)_____

11) Teste index-naso: tremor intencional do dedo

0= sem problemas

1= mínima instabilidade do movimento

2= tremor moderado com amplitude estimada <10 cm

3= tremor com amplitude estimada entre 10 e 40 cm

4= tremor com amplitude estimada >40 cm

Score(D)_____

Score (E)_____

12) Teste dedo-dedo (tremor de ação e/ou instabilidade)

0= normal

1= instabilidade mínima

2= moderadas oscilações dos dedos com amplitude < 10 cm

3= oscilações consideráveis com amplitude entre 10 e 40 cm.

4= movimentos com amplitude >40 cm

Score(D)_____

Score (E)_____

13) Movimentos alternados: supinação e pronação (teste de disdiadococinesia)

0= normal

1= pequena diminuição de velocidade e regularidade

2= claramente irregular, lento, mas sem movimentação do cotovelo

3= extremamente irregular e lento, com movimentação do cotovelo

4= movimento completamente desorganizado ou impossível avaliação

Score(D)_____

Score (E)_____

14) Espiral de Arquimedes.

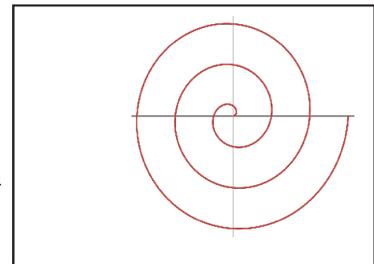
0= normal

1= decomposição, a linha sai do padrão minimamente, mas não há hipermetria

2= linha fora do padrão, com cruzamentos e hipermetria

3= distúrbio severo, com hipermetria e decomposição

4= desorganizado ou impossível de ser realizado



Score_____

SCORE CINÉTICO____/52

III) Fala

15) Fluência

0= normal

1= mínima modificação de fluência

2= moderada modificação de fluência

3= fala lenta com disartria

4= sem fala

Score_____

16) Clareza da fala

0= normal

1= mínima diminuição da clareza

2= claramente anormal, maioria das palavras são inteligíveis

3= palavras não inteligíveis

4= sem fala

Score_____

SCORE DISATRIA____/8

IV) Disordens oculomotoras

17) Nistagmo induzido pelo olhar

0= normal

1= transitório

2= persistente, mas moderado

3= persistente e severo

Score_____

18) Anormalidades de movimentos de seguimento

0= normal

1= mínimo sacadas

2= claramente sacadas

Score_____

19) Dismetria de sacadas

0= ausente

1=Hipermetria/hipometria bilateral de sacadas

Score_____

SCORE OCULOMOTOR____/6

Score total:____/100

Anexo 2

Examinador :

Paciente :

Data:

Escala para avaliação e graduação de ataxia (SARA)

1) Marcha

O paciente é solicitado (1) a andar em uma distância segura paralela a uma parede e dar uma meia-volta (meia volta para direção oposta da marcha) e (2) andar pé-ante-pé sem apoio.

0 Normal, sem dificuldade para andar, virar-se ou andar na posição pé-ante-pé (até um erro aceito)

1 Discretas dificuldades, somente visíveis quando anda 10 passos consecutivos na posição pé-ante-pé

2 Claramente anormal, marcha na posição pé-ante-pé impossível com 10 ou mais passos

3 Consideravelmente cambaleante, dificuldades na meia-volta, mas ainda sem apoio

4 Marcadamente cambaleante, necessitando de apoio intermitente da parede

5 Gravemente cambaleante, apoio permanente com uma bengala ou apoio leve de um braço

6 Marcha > 10 m somente possível com apoio forte (2 bengalas especiais ou um andador ou um acompanhante)

7 Marcha < 10 m somente possível com apoio forte (2 bengalas especiais ou um andador ou um acompanhante)

8 Incapaz de andar mesmo com apoio

Pontuação:

2) Postura

O paciente é solicitado a permanecer (1) na posição natural, (2) com os pés juntos e em paralelo (dedões juntos) e (3) em pé-ante-pé (ambos os pés em uma linha, sem espaço entre os tornozelos e os dedos). Deve-se retirar os sapatos e olhos permanecerem abertos. Para cada condição, três tentativas são permitidas. A melhor resposta é considerada.

