



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

Paula Christina de Azevedo

**Avaliação cerebelar por morfometria baseada em
voxel (VBM) e correlação entre marcadores clínicos
e achados da ultrassonografia transcraniana em
indivíduos com Doença de Huntington**

**CAMPINAS
2015**

Paula Christina de Azevedo

**Avaliação cerebelar por morfometria baseada em voxel
(VBM) e correlação entre marcadores clínicos e achados
da ultrassonografia transcraniana em indivíduos com
Doença de Huntington**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do título de Mestra em
Ciências Médicas, área de concentração em
Neurologia.**

**ORIENTADORA: Dra. Anelyssa Cysne Frota D'Abreu;
COORIENTADORA: Prof. Dra. Íscia Teresinha Lopes Cendes.**

Este exemplar corresponde à versão
final da dissertação defendida pela
aluna Paula Christina de Azevedo, e orientada pela
Dra. **Anelyssa Cysne Frota D'Abreu.**

**CAMPINAS
2015**

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

Azevedo, Paula Christina de, 1984-
Az25a Avaliação cerebelar por morfometria baseada em voxel (VBM) e correlação entre marcadores clínicos e achados de ultrassonografia transcraniana em indivíduos com doença de Huntington / Paula Christina de Azevedo. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Anelyssa Cysne Frota D'Abreu.
Coorientador: Íscia Teresinha Lopes-Cendes.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Doença de Huntington. 2. Neuroimagem. 3. Cerebelo. I. D'Abreu, Anelyssa Cysne Frota. II. Lopes-Cendes, Íscia Teresinha. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of cerebellar damage and correlation between clinical and transcranial ultrasound findings in individuals with Huntington's disease : a voxel based morphometry study

Palavras-chave em inglês:

Huntington disease

Neuroimaging

Cerebellum

Área de concentração: Neurologia

Titulação: Mestra em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Anelyssa Cysne Frota D'Abreu [Orientador]

Ana Carolina Coan

José Luiz Pedroso

Data de defesa: 18-12-2015

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

PAULA CHRISTINA DE AZEVEDO

ORIENTADOR: DRA. ANELYSSA CYSNE FROTA D'ABREU

COORIENTADOR: PROF. DRA. ÍSCIA TERESINHA LOPES CENDES

MEMBROS:

1. DRA. ANELYSSA CYSNE FROTA D'ABREU

2. PROF. DRA. ANA CAROLINA COAN

3. DR. JOSÉ LUIZ PEDROSO

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas – área de concentração Neurologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: DATA DA DEFESA [18/12/2015]

DEDICO ESTE TRABALHO

Ao Thiago, por me amar de maneira tão caridosa, sincera e única. Por todo o suporte, carinho, paciência e companheirismo.

A minha mãe Angela, por seu amor incondicional, pelo seu exemplo de força, por me ensinar a ter fé em meio às tempestades e pelo seu colo.

A minha irmã Mariana, por iluminar meus dias com sua alegria e pelo seu amor dedicado.

Ao João, por ser meu pai de coração, por compartilhar os momentos mais importantes e pelo exemplo de caráter.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes, por aceitarem participar da minha pesquisa, pela ajuda essencial, por dividirem comigo seus medos, angústias, alegrias e conquistas, e por terem confiado sua saúde a mim.

A toda minha família (tios, tias, primos, primas, avôs, avós e agregados), em especial minha avó Wilma e meu avô Antônio, por sempre me apoiarem, por acreditarem em mim e por encherem minha vida de felicidade e de carinho. Por fazerem sentir-me querida mesmo de tão longe.

À Rose, Gislaine, Giselle, Tati, Marina, Richard e a querida Julia, minha segunda família, pelo acolhimento, amor e cuidado.

Aos meus amigos e colegas, por cada sorriso, abraço, carinho, apoio, palavras solidárias, votos de confiança e por entenderem minha ausência em tantos momentos.

À Casa do Estudante e à EMESCAM que fomentaram em mim o prazer de estudar e de aprender.

As minhas queridas Lidiane (Lili) e Luiza (Lulu), amigas-irmãs, colegas neurologistas e também especialistas em Movimento, por tudo...pelas risadas, viagens, lágrimas, colos, conversas, sessões de terapia, encontros das meninas superpoderosas, pelas descobertas gastronômicas em meio às tormentas (sorvete com amarula – para as iniciadas!) e por tantas outras coisas não ditas, apenas sentidas. A não menos querida Juliana (Ju), a neurocirurgiã do grupo, um dos presentes dessa pós-graduação em minha vida, por seu otimismo, sua amizade, pelos jantares de menininhas, pelas viagens (por colocar 4 em um quarto que seria para 1!), por colocar-se próxima e disponível, e por sua sinceridade.

Ao “*Movement Disorders Team*” – nosso apelido carinhoso para o grupo, um grupo composto só de mulheres, que incrivelmente nunca brigaram entre si, que respeitam os momentos de “TPM” alheios, que se divertem trabalhando juntas e que tornam leve a rotina. À querida amiga Dra. Rachel P. Guimarães, a fisioterapeuta do grupo, que me ensinou a técnica SUIT de forma paciente, cuidadosa e capacitada, por todas as risadas e brincadeiras (melhor nem citar, né?!), que orgulho te chamar de doutora! A nossa querida enfermeira, especializada em pesquisa, a Fernanda, por cada sábado de recrutamento, por

seu vasto conhecimento científico, por seu olhar e por sua postura generosos e maternos, cuidando sempre de todas essas meninas destrambelhadas. À Giordanna, Camila, Cris e Larissa, por tornarem a jornada mais agradável e pela preciosa ajuda em tantos momentos.

As minhas outras queridas amigas tão essenciais em minha vida e nessa trajetória da pós-graduação: a Adriana, por ser minha irmã mais velha, meu “porto seguro” campineiro, por me alegrar com suas gargalhadas, por me ensinar o que é importante, pela paciência, por me ouvir tão parcimoniosamente, por seu amor fraternal e por ser responsável por duas fofuras que alegam minha vida (Pedrão e Juju); à Ana Paula, outra irmã mais velha, por me encontrar e por compartilharmos mutuamente de tantos sentimentos, valores e impressões em comum, por ser uma capixaba em Campinas, por me ensinar o que é alteridade e pelos desdobramentos disso; à Carol, mais uma irmã mais velha, por todo seu apoio, amor, carinho, cuidado, viagens (*“Formentera feelings”*), encontros de menininhas, fotos, espumantes divididos, piqueniques em lugares inusitados, pelos presentes de gêmeas, por ter sido também uma capixaba em Campinas e por tantas palavras tocantes. Agradeço todos os dias por ser a irmã caçula de vocês!

À Camila, pela amizade fiel, disponibilidade, torcida, carinho, orações e por me ajudar a “tomar conta” da minha querida mãe.

As minhas vizinhas-amigas: Rô, Dani, Laurinha e Anna Paula, que se tornaram amigas-vizinhas, por acolherem de maneira tão carinhosa uma capixaba desconhecida, perdida e longe do mar aqui em Campinas, por me alimentarem não só de comida, mas também de amor. Que bom tê-las por perto!

À Ana, minha querida professora de inglês, por me auxiliar da melhor forma a cada aula, por me estimular a aprender e a aperfeiçoar cada dia mais, pelas correções, pelos conselhos e pelas palavras de apoio. Sempre gostei de estudar inglês, mas com você é tudo mais fácil!

Ao Prof. Dr. Marcelo Ramos Muniz, por ser meu mentor em Neurologia, por seu caráter, por sua confiança em mim, seu estímulo e suas palavras de sabedoria em tantos momentos, mas principalmente pelo privilégio de sua amizade verdadeira, que enriquece minha vida de coisas boas.

Ao departamento de Neurologia da Universidade Estadual de Campinas,

seus docentes (aposentados e atuantes), médicos assistentes, residentes, enfermeiros, técnicos de enfermagem, funcionários administrativos e multidisciplinares, por me ajudarem, cada um a seu jeito, nessa empreitada e por me ensinarem muito mais do que conhecimento técnico.

Aos funcionários, colegas e amigos, médicos e não médicos, do Hospital Dia da Universidade Estadual de Campinas, por todo o apoio, pelas palavras e gestos maternais, pelo cuidado, pela boa convivência, pelo bom trabalho, pela confiança e pelos sorrisos acolhedores de todos os dias, vocês fazem diferença em minha vida.

Às biomédicas do setor da ressonância magnética do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, por cada sábado de pesquisa em que vocês me ajudaram de forma tão amigável e paciente.

À Prof. Dra. Clarissa Dantas e à querida amiga Eliza Tamashiro, ambas do Departamento de Psiquiatria da Universidade Estadual de Campinas, pelas ricas contribuições psiquiátricas nesse percurso.

Ao amigo e exímio neurorradiologista Dr. Augusto C. Amato Filho, que laudou “cegamente” todos os exames dos pacientes da minha pesquisa, por sua dedicação, pela sua disposição, pelas reuniões e risadas semanais, por sua linda família, por sua amizade e pela confiança.

Ao Prof. Dr. Marcondes C. França Jr, pela amizade, por sua humildade, por também acreditar em mim, por me ensinar a Neurologia de forma tão leve e cativante a cada encontro, pela ajuda em tantos momentos da pós-graduação e pelas correções e sugestões tão valiosas em minha banca de qualificação.

Ao Prof. Dr. Fernando Cendes, por todos os ensinamentos, por todas as oportunidades, pela confiança, pela disponibilidade de sempre, por sanar todas as minhas dúvidas médicas e não médicas quando necessito, pelas trocas de plantões, por me permitir trabalhar no Laboratório de Neuroimagem, por sua índole apaziguadora e por sua competência.

A todos do ambulatório de Neurogenética, por me auxiliarem em tantos momentos e pela torcida.

À Prof. Dra. Cláudia Maurer Morelli, um dos valiosos presentes que a Neurogenética me proporcionou, por sua disponibilidade, por me ensinar de forma simples e capacitada, tornando leve a árdua tarefa de aprender Neurogenética, por suas correções enriquecedoras em minha banca de qualificação, por sua amizade, por seus conselhos, mas principalmente por sua percepção maternal em dias bons e ruins, que tanto me tocaram.

À Prof. Dra. Íscia Lopes-Cendes, minha coorientadora, nossa chefe da Neurogenética e mais um presente que a vida me deu. Professora, que privilégio e que orgulho de ser sua aluna! Muito obrigada por me ensinar tanto e dessa forma suave, completa e acolhedora, por todas as oportunidades, por sua serenidade, por seus conselhos e sorrisos maternais, por sua capacidade de aliviar e facilitar o cuidado de inúmeros pacientes terminais em um ambulatório tão intenso e por me fazer reconhecer o meu valor e a minha função como neurologista diante de doenças incuráveis.

À Dra. Anelyssa D'Abreu, minha orientadora e nossa chefe do ambulatório de Distúrbios de Movimento. Ane! Muito obrigada por me orientar de forma tão profissional, correta, maternal, preocupada, envolvida, didática e competente, por estar presente em todos os momentos mesmo quando longe, por ter sido sempre pontual e rápida em suas correções, por ter me ajudado a superar todos os obstáculos, por ter sempre uma solução para tudo, por também ter me confiado seus ambulatórios, juntamente com a Lulu, durante sua ausência, e por mostrar a cada dia que todos somos capazes, principalmente através do seu exemplo de vida.

Admiro-te por sua inteligência, por sua determinação, por sua disciplina, por seu carinho com todos a sua volta, por sua paciência com suas alunas, mesmo quando “damos trabalho”, e, principalmente, porque além de dar conta de tudo isso, você consegue educar da forma mais completa possível esses 3 fofinhos amados que são o Bruno, o Caio e a Sofia. Orgulho de ser sua aluna!

Aos que não se encontraram nas palavras acima, não foi proposital, a emoção desse momento pode ter traído a minha memória. Entretanto, mais importante que estar em uma descrição de um documento que um dia ficará amarelado ou esquecido, vocês estão para sempre em meu sistema límbico (piada de neurologista!)/meu coração...

O meu muito obrigada a todos!

"I have drawn your attention to this form of chorea, gentlemen, not that I consider it of any great practical importance to you, but merely as a medical curiosity, and as such it may have been of interest."

George Huntington, 1872

RESUMO

A Doença de Huntington (DH) é uma doença neurodegenerativa, autossômica dominante. Seus principais sintomas são manifestações motoras, cognitivas e psiquiátricas. O diagnóstico confirmatório é feito através da identificação da mutação, quando um número superior a 36 repetições de triplete CAG é encontrada em heterozigose. O objetivo do presente estudo é avaliar as alterações cerebrais existentes na DH através de duas técnicas de neuroimagem: a) a ferramenta “*spatially unbiased atlas template*” (SUIT) para a morfometria baseada em voxels (VBM) na ressonância magnética (RM) e b) a ultrassonografia transcraniana (UTC) do núcleo caudado, da rafe mesencefálica e da SN. Em especial, concentramos nossas análises nas estruturas cerebelares, uma vez que poucos dados são disponíveis sobre o seu envolvimento na DH. Foram selecionados 26 pacientes com confirmação molecular para DH que foram submetidos a avaliações neurológica, cognitiva e psiquiátrica, RM e de UTC, e pareados a 26 controles saudáveis. Utilizando o SUIT, nós identificamos aumento de substância cinzenta (SC) na porção anterior do cerebelo comparado aos controles. As alterações relacionadas ao escore de humor estão localizadas no lobo póstero-superior, as do escore motor na porção central do lobo póstero-inferior e na porção lateral à direita do lobo póstero-superior, e, as do escore cognitivo na parte lateral esquerda do lobo póstero-inferior. As regiões cerebelares citadas são responsáveis pela integração sensório-motora, planejamentos motor e visuoespacial e processamento afetivo. Não encontramos significância estatística nos dados relacionados à UTC. Como todas essas funções são afetadas pela DH, acreditamos que nossos achados contribuam para um melhor entendimento sobre a fisiopatologia da DH e sobre o papel cerebelar na mesma.

Palavras-chave: Doença de Huntington, Neuroimagem, Morfometria baseada em voxel.

ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant neurodegenerative disease. It is characterized by motor, cognitive and psychiatric symptoms. Diagnostic testing for HD requires an accurate determination of the number of cytosine-adenine-guanine repeats (CAG) repeats in the Huntingtin (*HTT*) gene, which is equal or greater than to 36 repetitions in the presence of expansion. The objective of this present study is to evaluate the brain alterations in HD through two neuroimaging techniques: a) the use of the tool "spatially unbiased template atlas" (SUIT) for Voxel-based morphometry (VBM) by magnetic resonance imaging (MRI) and b) transcranial sonography (TCS) of the caudate nucleus, midbrain raphe and substantia nigra. Due to the lack of previous studies, we were particularly interested in evaluating the role of the cerebellar structures in HD. We selected 26 molecularly confirmed HD patients, and 26 age-sex-matched controls. Those individuals underwent neurological, cognitive and psychiatric evaluations, MRI and TCS. Using SUIT, we found increased gray matter (GM) density at the anterior cerebellum compared to controls. Higher GM density in the postero-superior lobe correlated to mood symptoms. Worse motor function and better cognitive function correlated with GM changes in the posterior cerebellum ($p < 0.001$ and $k > 100$ voxels). There was no GM atrophy with $p < 0.05$ and family wise error. We did not find statistically significant TCS-related data. We observed GM changes in cerebellar regions involved in sensorimotor integration, motor and visuospatial planning and emotional processing, suggesting cerebellar involvement in the process of HD. We believe that these findings will contribute to a better understanding of the pathologic process in this disease.

Keywords: Huntington disease, Neuroimaging, Voxel based morphometry.

SUMÁRIO

I- Introdução.....	14
II- Objetivos.....	21
III- Materiais e Métodos.....	22
IV- Resultados.....	27
V- Discussão.....	37
VI- Conclusão.....	41
VII- Referências Bibliográficas.....	42
VIII- Anexos	
1. Parecer consubstanciado do CEP.....	51
2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	54
3. “ <i>Montreal Cognitive Assessment</i> ” (MOCA).....	61
4. “ <i>Unified Huntington’s Disease Rating Scale</i> ” (UHDRS) – escala motora.....	62
5. UHDRS – escala psiquiátrica.....	63
6. Artigo submetido para publicação.....	65

INTRODUÇÃO

“In the history of medicine, there are few instances in which a disease has been more accurately, more graphically or more briefly described.”

William Osler sobre o trabalho de George Huntington

Aspectos históricos e epidemiológicos da doença de Huntington

A doença de Huntington (DH) foi inicialmente descrita por George Huntington em 1872 em um ensaio denominado “On Chorea”. Anteriormente era conhecida por Coreia de Huntington, por ser a coreia um dos achados clínicos mais característicos desse processo neurodegenerativo. Entretanto, após a identificação das outras manifestações da DH e do reconhecimento de que a coreia não está presente em todas as formas da doença¹, o termo DH tornou-se mais apropriado. Sua prevalência mundial varia de 8 a 10/100.000², podendo ser mais alta em algumas regiões, como em Manitoba no Canadá (1/11905)³, Moray Firth na Escócia (560/100.000)⁴ e Lago Maracaibo, estado de Zulia na Venezuela (1/143 a 1/23000)⁵.

Aspectos genéticos da doença de Huntington

A DH é uma doença neurodegenerativa, de herança autossômica dominante, causada pela expansão do triplete de nucleotídeos citosina-adenina-guanina – CAG, maior ou igual a 36 repetições⁶ no braço curto do cromossomo 4p16.3, no gene codificante da proteína Huntingtina (HTT). É a mais comum entre as doenças neurogenéticas com esse tipo de herança⁷. A confirmação genética da DH é obtida através de teste molecular, sendo considerado patológico maior ou igual a 36 repetições. Pacientes com repetições entre 35-39 podem não apresentar penetrância

completa⁸, mas são considerados com diagnóstico molecular positivo quando sintomáticos. Em indivíduos que apresentam de 27 a 35 repetições é possível ocorrer uma instabilidade meiótica no alelo da HTT, o que pode levar a um aumento da expansão em gerações subsequentes⁹. Há uma relação inversa entre o número de repetições do triplete mutante com a idade de início da DH^{10,11} e com a gravidade das manifestações clínicas, pois quanto maior a expansão, maior a perda neuronal no caudado e no putamen¹².

Aspectos clínicos da doença de Huntington

A DH tem início em média entre as terceira e quinta décadas de vida, com duração média de 17 a 20 anos de doença, sendo a pneumonia a principal causa de óbito, seguida do suicídio⁶. Caracteriza-se clinicamente por ser uma síndrome neuropsiquiátrica e engloba sintomas variados¹:

- Motores: coreia (movimentos involuntários, irregulares, contínuos, abruptos, rápidos e breves que fluem de uma parte do corpo para outra aleatoriamente¹, instabilidade de marcha, instabilidade postural, impersistência motora, disartria, disfagia, aerofagia, ataxia, distonia, bruxismo, tiques, mioclonias, parkinsonismo (presente principalmente na forma juvenil da DH);
- Cognitivos: perda de memória, declínio intelectual, dificuldade de concentração, perda da atenção;
- Psiquiátricos: apatia, abulia, sintomas dos espectros depressivo e ansioso, irritabilidade, alucinações e alterações de personalidade¹³⁻¹⁸;
- Sistêmicos: esses são sintomas menos compreendidos, porém igualmente prevalentes e debilitantes. Incluem o emagrecimento, alterações do sono e do ciclo circadiano, e disautonomia, como a disfunção sexual.

O aconselhamento genético faz-se necessário, considerando a progressão e a vasta sintomatologia, além do impacto socioeconômico que a DH gera em cada família afetada, devendo ser realizado por equipe

multidisciplinar adequadamente treinada.

Fisiopatologia da doença de Huntington

A DH caracteriza-se pela perda neuronal e gliose no córtex e striatum (caudado e putamem), degeneração dos interneurônios estriatais maiores (17-44 mcm) e dos neurônios da substância negra (SN) (<40%), presença de inclusões intranucleares e neurônios distróficos no córtex e striatum¹⁹. Estudos sugerem ainda que as alterações mais precoces consistem na degeneração neuronal da via estriato-nigral, seguida da estriato-palidal (globo pálido externo - GPe), e por fim a via estriato-palidal (globo pálido interno – Gpi)^{20,21}. Apesar da HTT ser essencial no desenvolvimento e na maturação neuronais, suas funções não estão totalmente esclarecidas²²⁻²⁴. A HTT está presente em vários tecidos orgânicos, mas preferencialmente em determinadas regiões do sistema nervoso central (SNC), como caudado, putamem, globo pálido, tálamo e amígdala^{25,26}. Acredita-se que seu envolvimento da fisiopatologia da DH seja mediado por um ganho de função tóxica da proteína mutante, que ocorreria em decorrência da transcrição anormal do alelo expandido^{22,23}. A HTT mutante, por intermédio de reações de fosforilação, acetilação e ubiquitinação²⁷, é capaz de deflagrar a formação de inclusões citoplasmáticas e intranucleares. O acúmulo desses agregados pode, por sua vez, interferir no funcionamento neuronal, bloqueando as reações bioquímicas das organelas intracelulares e culminando na apoptose neuronal^{28,29}.

O cerebelo na doença de Huntington

A HTT é encontrada em menor frequência em outras regiões encefálicas, como o cerebelo^{30,31}, o que gera o questionamento sobre o papel cerebelar na DH. Em 2012, Rüb et al. descreveu a presença de atrofia cerebelar em fases precoces da DH independente da degeneração estriatal, corroborando a idéia da evolução multifocal dessa patologia³².

O cerebelo classicamente é conhecido como a estrutura encefálica responsável pelo controle motor fino, refinamento da marcha, modulação do tônus muscular, ajuste visuoespacial, coordenação, entre outras funções motoras³³, e todas essas funções encontram-se alteradas em porta-

dores da DH. Nos últimos 15 anos, houve um aumento expressivo da investigação de sintomas não-motores relacionados ao circuito cerebelar, como alterações cognitivas (atenção, memória e aprendizado) assim como sintomas psiquiátricos no contexto, especialmente, de doenças neurodegenerativas³⁴⁻³⁷.

Estudos de autópsias de pacientes em fase avançada da DH mostraram uma atrofia considerável na substância cinzenta tanto do córtex quanto dos núcleos profundos cerebelares, especialmente no núcleo fastigial^{32,38,39}. Estudos transversais e prospectivos utilizando ressonância nuclear magnética (RM) estrutural também confirmaram a atrofia desses núcleos cerebelares⁴⁰⁻⁴⁴. Além disso, há indícios de atrofia pontina e mesencefálica na DH, que pode ocorrer previamente a apoptose nigroestriatal, o que contribuiria para a desconexão de vários tratos que ligam o cerebelo ao córtex, como o trato dentorubrotalâmico, reforçando a hipótese de progressão multicêntrica da doença⁴⁵.

Em 2014, Rees et al. comparou 22 pacientes na fase precoce da DH com 12 controles utilizando a ferramenta “*diffeomorphic anatomical registration through exponentiated lie álgebra (Dartel) template*” para “*Voxel based Morphometry*” (VBM), demonstrando que a atrofia cerebelar está diretamente relacionada ao aumento dos sintomas psiquiátricos e disfunção motora na fase precoce da doença³³. A associação mais forte foi entre a redução do volume cerebelar total com a dificuldade de marcha e com a intensidade dos sintomas psiquiátricos. Uma associação mais fraca foi relacionada à realização da tarefa pronação/supinação. A dificuldade para realizar o toque dos dedos foi relacionada ao aumento da difusividade radial no mapa de anisotropia fracionada difusamente na substância branca cerebelar.

“Voxel based Morphometry” em doença de Huntington

A ferramenta VBM é uma excelente ferramenta na avaliação da substância cinzenta (SC) em doenças neurodegenerativas⁴⁶⁻⁴⁹. Estudos prévios na DH^{47,50,51} demonstraram a atrofia da SC da cabeça do caudado, putâmem, lobo temporal medial, ínsula e várias regiões

corticais envolvendo os lobos frontais, parietais e temporais, assim como o hipotálamo^{47,48}. Essa atrofia em portadores da DH é progressiva no caudado, putâmem, GPe, GPi, ínsula, giro do cíngulo, cerebelo, córtex orbitofrontal, lobos temporais mediais e giros frontais médios⁴³. Essas alterações estruturais da DH podem ainda estar presentes nas fases pré-clínicas da doença. Um estudo correlacionou as imagens de 21 pacientes na fase pré-clínica da doença confirmada geneticamente e de 40 pacientes na fase precoce com o número de repetições CAG, evidenciando uma maior atrofia em todas as regiões afetadas quanto maior a expansão do triplete CAG⁵⁰. Outro estudo mostrou que a distribuição das alterações da SC em 20 portadores oligossintomáticos da DH utilizando VBM eram correspondentes àqueles previamente encontrados *post mortem*⁵².

“Spatially unbiased atlas template” em doença de Huntington

Devido à enorme multiplicidade de aferências e eferências do circuito cerebelar, houve a necessidade de topografar mais adequadamente as diferentes áreas cerebelares⁵³⁻⁵⁵. Em 2006, Diedrichsen et al. publicou o primeiro atlas de mapeamento cerebelar de alta resolução, o “*spatially unbiased atlas template*” (SUIT)⁵⁶. Estudos prévios utilizaram esta técnica em outras patologias como a ataxia espinocerebelar do tipo 3 e nas distonias^{57,58}. Já em 2009, Diecrichsen et al. validou o mapa probabilístico de cerebelo, em que é possível uma análise ainda mais confiável da anatomia de cada lóbulo cerebelar (Figura 1), e, assim, correlações funcionais mais fidedignas através da identificação de “*regions of interest*” (ROI's)⁵⁹.