0 Normal, consegue permanecer em pé na posição pé-ante-pé por > 10 s

1 Capaz de permanecer em pé com os pés juntos sem desvios, mas não na posição de pé-ante-pé por >10 s

2 Capaz de permanecer em pé com os pés juntos por >10 s, mas somente com desvios

3 Capaz de permanecer em pé por > 10 s sem apoio na posição natural, mas não com os pés juntos

4 Capaz de permanecer em pé por > 10 s na posição natural somente com apoio intermitente

5 Capaz de permanecer em pé por >10 s na posição natural somente com apoio constante de um braço

6 Incapaz de permanecer em pé por > 10 s mesmo com apoio constante de um braço

Pontuação:

3) Sentar

O paciente é solicitado a sentar na cama de exame sem apoio dos pés, olhos abertos e braços esticados na frente.

- 0 Normal, sem dificuldades em sentar > 10 s
- 1 Discretas dificuldades, desvios leves
- 2 Desvios constantes, mas capaz de sentar > 10 s sem apoio
- 3 Capaz de sentar > 10 s somente com apoio intermitente
- 4 Incapaz de sentar > 10 s sem um apoio constante

Pontuação:

4) Distúrbios da fala

A fala é avaliada durante uma conversação normal

- 0 Normal
- 1 Sugestivo de alteração na fala
- 2 Alteração na fala, mas fácil de entender
- 3 Ocasionalmente palavras difíceis de entender
- 4 Muitas palavras difíceis de entender
- 5 Somente palavras isoladas compreensíveis
- 6 Fala ininteligível / anartria

Pontuação:

5) Teste de perseguição do dedo

Cada lado avaliado isoladamente

O paciente permanece confortavelmente sentado. Se necessário, é permitido o apoio dos pés e do tronco. O examinador senta em frente do paciente e realizar 5 movimentos consecutivos inesperados e rápidos de apontar em um plano frontal, a mais ou menos 50% do alcance do paciente. Os movimentos deverão ter uma amplitude de 30 cm e uma frequência de 1 movimento a cada 2 segundos. O paciente é solicitado a seguir os movimentos com o índice, o mais preciso e rápido possível. É considerada a execução dos 3 últimos movimentos.

0 Ausência de dismetria

1 Dismetria, não atingir ou ultrapassar o alvo < 5 cm

2 Dismetria, não atingir ou ultrapassar o alvo < 15 cm

3 Dismetria, não atingir ou ultrapassar o alvo > 15 cm

4 Incapaz de realizar os 5 movimentos

Pontuação direito: Pontuação esquerdo:

Média dos dois lados (D + E / 2):

6) Teste index-nariz

Cada lado avaliado isoladamente

O paciente permanece confortavelmente sentado. Se necessário, é permitido o apoio dos pés e do tronco. É solicitado que o paciente aponte repetidamente seu índice em seu nariz para o dedo do examinador, que esta a cerca de 90% do alcance do paciente. Os movimentos são realizados a uma velocidade moderada. A execução do movimento é graduada de acordo com a amplitude do tremor de ação.

0 Ausência de tremor

1 Tremor com uma amplitude < 2 cm

2 Tremor com uma amplitude < 5 cm

3 Tremor com uma amplitude > 5 cm

4 Incapaz de realizar os 5 movimentos

Pontuação direito: Pontuação esquerdo:

Média dos dois lados (D + E /2):

7) Movimentos alternados e rápidos das mãos

Cada lado avaliado isoladamente

O paciente deve permanecer confortavelmente sentado. Se necessário, é permitido o apoio dos pés e do tronco. É solicitado que o paciente realize 10 ciclos com alternância pronação e supinação em suas coxas o mais rápido e preciso possível. O movimento é demonstrado ao paciente há aproximadamente 10 ciclos em 7 segundos. O tempo exato para execução do movimento deverá ser obtido.