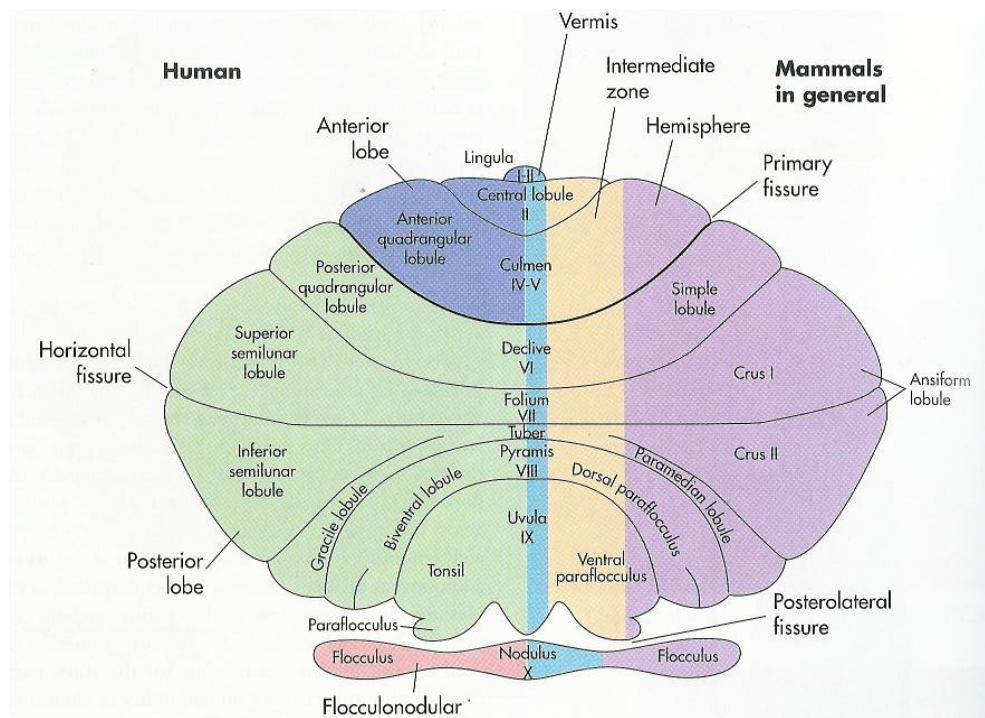


Figura 1: Anatomia cerebelar (<http://cc0309.med.up.pt/2ano/neuro/cerebelo>)

Ultrassonografia transcraniana em doença de Huntington

Desde a década de 90, a ultrassonografia transcraniana (UTC) ganhou espaço na avaliação de pacientes com distúrbios de movimento (DM)⁶⁰⁻⁶⁶. Inúmeros estudos demonstraram as alterações existentes na DH, como a hiperecogenicidade do caudado e da SNc⁶⁷⁻⁷⁰. Um estudo com 39 pacientes com DH demonstrou que a hipoecogenicidade da rafe mesencefálica (RMe) correlacionava-se com a presença de depressão nestes sujeitos⁶⁸.

Atualmente, existe um único estudo piloto que correlacionou UTC com RM em DH⁶⁷ onde se evidenciou que a hiperecogenicidade do caudado e da SN detectadas pela UTC correspondem às alterações degenerativas encontradas pela RM, estando associadas, por sua vez, à expansão do triplo CAG e à gravidade clínica de cada paciente. Estudos subsequentes foram realizados optando-se por uma das técnicas (RM ou UTC) e não pela combinação de ambas. Há uma relação proporcional entre a ecogenicidade da SN com o número de repetições do triplo CAG, aventando-se a hipótese de ser esta uma alteração pré-clínica, inclusive presente antes dos achados da RM⁶⁹. Esse fato, contudo, não foi válido para o aumento da ecogenicidade do caudado.

Essa diferença seria explicada pelo fato da anormalidade da ecogenicidade da SN ser causada principalmente pelo depósito de metais pesados como o ferro e o cobre⁷¹. Estudos recentes sugerem que a HTT é uma proteína reguladora do ferro e por isso seu funcionamento normal é essencial para as diferentes organelas celulares e para a homeostase férrica⁷².

JUSTIFICATIVA

Considerando que a DH não possui tratamento curativo, mas apenas sintomático⁷³, um melhor entendimento sobre as alterações neuroanatômicas da doença é importante para o entendimento fisiopatológico. Não há ainda consenso sobre o papel na UTC na DH, em especial pensando-se em seu uso como biomarcador, com alterações na fase motora da doença, ou para sua utilização no seguimento longitudinal da mesma. Quanto ao cerebelo, ainda não está claro se suas alterações são somente compensatórias, ou se há um papel fundamental do cerebelo na fisiopatologia da DH.

Desta forma, acreditamos que um estudo detalhado da anatomia cerebelar pode trazer informações válidas sobre o processo degenerativo e talvez compensatório do cerebelo, contribuindo para um melhor entendimento do funcionamento deste dentro de diversos circuitos cerebrais e na DH.

OBJETIVOS

“O homem é do tamanho do seu sonho. ”

Fernando Pessoa

Objetivos gerais:

Analisar a morfologia cerebelar na DH e entender sua relação com a sintomatologia clínica da doença e validar o UTC como uma ferramenta de avaliação clínica na DH e possível utilização como biomarcador.

Objetivos específicos:

- 1- Avaliar a morfologia cerebelar através da técnica SUIT comparados a controles normais
- 2- Medir a ecogenicidade da substância negra e do caudado bilateral e da rafe mesencefálica em DH
- 3- Correlacionar escores de escalas clínicas com achados de neuroimagem (VBM-SUIT e UTC).

MATERIAL E MÉTODOS

“Não se preocupe muito com as suas dificuldades em Matemática, posso assegurar-lhe que as minhas são ainda maiores.”

Albert Einstein

Esta foi uma pesquisa transversal, realizada no Laboratório de Neuroimagem no Hospital das Clínicas da UNICAMP.

Aspectos éticos da pesquisa e aprovações

O estudo foi aprovado no Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (FCM). A pesquisa envolveu pacientes com diagnóstico de DH em acompanhamento nos Ambulatórios de Neurogenética e de Distúrbios do Movimento da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os sujeitos leram e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE – anexo 2), que incluiu critérios como confidencialidade, privacidade e anonimato. Foi solicitada uma autorização para os procedimentos realizados: revisão da história, exame neurológico, preenchimento de escalas clínicas, avaliação psiquiátrica (*“Montreal Cognitive Assessment”* (MOCA) – anexo 3), RM e UTC. Os pacientes foram claramente informados sobre riscos e desconfortos da pesquisa, bem como da possibilidade de saírem da mesma, sem prejuízos ou danos para seu tratamento e acompanhamento.

O risco consistia de certo desconforto devido ao barulho durante a RM, ou algum incômodo para pacientes claustrofóbicos devido ao pequeno espaço. O exame de ultrassonografia não causa desconforto aos pacientes. Não foi utilizado nenhum recurso que acarretou risco clínico para o paciente. Declaramos que é de nosso conhecimento os termos das resoluções CNS – MS – 196/96 e complementares e que foram devidamente cumpridos no desenvolvimento do presente projeto.

Sujeitos

Os indivíduos foram recrutados, consecutivamente, no Ambulatório de Distúrbios do Movimento e no Ambulatório de Neurogenética do Hospital das Clínicas da UNICAMP. A participação foi voluntária e todos os pacientes assinaram o TCLE antes da realização de qualquer procedimento relacionado a pesquisa.

Critérios de inclusão:

- Diagnóstico confirmado por teste molecular de DH;
- Idade superior a 18 anos;
- Assinatura do TCLE.

Critérios de exclusão:

- História de doença cerebrovascular prévia ou outra patologia neurológica ou neurodegenerativa associada;
- Coexistência de outra doença que afete o SNC;
- Contraindicações clínicas para a realização do exame de RM (marcapasso cardíaco, claustrofobia, implantes metálicos);
- Não aceitação dos termos previstos no TCLE.

O grupo controle incluiu indivíduos perfeitamente pareados por sexo e idade; com exame neurológico normal, sem antecedente psiquiátrico, oriundos da mesma população de base.

Procedimentos

Todos os pacientes foram avaliados por um neurologista especialista em Distúrbios do Movimento com experiência e treinamento na avaliação de indivíduos com DH através uma ficha clínica padrão aplicada na visita de inclusão do paciente. Neste formulário constavam informações sobre sexo, idade, idade de início dos sintomas, história familiar com heredograma, história profissional, exposição ambiental, antecedentes pessoais, história de exposição a drogas, comorbidades clínicas e medicações em uso. As informações foram adquiridas através de entrevista com o sujeito, seus familiares e consulta ao prontuário.

Em todos os pacientes foi realizado um exame neurológico e aplicada a escala de avaliação clínica específica para a DH – “*Unified*

Huntington's Disease Rating Scale” (UHDRS), englobando seu escore motor, assim como seu escore psiquiátrico. A parte motora da UHDRS (anexo 3) varia de 0 a 82 pontos e avalia a movimentação ocular extrínseca, fala, movimentação de língua, marcha, instabilidade postural, além de quantificar a distonia, a coréia, a bradicinesia e a rigidez. Já o escore psiquiátrico da UHDRS (anexo 4) pode atingir um máximo de 72 pontos, compostos dos sintomas de humor, ansiedade, agressividade, irritabilidade, obsessões, ilusões, culpa, ideação suicida e alucinações. Escores mais altos em ambas as escalas demonstram maior gravidade clínica. A escala cognitiva – MOCA - varia de 0 a 30 pontos e permite a avaliação da função executiva e visuoespacial, nomeação, memória, evocação, atenção, abstração, linguagem e orientação temporo-espacial. Ao contrário das escalas anteriores, escores mais baixos estão relacionados a alterações cognitivas, sendo escores acima de 26 considerados normais (<http://www.mocatest.org/normative-data/>). Todas as escalas foram devidamente validadas para a língua portuguesa^{74,75}.

As imagens de RM foram adquiridas em aparelho de 3T Achieva-Intera PHILIPS®, release 2.6.1.0 de acordo com os seguintes parâmetros:

1 Imagem volumétrica ponderadas em T1: imagem ponderada em T1 e gradiente eco com voxels isotrópicos de 1mm, adquiridos no plano sagital (1mm de espessura; “*flip angle*” 8°; TR, 7.1; TE, 3,2; matriz, 240x240; e FOV, 240x240).

Depois de adquiridas, um neurorradiologista avaliou cegamente todos os exames com o objetivo de descartar outros diagnósticos.

Após isso, as imagens foram processadas através da técnica de VBM. A sequência VBM permite uma avaliação global do cérebro, sem viés de seleção⁴⁹, e elucida diferenças focais em diferentes regiões cerebrais, usando a abordagem estatística do mapeamento estatístico paramétrico. As imagens foram divididas em grupos, no caso o grupo de 26 pacientes e outro de 26 controles saudáveis, assintomáticos e sem antecedentes neurológicos, perfeitamente combinados em idade e sexo com o grupo principal. As imagens de RM em 3D adquiridas no formato DICOM foram transformadas para o formato NIFTI através do software

DCM2Nii (www.mccauslandcenter.sc.edu/mricro/mricron/dcm2nii.html). Com o objetivo de minimizar todas as chances de erro, as imagens no novo formato foram então alinhadas segundo a comissura anterior, e também rodadas nos eixos sagital, coronal e axial quando necessário. Terminado o pré-processamento, a análise por VBM envolveu a extração, a segmentação em SC, a normalização espacial de todas as imagens para o mesmo espaço estereotático, o reposicionamento para correção da normalização (modulação) e a suavização.

SUIT-VBM (<http://www.icn.ucl.ac.uk/motorcontrol/imaging/suit.htm>) extraiu as estruturas infratentoriais do tecido circundante e gerou mapas segmentados (SC, substância branca e líquido), proporcionando um alinhamento mais preciso entre os sujeitos do que o alinhamento que os atuais métodos “*whole-brain*” proporcionam para estruturas infratentoriais. As imagens segmentadas para SC foram normalizadas para o SUIT template. Em seguida nós reposicionamos os mapas gerados para corrigir a variação do volume induzida pela normalização espacial. A seguir, realizamos testes de homogeneidade usando a covariância das imagens. Por fim, as imagens finais foram suavizadas através de um filtro Gaussian Kernel com 8 mm full-width half maximum (FWHM) contido no SPM8/DARTEL (<http://www.fil.ion.ucl.ac.uk>) para satisfazer a distribuição de Gauss pressuposta para a análise estatística das diferenças regionais. Este processo minimizou os efeitos das diferenças residuais em anatomia funcional e dos giros durante a obtenção da média entre os sujeitos e tornou os dados mais normalmente distribuídos. Usando SPM8, um teste de duas amostras foi criado para análise do voxel por voxel, e a detecção de diferenças de SC entre os grupos foi estabelecida. Um mapa estatístico paramétrico foi gerado, que identificou as regiões do cerebelo, com diferenças significativas. Localizações anatômicas dos lobulos cerebelares e vermis foram determinados pelo “*A probabilistic MR atlas for the human cerebellum*” by Diedrichsen et al. 2009, que foi desenvolvido comparando os lobulos cerebelares de 20 indivíduos saudáveis em exames de RM, o que possibilitou a elaboração de uma máscara desses lobulos cerebelares⁵⁹. O uso do SUIT permite uma

classificação mais precisa dos lóbulos do cerebelo, uma vez que preserva os detalhes anatômicos dessas estruturas.

As imagens de UTC foram adquiridas no aparelho HD11XE PHILIPS® utilizando o transdutor S3-1 de acordo com os seguintes parâmetros e foram realizadas pela própria pesquisadora:

- Imagens axiais do plano do mesencéfalo adquiridas através da janela acústica temporal paralela à linha imaginária orbitomeatal;
- Imagens axiais do plano dos núcleos da base e dos ventrículos laterais através da janela acústica temporal com inclinação superior de 10 a 15° em relação à linha imaginária orbitomeatal.

As imagens de UTC foram avaliadas utilizando o modo B da ultrassonografia e a ecogenicidade do núcleo caudado, RMe e SN foi medida quantitativamente (área).

Análise estatística

Utilizamos o programa STATA 13.1 para análise dos dados. Dados demográficos estão descritos de acordo com listagem de frequência de todas variáveis e exame de sua distribuição, assim como de suas medidas de tendência central (média) e de dispersão (desvio-padrão). A análise dos achados de RM foi realizada através do programa SPM8 com a comparação entre grupos de acordo com os resultados clínicos e genéticos, primeiramente utilizando-se um teste de duas amostras onde foram comparados os grupos paciente e controle ($p < 0.05$, “family wise error” (FWE), “extent threshold” (K) de 100 voxels), e depois outro correlacionando as alterações de SC do grupo de pacientes com os escores motor e psiquiátrico da UHDRS e com o escore do MOCA, corrigidos para idade, tempo de doença e número de repetições CAG ($p < 0.001$, sem correção para FWE, K de 100 voxels). Os dados de UTC foram correlacionados com variáveis clínicas, sendo que o nível de significância foi estabelecido em $p < 0.05$.

RESULTADOS

“..., mas as coisas
findas, muito mais que
lindas, essas ficarão. ”

Carlos Drummond de Andrade

Análise clínica

Foram recrutados inicialmente 31 pacientes com DH; porém, foram excluídos 5: em 2 não foi possível a sedação para a realização adequada dos exames complementares, em 1 foi diagnosticado um hematoma subdural crônico, em outro foi identificado um macroadenoma hipofisário, e, por fim, um dos pacientes era uma criança com 7 anos de idade e com 4 anos de doença, por isso, optou-se por não a incluir nas análises finais, uma vez que a apresentação clínica da DH nessa faixa etária difere muito da idade adulta o que poderia gerar um viés em nossos resultados. Com isso, as análises subsequentes foram realizadas com os 26 pacientes restantes.

Considerando o perfil clínico-epidemiológico dos participantes, dos pacientes avaliados 14 (53,85%) eram mulheres e 12 (46,15%) eram homens (Tabela 1); 11 pacientes (42,3%) apresentavam herança materna, 12 (46,15%) paterna e 3 (11,53%) com herança indeterminada (Tabela 1). O média de repetições do triplete mutante de CAG foi de 42 repetições (Tabela 1). A idade média dos pacientes foi de 49.42 anos e a média de idade de início foi de 40.23 anos (Tabela 1). A média de pontuação da UHDRS foi de 21 e do MOCA de 22 pontos (Tabela 1).

Tabela 1: Características clínico-epidemiológicas

Variável	Percentual ou Média $\pm$ DP (Min-Max)
Sexo masculino – pacientes	46.15%
Sexo masculino – controles	46.15%
Herança paterna	46.15%
Herança indeterminada	11.53%
Idade – pacientes	49.42$\pm$10.83 (25-68)
Idade – controles	49.42$\pm$10.83 (25-68)
Idade de início	40.23$\pm$9.79 (22-59)
Número de repetições CAG	42$\pm$3.79 (36-50)
UHDRS	21$\pm$4.2426 (8-81)
MOCA	22$\pm$2.1213 (0-26)

DP: desvio-padrão; UHDRS: “*Unified Huntington’s Disease Rating Scale*”; MOCA: “*Montreal Cognitive Assessment*. ”

Análise cerebelar (ferramenta SUIT para VBM)

Após a aplicação da ferramenta SUIT nas 26 imagens catalogadas em VBM, baseamos nosso resultado no mapa probabilístico de cerebelo⁵⁹ e consideramos as áreas que mediam mais de 100 voxels. Encontramos um aumento de SC nos lóbulos cerebelares das regiões I-IV, bilateralmente (Tabela 2 e Figura 2) - $p < 0.05$, FWE, K de 100 voxels. Não encontramos atrofia utilizando esses limiares de correção estatística.

Todavia, quando executamos a análise com limites menos estritos ($p < 0.001$, sem correção para FWE, K de 100 voxels), evidenciamos atrofia de SC nas regiões VI à direita e V-VI à esquerda (Tabela 3).

Tabela 2: Aumento de SC em voxels e topografia no mapa probabilístico – $p < 0.05$ FWE

Aumento de SC em voxels	Estrutura	Área	Tamanho da área em voxels	Coordenadas x, y, z
378	Hemisfério cerebelar direito	I-IV	5491	0 -47 -21
357	Hemisfério cerebelar esquerdo	I-IV	4895	10 -36 -47

SC: substância cinzenta

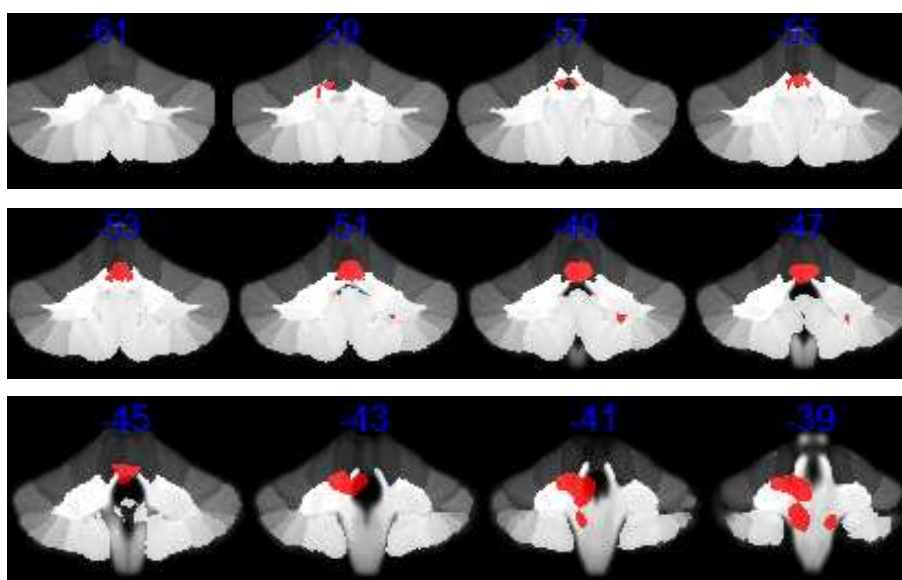


Figura 2: Cortes coronais do mapa probabilístico do aumento da SC (substância cinzenta) – zonas em vermelho são as áreas de I-IV dos lobos cerebelares anteriores.

Tabela 3: Atrofia de SC em voxels e topografia no mapa probabilístico – $p<0.001$

Atrofia	Estrutura	Área	Tamanho da área em voxels	Coordenadas x,y,z
246	Hemisfério cerebelar direito	VI	11426	-18 -46 -9
143	Hemisfério cerebelar esquerdo	V	6052	16 -64 -9
121	Hemisfério cerebelar esquerdo	VI	12562	-4 -51 2

SC: substância cinzenta.

Após essa análise global que demonstrou excesso e atrofia de densidade de SC em determinadas áreas cerebelares, avaliamos separadamente cada uma das seguintes variáveis clínicas, covariadas para idade de início, tempo de doença e número de repetições CAG (Tabela 4 e Figura 3):

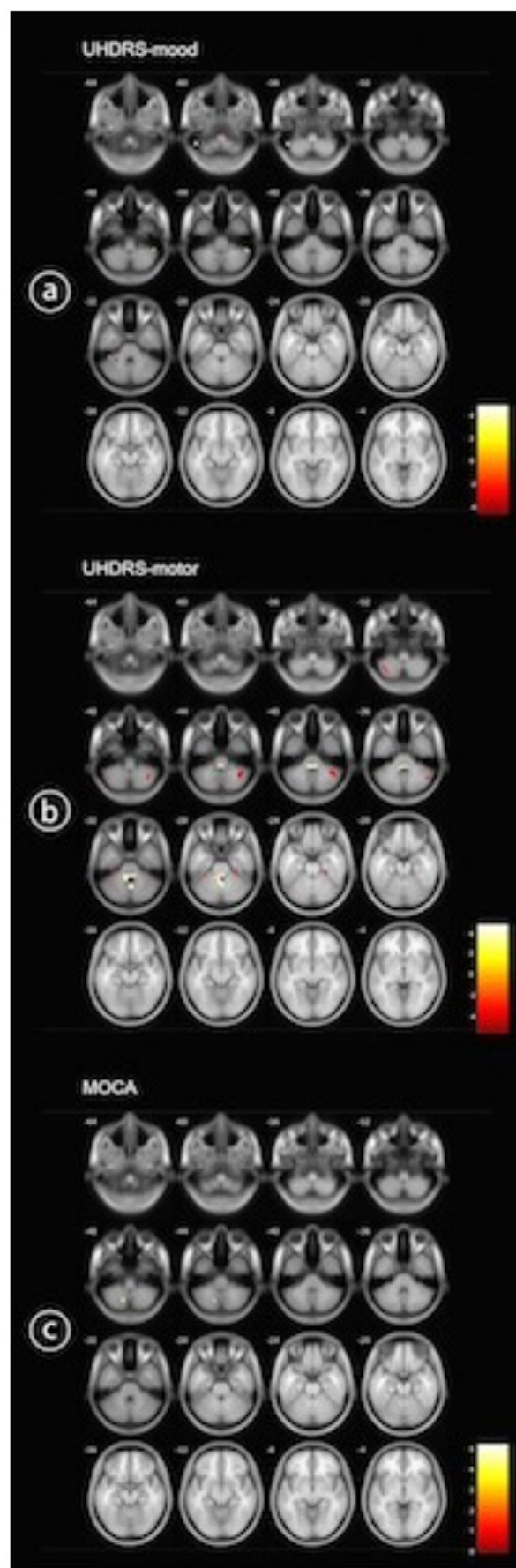
- Escore psiquiátrico – UHDRS: nós identificamos uma correlação positiva entre densidade de SC com o escore de humor na região Crus II à direita, e uma correlação negativa na região VI à esquerda;
- Escore motor – UHDRS: evidenciamos uma correlação positiva nas regiões vermicianas VIII e IX. Uma correlação negativa foi constatada em uma área maior e lateralizada à direita nas regiões Crus I e II, IV, V, VI, VIIb e VIII;
- Escore – MOCA: apenas a correlação positiva foi significativa, topografada na região VIII à esquerda.

Tabela 4: Correlações clínicas entre alterações da SC cerebelar com os escores motor, psiquiátrico e cognitivo

Correlações clínicas - $p < 0.001$ e $K > 100$ voxels		
Coordenadas x y z	Voxels	AAL
Correlação positiva entre escore psiquiátrico-UHDRS e SC		
48 -43 -46	233	Lóbulo crus II D
Correlação negativa entre escore psiquiátrico-UHDRS e SC		
-26 -44 -31	119	Lóbulo VI E
Correlação positiva entre escore motor-UHDRS e SC		
3 -60 -31	315	Vermis - Lóbulo VIII
	191	Vermis - Lóbulo IX
Correlação negativa entre escore motor-UHDRS e SC		
39 -60 -51	383	Lóbulo VII b E
	197	Lóbulo VIII E
38 -53 -45	393	Lóbulo crus II D
	382	Lóbulo VIII D
	368	Lóbulo VII b D
	334	Lóbulo crus I D
28 -32 -26	401	Lóbulos IV/V D
	107	Lóbulo VI D
-30 -37 -30	201	Lóbulo VI E
Correlação positiva entre MOCA e SC		
-13 -65 -47	247	Lóbulo VIII E

K: "Extent threshold", AAL: "Automated anatomical labeling", SC: substância cinzenta; D: direita; E: esquerda; UHDRS: "Unified Huntington's disease rating scale"; MOCA: "Montreal cognitive assessment."