0 Normal, sem irregularidades (realiza <10s)

1 Discretamente irregular (realiza <10s)

2 Claramente irregular, difícil de distinguir movimentos individuais ou interrupções relevantes, mas realiza <10 s

3 Muito irregular, difícil de distinguir movimentos individuais ou interrupções relevantes, realiza >10s

4 Incapaz de completar 10 ciclos

Pontuação direito: Pontuação esquerdo:

Média dos dois lados (D + E /2):

8) Manobra calcânhar Joelho

Cada lado avaliado isoladamente

O paciente deita na cama de exame, sem conseguir visualizar suas pernas. É solicitado que levante uma perna, aponte com o calcânhar no outro joelho, deslize pela tíbia até o tornozelo e retorne a perna em repouso na cama. A tarefa é realizada 3 vezes. O movimento de deslizamento deverá ser feito em 1 s. Se o paciente deslizar sem o contato com a tíbia em todas as três tentativas, gradue como 4.

0 Normal

1 Discretamente anormal, contato com a tíbia mantido

2 Claramente anormal, saída da tíbia mais do que 3 vezes durante 3 ciclos

3 Gravemente anormal, saída da tíbia 4 ou mais vezes durante 3 ciclos

4 Incapaz de realizar a tarefa

Pontuação direito: Pontuação esquerdo:

Média dos dois lados (D + E /2):

TOTAL:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, Página 1 de 3

Título do projeto: **Avaliação das escalas ICARS (*International Cooperative Ataxia Rating Scale*) e SARA (*Scale for the Assessment of Rating Ataxia*) e suas correlações com exames de ressonância magnética na doença de Machado-Joseph**

Investigador principal: Rachel Paes Guimarães

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu _____ entendo que fui convidado (a) a participar em um projeto de pesquisa envolvendo pacientes com doença de Machado Joseph. O objetivo geral do estudo é o de avaliar a progressão da doença através de exames clínicos e de imagem. A identificação e quantificação dessa progressão da doença pode levar a um melhor conhecimento sobre ela e pode, eventualmente levar a uma melhora no tratamento. As informações médicas a meu respeito que forem obtidas para esse estudo, poderão ser compartilhadas com outros pesquisadores. Podendo assim ser utilizadas eventualmente para outros fins de pesquisa sobre a doença de Machado Joseph ou outras ataxias. O sigilo será mantido em todos os estudos colaborativos através da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes.

A ressonância magnética é uma técnica capaz de produzir imagens de alta qualidade e resolução (nitidez) anatômica, assim como informações sobre os tecidos. A ressonância magnética produz imagens em cortes que são parecidos com as imagens produzidas pela tomografia computadorizada, porém com maior resolução (nitidez) e sem a exposição aos raios X. Essas imagens também poderão produzir informações que serão úteis para melhor definição do diagnóstico e tratamento. O objetivo principal desse estudo é determinar a importância dessas informações.

PROCEDIMENTO:

Eu entendo que se concordar em participar desse estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos meus antecedentes médicos e de minha família. Eu serei submetido a um exame físico neurológico para estabelecer meu estado clínico, além dos exames de ressonância magnética. Hospitalização não será necessária.

O procedimento de ressonância magnética é semelhante a uma tomografia. Eu fui informado que eu serei colocado em uma maca e serei movido lentamente para dentro do aparelho de ressonância magnética. Um alto falante dentro do campo magnético possibilita a minha constante comunicação com as pessoas responsáveis pelo exame. Durante todo o tempo o pessoal médico e paramédico pode me ver e ouvir, e eu posso ser removido(a) se for preciso; por exemplo, se durante o exame eu me sentir mal ou com claustrofobia. O procedimento pode durar entre 45 a 60 minutos. Durante a primeira parte do exame eu irei ouvir ruídos, tipo marteladas, por alguns minutos enquanto o aparelho faz as imagens do meu cérebro. O restante do exame será relativamente silencioso.