Figura 3: a) Correlação positiva (amarelo) e negativa (vermelho) entre o escore psiquiátrico – UHDRS e SC; b) Correlação positiva (amarelo) e negativa (vermelho) entre o escore motor – UHDRS e SC; c) Correlação positiva (amarelo) e negativa (vermelho) entre MOCA e SC; SC: substância cinzenta; UHDRS: “*Unified Huntington’s disease rating scale*”; MOCA: “*Montreal cognitive assessment*”.



Ultrassonografia transcraniana

Vinte e três pacientes foram submetidos a UTC e 3 não a realizaram devido a problemas técnicos com a ultrassonografia em 2 dias de recrutamento. Destes 23, cinco não apresentavam janela óssea acústica para a realização adequada para realização do exame.

Estudamos a SN e o caudado bilateralmente e a RMe. A RMe foi visualizada em todos os pacientes com média de ecogenicidade de 0.4685 cm². Tanto a SN à direita quanto à esquerda foram encontradas em 16 (88,88%) dos pacientes com média de 0.3416 cm² à direita e de 0.3855 cm² à esquerda. Já os núcleos caudados foram as estruturas com maior dificuldade de localização devido à necessidade de inclinação do transdutor da ultrassonografia em 10 a 15°, portanto o caudado à direita foi visto em 8 pacientes (44,44%) e à esquerda em 7 pacientes (38,88%), com médias de áreas de ecogenicidade de 0.8266 cm² e 0.9277 cm², respectivamente (Tabela 5 e Figuras 4, 5 e 6). Não houve correlação significativa entre as áreas e nenhuma das variáveis clínicas (Tabela 6).

Tabela 5: Médias de ecogenicidade das estruturas avaliadas

Região estudada	“n”	Média ± DP (Min-
		Max)
SN D	16	0.34±0.05 (0.27-0.45)
SN E	16	0.38±0.13 (0.20-0.68)
Rafe	18	0.46±0.37 (0.17-1.79)
Caudado D	8	0.82±0.27 (0.40-1.18)
Caudado E	7	0.92±0.34 (0.57-1.58)

SN: substância negra; D: direita; E: esquerda.

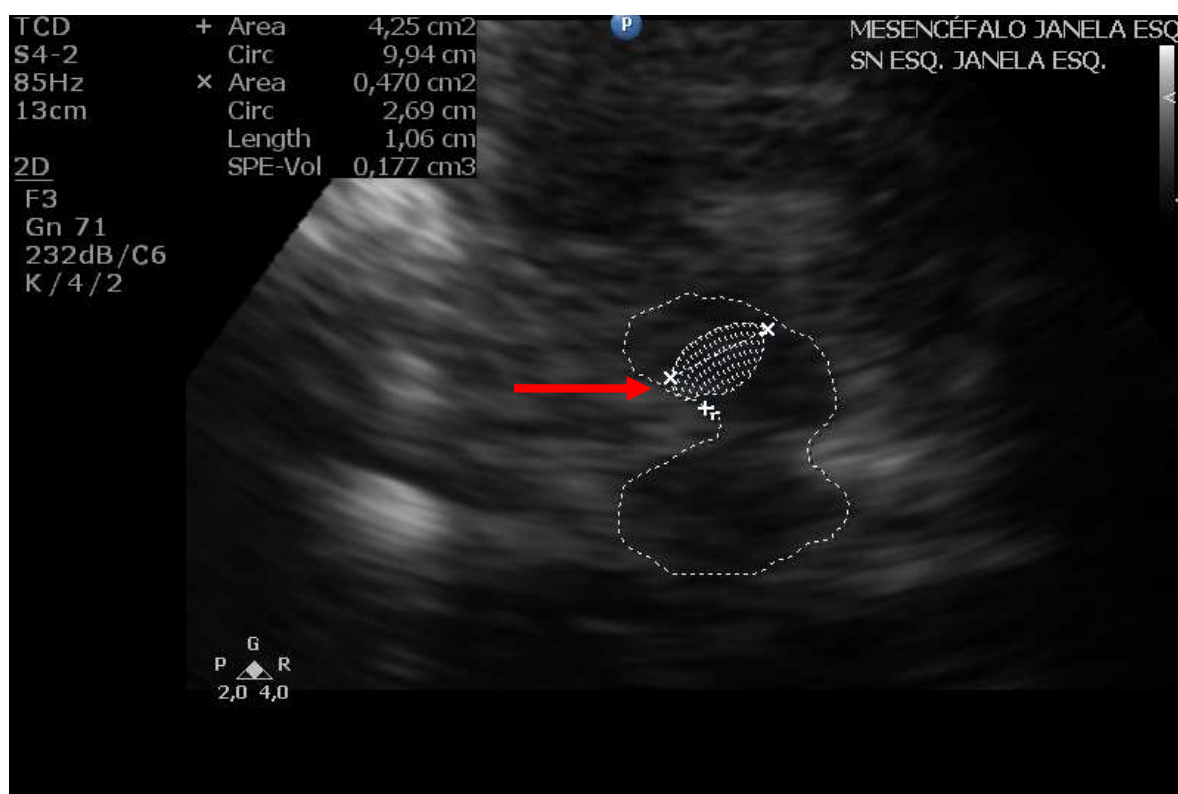


Figura 4: Imagem de UTC – pontilhado desenhando o mesencéfalo e seta vermelha apontando a Substância Negra à esquerda. UTC: ultrassonografia transcraniana.

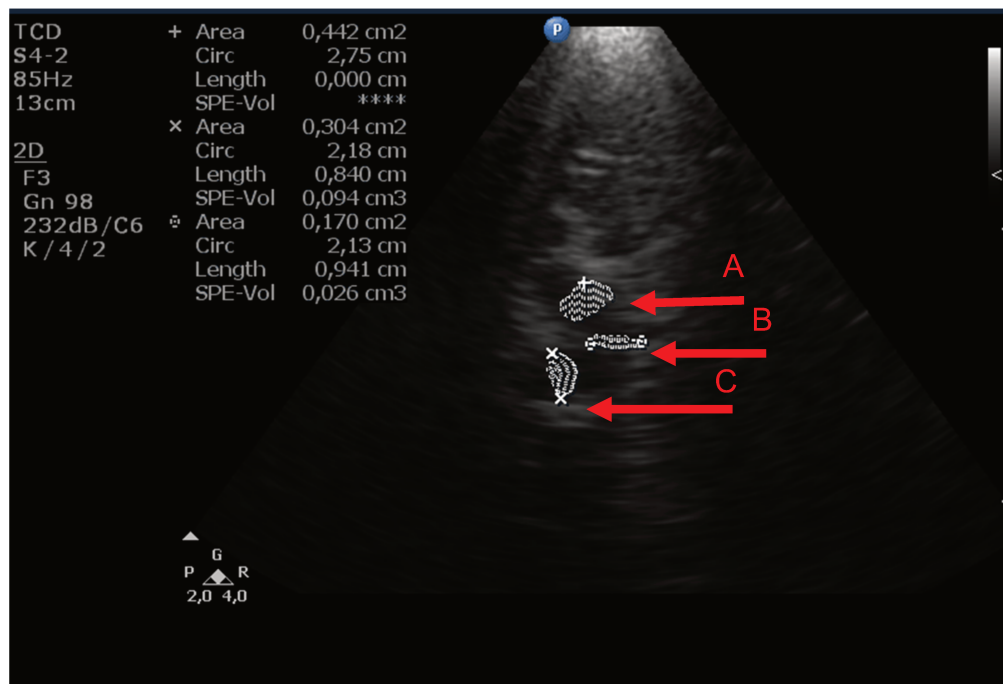


Figura 5: Imagem de UTC – A) Substância Negra à direita, B) Rafe Mesencefálica e C) Substância Negra à esquerda. UTC: ultrassonografia transcraniana.

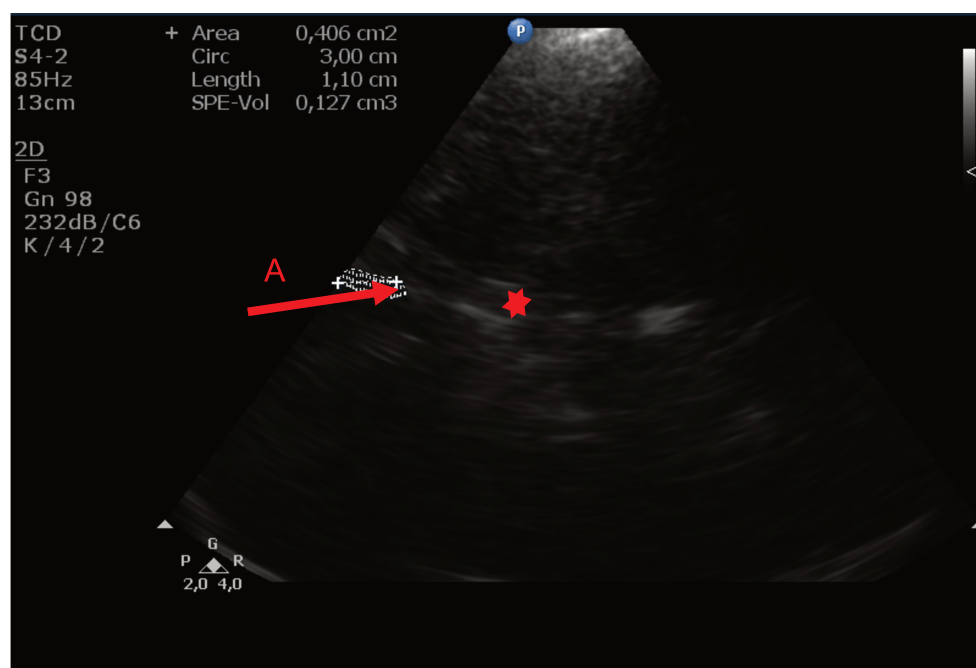


Figura 6: Imagem de UTC – A) Caudado à esquerda; Estrela marcando a distância interventricular. UTC: ultrassonografia transcraniana.

Tabela 6: Correlações estatísticas entre a UTC e as variáveis clínicas

Correlações	Idade	Idade de início r(p)	CAG r(p)	SN D r(p)	SN E r(p)	Rafe r(p)	Caudado D r(p)	Caudado E r(p)
Idade de início	0.9000 (0.037)							
CAG	-0.9747 (0.004)	-0.9747 (0.004)						
SN D	-0.6000 (0.248)	-0.3000 (0.623)	0.4617 (0.433)					
SN E	-0.6000 (0.248)	-0.7000 (0.188)	0.6669 (0.218)	0.2000 (0.747)				
Rafe	-0.5000 (0.391)	-0.3000 (0.623)	0.4104 (0.492)	0.7000 (0.188)	0.7000 (0.188)			
Caudato D	0.4000 (0.504)	0.7000 (0.188)	-0.5643 (0.321)	0.0000 (1.000)	-0.8000 (0.104)	-0.3000 (0.623)		
Caudato E	0.2000 (0.747)	0.5000 (0.391)	-0.3591 (0.552)	0.6000 (0.284)	-0.6000 (0.284)	0.1000 (0.872)	0.6000 (0.284)	
UHDRS	-0.600 (0.2848)	-0.800 (0.1041)	0.7182 (0.1718)	0.0000 (1.0000)	0.2000 (0.7471)	-0.3000 (0.6238)	-0.5000 (0.3910)	-0.4000 (0.5046)

UTC: ultrassonografia transcraniana; SN: Substância negra; D: Direito(a); E: Esquerdo(a); UHDRS: “*Unified Huntington’s Disease Rating Scale.*”

DISCUSSÃO

“Eu quase que nada sei, mas
desconfio de muita coisa.”

João Guimarães Rosa

Enquanto a maioria dos estudos morfológicos estruturais prévios em DH descreveram a atrofia como a mais importante alteração cerebelar da doença, em nossa pesquisa observamos principalmente o aumento de SC cerebelar, localizado majoritariamente na porção anterior do cerebelo. Nós observamos atrofia de SC somente utilizando uma análise estatística menos restritiva na região póstero-superior. As alterações psiquiátricas correlacionam-se com alterações no lobo póstero-superior, as motoras com alterações na porção central do lobo póstero-inferior e na porção lateral à direita do lobo póstero-superior, e, as cognitivas com a região lateral esquerda do lobo póstero-inferior.

O aumento de SC foi encontrado de forma simétrica nas regiões de I-IV dos lobos cerebelares anteriores. A subárea III, mas principalmente o lóbulo IV está diretamente envolvido no controle motor do membro superior⁷⁶. Ataxia de marcha e apendicular, disartria, assim como o controle dos movimentos de língua e de musculatura orofacial também estão diretamente relacionados à integridade dessa região⁷⁷⁻⁸⁴. A coreia localiza-se mais frequentemente nos membros, na face e na língua, o que corresponde topograficamente às áreas de aumento da SC. Assim podemos justificar uma contribuição cerebelar na sua gênese, através da conexão com o trato dentorubrotalâmico, compondo o clássico modelo fisiopatológico previamente estabelecido pela disfunção entre núcleo motor talâmico e outros núcleos subcorticais, como o globo pálido interno e o caudado⁸⁵. Acreditamos que os achados de aumento de SC cerebelar podem ser justificados como um mecanismo compensatório do desarranjo que o córtex cerebelar sofre na fase inicial da DH. Esse aumento de SC já foi reportado em pesquisas anteriores, que envolveram

doença de Parkinson, distonia, espasmo hemifacial, entre outras condições neuropsiquiátricas^{46,57,58,86-90}. Nosso estudo pode ser considerado um piloto nessa questão, por envolver a DH, havendo a necessidade de análises prospectivas na tentativa de corroborar nossos resultados iniciais.

As áreas com atrofia da SC cerebelar estão envolvidas no controle motor fino e em atividades mais complexas e elaboradas, assim como operam no aprendizado sensitivomotor^{91,92}. Observamos atrofia nas áreas VI dos lobos cerebelares posteriores bilateralmente e na área V do lobo cerebelar anterior à esquerda. Estas fazem parte da porção sensitivomotora do cerebelo, sendo que sua injúria compromete diretamente os processos de aprendizado afetivo e de processamento cognitivo⁹¹. Cerca de 80% dos indivíduos com DH apresentam alterações do estado mental⁹³. Dentre a gama de sintomas neuropsiquiátricos dessa doença, os mais frequentes são os sintomas depressivos, a apatia, a agressividade, a desinibição e o comprometimento cognitivo. As áreas em que constatamos atrofia de SC estão indiretamente conectadas com a área pré-frontal através do trato dentorubrotalâmico, sendo a porção ventral do núcleo denteado a interface entre essas duas áreas⁷⁶. Supomos que haja uma diminuição de eferência dos lóbulos VI devido a atrofia regional, comprometendo a modulação desse circuito, e consequentemente levando ao desenvolvimento de sintomas psiquiátricos. Por sua vez, observamos uma correlação negativa entre o escore psiquiátrico e a densidade de SC na região VI, que está diretamente envolvida no processamento afetivo e na percepção da entonação emocional⁹⁴.

A correlação positiva entre o escore motor da UHDRS e a densidade de SC, topografada nas áreas vermianas VIII e IX, foi interpretada como um mecanismo compensatório cerebelar. Essas áreas são conhecidas como a porção límbica do cerebelo e são responsáveis pelo processamento afetivo, e, em conjunto com as demais regiões cerebelares posteriores, participam de tarefas cognitivas superiores. Essas regiões possuem conexões diretas com outras estruturas límbicas cerebrais, tais como giro do cíngulo, hipocampo e amígdala⁹⁵⁻⁹⁹. Lesões estruturais

vermianas posteriores são o substrato anatômico da síndrome cognitivo-afetiva cerebelar^{34,100-106}. O fato de termos achado uma correlação entre a escala motora e estas regiões, ao invés das escalas psiquiátrica e cognitiva, provavelmente deve-se ao baixo poder estatístico da análise devido ao tamanho da amostra. De qualquer forma, a correlação com a escala motora sugere uma associação direta com a gravidade das manifestações clínicas.

Evidenciamos uma correlação negativa entre a escala motora e a SC cerebelar acometendo uma área mais extensa do cerebelo, que envolve as regiões crus I e II, IV, V, VI, VIIb e VIII à direita e VI, VIIb e VIII à esquerda. As regiões de I a V compreende a porção anterior do cerebelo, cuja função principal é o controle motor, que também possui uma representação secundária nos lóbulos VIIIa/b. Enquanto que os lóbulos VI e VII estão relacionados às funções executivas que necessitam do controle de múltiplos domínios⁹² e à adaptação aos movimentos sacádicos¹⁰⁷. O predomínio à direita deve-se pela representação somatotópica ipsilateral cerebelar, quando consideramos a mão dominante dos indivíduos analisados^{91,108,109}. Os lóbulos VI e crus I estão associados a movimentos sequenciais das mãos (medialmente) e dos pés (lateralmente), que engloba não somente o controle motor, como também refletem uma ação comportamental motora^{108,109}.

Em relação ao MOCA, encontramos somente uma correlação positiva entre a SC cerebelar e a área VIII à esquerda. Sabidamente, os lóbulos VIII participam de tarefas sensitivomotoras e da memória de trabalho, o que nos faz acreditar que essa correlação positiva seja uma tentativa de compensação cognitiva para driblar o declínio cognitivo consequente a doença^{92,94}.

Outro dado importante e que fortalece positivamente nosso estudo é que nossas correlações clínico-epidemiológicas corresponderam às da literatura mundial. Confirmamos novamente um dado conhecido na literatura que é a relação inversa entre o número de repetições CAG e a idade de início da doença, isso valida nossa casuística, mesmo não sendo expressiva^{10,11}.

Não encontramos correlações clínicas com significância estatística relacionadas à UTC. Diante desse achado, aventamos duas hipóteses: ou nosso estudo não apresentou poder suficiente para detectar as alterações de UTC na DH, mesmo tratando-se de doença rara, ou a UTC realmente não pode ser considerada como biomarcador para a DH através da análise da ecogenicidade da SN.

As maiores limitações da nossa pesquisa foram a dificuldade de sedação dos pacientes e o número pequeno de pacientes. Isto provavelmente justifica não termos encontrado atrofia de SC com a correção FWE. Nossa amostra também incluía sujeitos com, proporcionalmente, pouco tempo de doença e com características heterogêneas.

Acreditamos que a validação de técnicas de neuroimagem capazes de serem utilizadas como marcadores de progressão são importantes no desenvolvimento de terapias modificadoras de doença, pois podem ser utilizadas como “*surrogate endpoints*” em estudos clínicos no qual a progressão da doença é lenta.

CONCLUSÃO

O cerebelo parece estar envolvido na fisiopatologia da DH, não somente nas síndromes motoras, mas também nos sintomas psiquiátricos e cognitivos. Não está claro se estas alterações são primárias, compensatórias ou ambas.

A UTC enquanto marcador pré-clínico da DH e biomarcador de progressão ainda precisa ser validado em estudos envolvendo um número maior de sujeitos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rub U, Vonsattel JP, Heinsen H, Korf HW. The Neuropathology of Huntington's disease: classical findings, recent developments and correlation to functional neuroanatomy. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2015;217:1-146.
2. Pogledic I, Relja M. [Huntington's disease]. *Lijec Vjesn* 2012;134:346-50.
3. Rawlins MD, Wexler NS, Wexler AR, et al. The Prevalence of Huntington's Disease. *Neuroepidemiology* 2016;46:144-53.
4. Harper PS. The epidemiology of Huntington's disease. *Hum Genet* 1992;89:365-76.
5. Paradisi I, Hernandez A, Arias S. Huntington disease mutation in Venezuela: age of onset, haplotype analyses and geographic aggregation. *J Hum Genet* 2008;53:127-35.
6. Roos RA. Huntington's disease: a clinical review. *Orphanet J Rare Dis* 2010;5:40.
7. Castilhos RM, Souza AF, Furtado GV, et al. Huntington disease and Huntington disease-like in a case series from Brazil. *Clin Genet* 2014;86:373-7.
8. Rubinsztein DC, Leggo J, Coles R, et al. Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats. *Am J Hum Genet* 1996;59:16-22.
9. ACMG/ASHG statement. Laboratory guidelines for Huntington disease genetic testing. The American College of Medical Genetics/American Society of Human Genetics Huntington Disease Genetic Testing Working Group. *Am J Hum Genet* 1998;62:1243-7.
10. Duyao M, Ambrose C, Myers R, et al. Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. *Nat Genet* 1993;4:387-92.
11. Stine OC, Pleasant N, Franz ML, Abbott MH, Folstein SE, Ross CA. Correlation between the onset age of Huntington's disease and length of the trinucleotide repeat in IT-15. *Hum Mol Genet* 1993;2:1547-9.
12. Furtado S, Suchowersky O, Rewcastle B, Graham L, Klimek ML, Garber A. Relationship between trinucleotide repeats and neuropathological changes in Huntington's disease. *Ann Neurol* 1996;39:132-6.
13. Foroud T, Gray J, Ivashina J, Conneally PM. Differences in duration of

Huntington's disease based on age at onset. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999;66:52-6.

14. Vogel CM, Drury I, Terry LC, Young AB. Myoclonus in adult Huntington's disease. *Ann Neurol* 1991;29:213-5.

15. Carella F, Scaioli V, Ciano C, Binelli S, Oliva D, Girotti F. Adult onset myoclonic Huntington's disease. *Mov Disord* 1993;8:201-5.

16. Thompson PD, Bhatia KP, Brown P, et al. Cortical myoclonus in Huntington's disease. *Mov Disord* 1994;9:633-41.

17. Ashizawa T, Jankovic J. Cervical dystonia as the initial presentation of Huntington's disease. *Mov Disord* 1996;11:457-9.

18. Jankovic J, Ashizawa T. Tourettism associated with Huntington's disease. *Mov Disord* 1995;10:103-5.

19. Sotrel A, Paskevich PA, Kiely DK, Bird ED, Williams RS, Myers RH. Morphometric analysis of the prefrontal cortex in Huntington's disease. *Neurology* 1991;41:1117-23.

20. Hedreen JC, Folstein SE. Early loss of neostriatal striosome neurons in Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995;54:105-20.

21. Albin RL. Selective neurodegeneration in Huntington's disease. *Ann Neurol* 1995;38:835-6.

22. Dayalu P, Albin RL. Huntington disease: pathogenesis and treatment. *Neurol Clin* 2015;33:101-14.

23. Rikani AA, Choudhry Z, Choudhry AM, et al. The mechanism of degeneration of striatal neuronal subtypes in Huntington disease. *Ann Neurosci* 2014;21:112-4.

24. Aronin N, Kim M, Laforet G, DiFiglia M. Are there multiple pathways in the pathogenesis of Huntington's disease? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1999;354:995-1003.

25. Bhide PG, Day M, Sapp E, et al. Expression of normal and mutant huntingtin in the developing brain. *J Neurosci* 1996;16:5523-35.

26. Sapp E, Schwarz C, Chase K, et al. Huntingtin localization in brains of normal and Huntington's disease patients. *Ann Neurol* 1997;42:604-12.

27. Ehrnhoefer DE, Sutton L, Hayden MR. Small changes, big impact: posttranslational modifications and function of huntingtin in Huntington disease. *Neuroscientist* 2011;17:475-92.

28. Waelter S, Boeddrich A, Lurz R, et al. Accumulation of mutant huntingtin fragments in aggresome-like inclusion bodies as a result of insufficient protein degradation. *Mol Biol Cell* 2001;12:1393-407.
29. Chen S, Berthelie V, Hamilton JB, O'Nuallain B, Wetzel R. Amyloid-like features of polyglutamine aggregates and their assembly kinetics. *Biochemistry* 2002;41:7391-9.
30. Graveland GA, Williams RS, DiFiglia M. Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease. *Science* 1985;227:770-3.
31. Vonsattel JP, DiFiglia M. Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998;57:369-84.
32. Rub U, Hoche F, Brunt ER, et al. Degeneration of the cerebellum in Huntington's disease (HD): possible relevance for the clinical picture and potential gateway to pathological mechanisms of the disease process. *Brain Pathol* 2013;23:165-77.
33. Rees EM, Farmer R, Cole JH, et al. Cerebellar abnormalities in Huntington's disease: a role in motor and psychiatric impairment? *Mov Disord* 2014;29:1648-54.
34. Braga-Neto P, Pedroso JL, Alessi H, et al. Cerebellar cognitive affective syndrome in Machado Joseph disease: core clinical features. *Cerebellum* 2012;11:549-56.
35. Lauterbach EC. Bipolar disorders, dystonia, and compulsion after dysfunction of the cerebellum, dentatorubrothalamic tract, and substantia nigra. *Biol Psychiatry* 1996;40:726-30.
36. Kutty IN, Prendes JL. Psychosis and cerebellar degeneration. *J Nerv Ment Dis* 1981;169:390-1.
37. Starkstein SE, Robinson RG, Berthier ML, Price TR. Depressive disorders following posterior circulation as compared with middle cerebral artery infarcts. *Brain* 1988;111 (Pt 2):375-87.
38. Jeste DV, Barban L, Parisi J. Reduced Purkinje cell density in Huntington's disease. *Exp Neurol* 1984;85:78-86.
39. Rodda RA. Cerebellar atrophy in Huntington's disease. *J Neurol Sci* 1981;50:147-57.
40. Scharmuller W, Ille R, Schienle A. Cerebellar contribution to anger

recognition deficits in Huntington's disease. *Cerebellum* 2013;12:819-25.