VANTAGENS:

Eu entendo que não obterei nenhuma vantagem direta com a minha participação nesse estudo e que o meu diagnóstico e o meu tratamento provavelmente não serão modificados. Contudo, os resultados desse estudo podem, a longo prazo, oferecer vantagens para os indivíduos com doença de Machado Joseph, possibilitando um melhor diagnóstico e futuramente um tratamento mais adequado. Os resultados do meu exame de ressonância magnética ficarão a disposição dos médicos responsáveis pelo meu tratamento, e poderão ser úteis no futuro.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, *Página 2 de 3*

Título do projeto: **Avaliação das escalas ICARS (*International Cooperative Ataxia Rating Scale*) e SARA (*Scale for the Assessment of Rating Ataxia*) e suas correlações com exames de ressonância magnética na doença de Machado-Joseph**

Investigador principal: Rachel Paes Guimarães

RISCO E DESCONFORTO:

O único desconforto relacionado a este exame é o ruído intermitente durante os primeiros 15 minutos. Depois disso o ruído será muito menor. O pessoal técnico providenciará tapa-ouvidos para me deixar mais confortável.

Uma das principais vantagens da ressonância magnética é que esta não utiliza raios X ou outro tipo de radiação ionizante, ao contrário de outros tipos de exame radiológicos. As imagens são obtidas graças a um campo magnético (ímã), um transmissor e receptor de ondas de rádio e um computador que é utilizado para obter as informações bioquímicas e imagens da anatomia interna. Não existem efeitos nocivos associados com a ressonância magnética dentro das condições utilizadas atualmente.

REQUERIMENTOS

É **muito importante** informar aos médicos(as) e técnicos(as) caso eu tenha um **marca-passo cardíaco, um clipe de cirurgia para aneurisma cerebral ou qualquer outro objeto metálico em meu corpo**, que tenha sido implantado durante uma cirurgia ou alojado em meu corpo durante um acidente, pois estes podem parar de funcionar ou causar acidentes devido ao forte campo magnético que funciona como um ímã muito forte. Eu também devo remover todos os objetos metálicos que estiverem comigo (relógio, canetas, brincos, colares, anéis, etc), pois estes também podem movimentar ou aquecer dentro do campo magnético.

SIGILO:

Eu entendo que todas as informações médicas decorrentes desse projeto de pesquisa farão parte do meu prontuário médico e serão submetidos aos regulamentos do HC-UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado.

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Eu entendo que posso requisitar informações adicionais relativas ao estudo a qualquer momento. **A Rachel Guimarães, tel (19) 8111-7279 estará disponível para responder minhas questões e preocupações. Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP, tel. (19) 3521-8936.**

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

Eu entendo que a minha participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar ou retirar meu consentimento e interromper a minha participação no estudo a qualquer momento sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no futuro no HC- UNICAMP.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, *Página 3 de 3*

Título do projeto: **Avaliação das escalas ICARS (*International Cooperative Ataxia Rating Scale*) e SARA (*Scale for the Assessment of Rating Ataxia*) e suas correlações com exames de ressonância magnética na doença de Machado-Joseph**

Investigador principal: Rachel Paes Guimarães

Eu _____ confirmo _____ que _____ o(a)
Dr(a). _____

me explicou o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido e os riscos, desconforto e possíveis vantagens advindas desse projeto de pesquisa. Eu li e compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar desse estudo.

Nome do participante ou responsável

Assinatura do participante ou responsável _____ data

Nome da testemunha

Assinatura da testemunha _____ data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a _____ o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Nome do pesquisador ou associado

Assinatura do pesquisador ou associado _____ data