41. Ruocco HH, Lopes-Cendes I, Li LM, Santos-Silva M, Cendes F. Striatal and extrastriatal atrophy in Huntington's disease and its relationship with length of the CAG repeat. *Braz J Med Biol Res* 2006;39:1129-36.

42. Fennema-Notestine C, Archibald SL, Jacobson MW, et al. In vivo evidence of cerebellar atrophy and cerebral white matter loss in Huntington disease. *Neurology* 2004;63:989-95.

43. Ruocco HH, Bonilha L, Li LM, Lopes-Cendes I, Cendes F. Longitudinal analysis of regional grey matter loss in Huntington disease: effects of the length of the expanded CAG repeat. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008;79:130-5.

44. Hobbs NZ, Henley SM, Ridgway GR, et al. The progression of regional atrophy in premanifest and early Huntington's disease: a longitudinal voxel-based morphometry study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010;81:756-63.

45. Masucci EF, Borts FT, Kurtzke JF. CT brainstem abnormalities in the differential diagnosis of Huntington's disease. *Comput Med Imaging Graph* 1990;14:205-12.

46. Piccinin CC, Piovesana LG, Santos MC, et al. Diffuse decreased gray matter in patients with idiopathic craniocervical dystonia: a voxel-based morphometry study. *Front Neurol* 2014;5:283.

47. Muhlau M, Wohlschlager AM, Gaser C, et al. Voxel-based morphometry in individual patients: a pilot study in early Huntington disease. *AJNR Am J Neuroradiol* 2009;30:539-43.

48. Kassubek J, Juengling FD, Kioschies T, et al. Topography of cerebral atrophy in early Huntington's disease: a voxel based morphometric MRI study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75:213-20.

49. Ashburner J, Friston KJ. Voxel-based morphometry--the methods. *Neuroimage* 2000;11:805-21.

50. Henley SM, Wild EJ, Hobbs NZ, et al. Relationship between CAG repeat length and brain volume in premanifest and early Huntington's disease. *J Neurol* 2009;256:203-12.

51. Peinemann A, Schuller S, Pohl C, Jahn T, Weindl A, Kassubek J. Executive dysfunction in early stages of Huntington's disease is associated with striatal and insular atrophy: a neuropsychological and voxel-based morphometric study. *J Neurol Sci* 2005;239:11-9.

52. Douaud G, Gaura V, Ribeiro MJ, et al. Distribution of grey matter atrophy in Huntington's disease patients: a combined ROI-based and voxel-based morphometric study. *Neuroimage* 2006;32:1562-75.
53. Desmond JE, Gabrieli JD, Wagner AD, Ginier BL, Glover GH. Lobular patterns of cerebellar activation in verbal working-memory and finger-tapping tasks as revealed by functional MRI. *J Neurosci* 1997;17:9675-85.
54. Middleton FA, Strick PL. Cerebellar output channels. *Int Rev Neurobiol* 1997;41:61-82.
55. Ramnani N. The primate cortico-cerebellar system: anatomy and function. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:511-22.
56. Diedrichsen J. A spatially unbiased atlas template of the human cerebellum. *Neuroimage* 2006;33:127-38.
57. Guimaraes RP, D'Abreu A, Yasuda CL, et al. A multimodal evaluation of microstructural white matter damage in spinocerebellar ataxia type 3. *Mov Disord* 2013;28:1125-32.
58. Piccinin CC, Santos MC, Piovesana LG, et al. Infratentorial gray matter atrophy and excess in primary craniocervical dystonia. *Parkinsonism Relat Disord* 2014;20:198-203.
59. Diedrichsen J, Balsters JH, Flavell J, Cussans E, Ramnani N. A probabilistic MR atlas of the human cerebellum. *Neuroimage* 2009;46:39-46.
60. Bor-Seng-Shu E, Pedroso JL, Felicio AC, et al. Substantia nigra echogenicity and imaging of striatal dopamine transporters in Parkinson's disease: a cross-sectional study. *Parkinsonism Relat Disord* 2014;20:477-81.
61. Pedroso JL, Bor-Seng-Shu E, Braga-Neto P, et al. Neurophysiological studies and non-motor symptoms prior to ataxia in a patient with machado-joseph disease: trying to understand the natural history of brain degeneration. *Cerebellum* 2014;13:447-51.
62. Pedroso JL, Bor-Seng-Shu E, Felicio AC, et al. Substantia nigra echogenicity is correlated with nigrostriatal impairment in Machado-Joseph disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2013;19:742-5.
63. Bor-Seng-Shu E, Pedroso JL, Andrade DC, et al. Transcranial sonography in Parkinson's disease. *Einstein (Sao Paulo)* 2012;10:242-6.
64. Pedroso JL, Bor-Seng-Shu E, Felicio AC, et al. Severity of restless legs syndrome is inversely correlated with echogenicity of the substantia nigra in

different neurodegenerative movement disorders. a preliminary observation. *J Neurol Sci* 2012;319:59-62.

65. Pedroso JL, Bor-Seng-Shu E, Braga-Neto P, Teixeira MJ, Barsottini OG. Transcranial sonography: Brazilian experience. *Arq Neuropsiquiatr* 2012;70:313-4.

66. Pedroso JL, Bor-Seng-Shu E, Felicio AC, Braga-Neto P, Teixeira MJ, Barsottini OG. Transcranial sonography findings in spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease): a cross-sectional study. *Neurosci Lett* 2011;504:98-101.

67. Postert T, Lack B, Kuhn W, et al. Basal ganglia alterations and brain atrophy in Huntington's disease depicted by transcranial real time sonography. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999;67:457-62.

68. Krogias C, Eyding J, Postert T. Transcranial sonography in Huntington's disease. *Int Rev Neurobiol* 2010;90:237-57.

69. Walter U, Behnke S, Eyding J, et al. Transcranial brain parenchyma sonography in movement disorders: state of the art. *Ultrasound Med Biol* 2007;33:15-25.

70. Bartova P, Skoloudik D, Bar M, et al. Transcranial sonography in movement disorders. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2008;152:251-8.

71. Dexter DT, Jenner P, Schapira AH, Marsden CD. Alterations in levels of iron, ferritin, and other trace metals in neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. The Royal Kings and Queens Parkinson's Disease Research Group. *Ann Neurol* 1992;32 Suppl:S94-100.

72. Hilditch-Maguire P, Trettel F, Passani LA, Auerbach A, Persichetti F, MacDonald ME. Huntingtin: an iron-regulated protein essential for normal nuclear and perinuclear organelles. *Hum Mol Genet* 2000;9:2789-97.

73. Carroll JB, Bates GP, Steffan J, Saft C, Tabrizi SJ. Treating the whole body in Huntington's disease. *Lancet Neurol* 2015;14:1135-42.

74. Tumas V, Camargos ST, Jalali PS, Galesso Ade P, Marques Jr W. Internal consistency of a Brazilian version of the unified Huntington's disease rating scale. *Arq Neuropsiquiatr* 2004;62:977-82.

75. Memoria CM, Yassuda MS, Nakano EY, Forlenza OV. Brief screening for mild cognitive impairment: validation of the Brazilian version of the Montreal

cognitive assessment. *Int J Geriatr Psychiatry* 2013;28:34-40.

76. Strick PL, Dum RP, Fiez JA. Cerebellum and nonmotor function. *Annu Rev Neurosci* 2009;32:413-34.

77. Amarenco P, Chevrie-Muller C, Rouillet E, Bousser MG. Paravermal infarct and isolated cerebellar dysarthria. *Ann Neurol* 1991;30:211-3.

78. Baloh RW, Yee RD, Honrubia V. Late cortical cerebellar atrophy. Clinical and oculographic features. *Brain* 1986;109 (Pt 1):159-80.

79. Diener HC, Dichgans J, Bacher M, Guschlbauer B. Characteristic alterations of long-loop "reflexes" in patients with Friedreich's disease and late atrophy of the cerebellar anterior lobe. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1984;47:679-85.

80. Mauritz KH, Dichgans J, Hufschmidt A. Quantitative analysis of stance in late cortical cerebellar atrophy of the anterior lobe and other forms of cerebellar ataxia. *Brain* 1979;102:461-82.

81. Victor M, Adams RD. The effect of alcohol on the nervous system. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 1953;32:526-73.

82. Urban PP, Marx J, Hunsche S, et al. Cerebellar speech representation: lesion topography in dysarthria as derived from cerebellar ischemia and functional magnetic resonance imaging. *Arch Neurol* 2003;60:965-72.

83. Ackermann H, Vogel M, Petersen D, Poremba M. Speech deficits in ischaemic cerebellar lesions. *J Neurol* 1992;239:223-7.

84. Amarenco P, Hauw JJ. Cerebellar infarction in the territory of the superior cerebellar artery: a clinicopathologic study of 33 cases. *Neurology* 1990;40:1383-90.

85. Pandey S. Chorea. *J Assoc Physicians India* 2013;61:471-4, 83.

86. Tu Y, Yu T, Wei Y, Sun K, Zhao W, Yu B. Structural brain alterations in hemifacial spasm: A voxel-based morphometry and diffusion tensor imaging study. *Clin Neurophysiol* 2016;127:1470-4.

87. Tükel R, Aydın K, Yuksel C, Ertekin E, Koyuncu A, Tas C. Gray matter abnormalities in patients with social anxiety disorder: A voxel-based morphometry study. *Psychiatry Res* 2015;234:106-12.

88. Jia X, Liang P, Li Y, Shi L, Wang D, Li K. Longitudinal Study of Gray Matter Changes in Parkinson Disease. *AJNR Am J Neuroradiol* 2015;36:2219-26.

89. Baumann O, Borra RJ, Bower JM, et al. Consensus paper: the role of the cerebellum in perceptual processes. *Cerebellum* 2015;14:197-220.
90. Lappin JM, Morgan K, Morgan C, et al. Gray matter abnormalities associated with duration of untreated psychosis. *Schizophr Res* 2006;83:145-53.
91. Stoodley CJ, Valera EM, Schmahmann JD. An fMRI study of intra-individual functional topography in the human cerebellum. *Behav Neurol* 2010;23:65-79.
92. Stoodley CJ, Schmahmann JD. Functional topography in the human cerebellum: a meta-analysis of neuroimaging studies. *Neuroimage* 2009;44:489-501.
93. Dubas-Slemp H, Tylec A, Michalowska-Marmurowska H, Spsychalska K. [Is Huntington's disease a neurological or psychiatric disorder? case report]. *Psychiatr Pol* 2012;46:915-22.
94. Stoodley CJ, Schmahmann JD. Evidence for topographic organization in the cerebellum of motor control versus cognitive and affective processing. *Cortex* 2010;46:831-44.
95. Babb TL, Mitchell AG, Jr., Crandall PH. Fastigiobulbar and dentatothalamic influences on hippocampal cobalt epilepsy in the cat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1974;36:141-54.
96. Berman AJ. Amelioration of aggression: response to selective cerebellar lesions in the rhesus monkey. *Int Rev Neurobiol* 1997;41:111-9.
97. Bobee S, Mariette E, Tremblay-Leveau H, Caston J. Effects of early midline cerebellar lesion on cognitive and emotional functions in the rat. *Behav Brain Res* 2000;112:107-17.
98. Moruzzi G. [Not Available]. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1947;23:213.
99. Zanchetti A, Zoccolini A. Autonomic hypothalamic outbursts elicited by cerebellar stimulation. *J Neurophysiol* 1954;17:475-83.
100. Levisohn L, Cronin-Golomb A, Schmahmann JD. Neuropsychological consequences of cerebellar tumour resection in children: cerebellar cognitive affective syndrome in a paediatric population. *Brain* 2000;123 (Pt 5):1041-50.
101. Parvizi J, Joseph J, Press DZ, Schmahmann JD. Pathological laughter and crying in patients with multiple system atrophy-cerebellar type. *Mov Disord* 2007;22:798-803.

102. Parvizi J, Schiffer R. Exaggerated crying and tremor with a cerebellar cyst. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2007;19:187-90.
103. Rapoport M, van Reekum R, Mayberg H. The role of the cerebellum in cognition and behavior: a selective review. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2000;12:193-8.
104. Schmahmann JD, Sherman JC. The cerebellar cognitive affective syndrome. *Brain* 1998;121 (Pt 4):561-79.
105. Schmahmann JD, Weilburg JB, Sherman JC. The neuropsychiatry of the cerebellum - insights from the clinic. *Cerebellum* 2007;6:254-67.
106. Steinlin M, Imfeld S, Zulauf P, et al. Neuropsychological long-term sequelae after posterior fossa tumour resection during childhood. *Brain* 2003;126:1998-2008.
107. Desmurget M, Pelisson D, Grethe JS, et al. Functional adaptation of reactive saccades in humans: a PET study. *Exp Brain Res* 2000;132:243-59.
108. Schlerf JE, Galea JM, Spampinato D, Celnik PA. Laterality Differences in Cerebellar-Motor Cortex Connectivity. *Cereb Cortex* 2015;25:1827-34.
109. Schlerf J, Wiestler T, Verstynen T, Diedrichsen J. Big Challenges from the “Little Brain” — Imaging the Cerebellum. *Advanced Brain Neuroimaging Topics in Health and Disease - Methods and Applications*, capítulo 8, 2014, 199-223.

Anexo 1

FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Avaliação comparativa entre a morfometria baseada em voxel (VBM) e a ultrassonografia transcraniana em indivíduos com Doença de Huntington

Pesquisador: Paula Christina de Azevedo

Área Temática: Área 1. Genética Humana.

(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

Versão: 2

CAAE: 17118813.1.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da UNICAMP

Patrocinador Principal: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 350.198

Data da Relatoria: 15/08/2013

Apresentação do Projeto:

A Doença de Huntington (DH) é uma doença neurodegenerativa, de origem autossômica dominante. Suas principais manifestações são de origem motora, cognitiva e psiquiátrica, sendo alguns exemplos deles a coreia, instabilidade de marcha, instabilidade postural, impersistência motora, disartria, disfagia, aerofagia, ataxia, distonia, tiques, mioclonias, apatia, parkinsonismo, perda de memória, depressão, declínio intelectual, alucinações e paranoia. Estima-se que acometa de 8 a 10/100.000 indivíduos. O diagnóstico se dá através de exames de genética molecular. Tem início geralmente na quarta década de vida.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar as alterações cerebrais existentes na doença de Huntington, através de duas técnicas de análise de neuroimagem: a morfometria baseada em voxels (VBM) através da ressonância magnética (RM) e a ultrassonografia transcraniana (UTC) do núcleo caudato, da rafe mesencefálica (RMe) e da substância nigra pars compacta (SNc).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A ressonância magnética não é uma radiação ionizante, mas apresenta ruído intermitente durante os primeiros 15 minutos do exame. Depois disso o ruído é muito menor. O pessoal técnico

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



Continuação do Parecer: 350.198

providenciará tapa-ouvidos propiciar maior conforto ao participante. Não existem efeitos nocivos associados à ressonância magnética, dentro das condições utilizadas atualmente. Serão monitorizados a respiração, batimentos cardíacos e a quantidade de oxigênio do sangue do participante. O risco de sedação é pequeno, mas pode envolver diminuição da quantidade de oxigênio no organismo e parada respiratória.

A ultrassonografia transcraniana não oferece riscos, não emite radiação e não causa desconforto.

Não haverá benefícios diretos aos sujeitos da pesquisa, mas o estudo poderá gerar informações importantes para possibilitar melhor diagnóstico e, futuramente, tratamento mais adequado da doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Serão selecionados pacientes com diagnóstico de Doença de Huntington, com confirmado através de exame molecular. Os indivíduos passarão por exame neurológico, avaliação psiquiátrica, exame de RM e de UTC. Os dados obtidos das avaliações serão armazenados, para posterior análise estatística.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto devidamente assinada e adequada.

Projeto original e gerado pela Plataforma Brasil: adequados.

TCLE: embora longo, está redigido em linguagem compreensível, com detalhes sobre os procedimentos a serem realizados com os participantes, incluindo as providências a serem tomadas, caso ocorra intercorrências que exijam cuidados médicos.

O TCLE, em sua versão corrigida, informa que sujeito da pesquisa e pesquisador deverão assinar o documento, ficando uma via para cada um destes. Informa ainda que menores de idade ou incapacitados terão o TCLE assinado pelo seu respectivo responsável LEGAL.

Recomendações:

Se o TCLE tiver mais de uma página, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, e o pesquisador responsável deverão rubricar todas as folhas desse documento, apondo suas assinaturas na última página do referido termo.

Ao pesquisador cabe desenvolver o projeto conforme delineado, elaborar e apresentar os relatórios parciais e final, bem como encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



Continuação do Parecer: 350.198

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado, após resolução de pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 06 de Agosto de 2013

Assinador por:
Fátima Aparecida Bottcher Luiz
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Anexo 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: **Avaliação cerebelar por morfometria baseada em voxel (VBM) e correlação entre marcadores clínicos e achados da ultrassonografia transcraniana em indivíduos com Doença de Huntington.**

Investigador principal: Paula Christina de Azevedo

Orientador: Dra. Anelyssa D'Abreu

Co-Orientador: Dra. Íscia Lopes-Cendes

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu _____

entendo que fui convidado (a) a participar em um projeto de pesquisa envolvendo pacientes com doença de Huntington. O objetivo geral do estudo é o de avaliar as alterações que ocorrem no cérebro dos pacientes que apresentam esta doença. A avaliação das imagens pode levar a um melhor conhecimento sobre a doença de Huntington e pode no futuro 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 para outros fins de pesquisa sobre a doença de Huntington, desde que este novo projeto tenha aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da FCM-Unicamp. O sigilo será mantido em todos os estudos colaborativos através da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes.

Os objetivos principais deste estudo são:

- Identificar alterações na ressonância magnética que possam ajudar a entender melhor as causas da doença de Huntington;
- Entender como as alterações de neuroimagem refletem os diferentes sintomas apresentados pelos pacientes.

Este estudo envolve a realização de:

- Avaliação clínica, com revisão da história clínica, e exame neurológico detalhado;
- Realização de ressonância magnética: é uma técnica capaz de produzir imagens de alta qualidade e resolução (nitidez) anatômica, assim como informações sobre os tecidos. Essas imagens também poderão produzir informações que serão úteis para melhor definição do diagnóstico e tratamento;
- Realização de ultrassonografia transcraniana: é uma técnica capaz de produzir imagens com informações sobre a densidade do tecido cerebral e que também poderão produzir informações que serão úteis para melhor definição do diagnóstico e tratamento.

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 e 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 aparelho de ressonância magnética 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 ansiedade por permanecer em local fechado. 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.

Durante o procedimento de ultrassonografia transcraniana, eu fui informado que ficarei deitado em uma maca em um ambiente com luz reduzida, enquanto o transdutor da ultrassonografia será apoiado delicadamente na região lateral da minha cabeça, não emitirá sons e nem radiação. O procedimento pode durar entre 15 a 20 minutos e será realizado por profissional treinado.

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, em longo prazo, oferecer vantagens para os indivíduos com doença de Huntington, possibilitando um melhor diagnóstico e futuramente um tratamento mais adequado. Os resultados

de meus exames ficarão a disposição dos médicos responsáveis pelo meu tratamento, e poderão ser úteis no futuro.

RISCO E DESCONFORTO:

O único desconforto relacionado a ressonância magnética 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. 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. Caso eu não consiga permanecer dentro da máquina de ressonância pelo tempo necessário, ou não tolere o barulho, e mesmo assim eu deseje participar do estudo, eu posso optar por ser

sedado com medicação. Eu entendo que um médico permanecerá na sala de controle junto ao técnico durante todo o exame, e que minha respiração, meus batimentos cardíacos e a quantidade de oxigênio no meu sangue serão constantemente monitorizados. O risco de sedação é pequeno, mas pode envolver diminuição da quantidade de oxigênio no organismo e parada respiratória. Caso isso ocorra, há ambu na sala de ressonância para ventilação e eu serei imediatamente transferido para o pronto socorro. Após a ressonância eu somente serei liberado para casa após avaliação médica. A ultrassonografia transcraniana não oferece riscos, não emite radiação, não causa desconforto.

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 pedir informações adicionais relativas ao estudo a qualquer momento. A Paula Christina de Azevedo (19) 3521-7754, 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. Eu receberei uma cópia deste documento para ser arquivado e consultado

em caso de dúvidas.

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.

ACEITAÇÃO DE PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

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 que venham desse projeto de pesquisa. Eu concordo com a realização da coleta de sangue e da ressonância magnética. Eu afirmo que li e compreendi esse formulário de consentimento e estou de 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

Anexo 3

MONTREAL COGNITIVE ASSESSMENT (MOCA)
Versão Experimental BrasileiraNome: _____
Escolaridade: _____
Sexo: _____Data de nascimento: ____/____/____
Data de avaliação: ____/____/____
Idade: _____

VISUOESPACIAL / EXECUTIVA		Copiar o cubo		Desenhar um RELÓGIO (onze horas e dez minutos) (3 pontos)		Pontos
				[] [] [] Contorno Números Ponteiros		___/5
NOMEAÇÃO						
						___/3
MEMÓRIA Leia a lista de palavras, o sujeito de repeti-la, faça duas tentativas. Evocar após 5 minutos.		1ª tentativa 2ª tentativa	Rosto Veludo Igreja Margarida Vermelho	Sem Pontuação		
ATENÇÃO Leia a sequência de números (1 número por segundo). O sujeito deve repetir a sequência em ordem direta [] 2 1 8 5 4. O sujeito deve repetir a sequência em ordem indireta [] 7 4 2.		Leia a série de letras. O sujeito deve bater com a mão (na mesa) cada vez que ouvir a letra "A". Não se atribuem pontos se ≥ 2 erros. [] F B A C M N A A J K L B A F A K D E A A A J A M O F A A B				___/2
Subtração de 7 começando pelo 100 [] 93 [] 86 [] 79 [] 72 [] 65 4 ou 5 subtrações corretas: 3 pontos; 2 ou 3 corretas 2 pontos; 1 correta 1 ponto; 0 corretas 0 ponto						___/3
LINGUAGEM Repetir: Eu somente sei que é João quem será ajudado hoje. [] O gato sempre se esconde embaixo do sofá quando o cachorro está na sala. []						___/2
Fluência verbal: dizer o maior número possível de palavras que comecem pela letra F (1 minuto). [] _____ (N ≥ 11 palavras)						___/1
ABSTRAÇÃO Semelhança p. ex. entre banana e laranja = fruta [] trem - bicicleta [] relógio - régua						___/2
EVOCAÇÃO TARDIA Deve recordar as palavras SEM PISTAS		Rosto Veludo Igreja Margarida Vermelho	Pontuação apenas para evocação SEM PISTAS		___/5	
OPCIONAL Pista de categoria Pista de múltipla escolha						
ORIENTAÇÃO [] Dia do mês [] Mês [] Ano [] Dia da semana [] Lugar [] Cidade						___/6
© Z. Nasreddine MD www.mocatest.org Versão experimental Brasileira: Ana Luisa Rosas Sarmento Paulo Henrique Ferreira Bertolucci - José Roberto Wajman (UNIFESP-SP 2007)						TOTAL Adicionar 1 pt se ≤ 12 anos de escolaridade ___/30

Anexo 4

Retorno-Doença de Huntington

MOTOR:

Seguimento ocular(horizantal)

0. Completa
1. movimento irregular
2. interrompido, movimento sem limitações
3. movimento restrito
4. não pode prosseguir

Seguimento ocular (vertical)

0. Completa
1. movimento irregular
2. interrompido, movimento sem limitações
3. movimento restrito
4. não pode prosseguir

Sacada-Iniciação (horizantal)

0. normal
1. aumento da latência
2. piscamentos abolicíveis / movimentos de cabeça para iniciar
3. movimentos da cabeça não abolicíveis
4. não pode iniciar sacadas

Sacada Iniciação (vertical)

0. normal
1. aumento da latência
2. piscamentos abolicíveis / movimentos de cabeça para iniciar
3. movimentos da cabeça não abolicíveis
4. não pode iniciar sacadas

Sacada velocidade (horizantal)

0. Normal
1. Leve desaceleração
2. Moderada desaceleração
3. Grave desaceleração, movimento sem limitações
4. Movimento restrito

Sacada Velocidade (vertical)

0. Normal
1. Leve desaceleração
2. Moderada desaceleração
3. Grave desaceleração, movimento sem limitações
4. Movimento restrito

Disartria

0. Normal
1. Alterada, não há necessidade de repetir
2. Deve repetir para ser compreendido
3. Incompreensível maior parte do tempo

Protrusão de língua

0. Protrusão >10s
1. Protrusão >5s e <10s
2. Protrusão <5s
3. Não consegue protruir língua totalmente
4. Não consegue protruir língua além dos lábios

Distonia (máxima) Tronco:

0. Ausente
1. Leve/intermitente
2. Leve/contínua ou moderada/intermitente
3. Moderada/contínua
4. Grave

Distonia (máxima)-Extremidades:

0. Ausente
1. Leve/intermitente
2. Leve/contínua ou moderada/intermitente
3. Moderada/contínua
4. Grave

Coréia (máxima)-Face:

0. Ausente
1. Leve/intermitente
2. Leve/contínua ou moderada/intermitente
3. Moderada/contínua
4. Grave

Coréia (máxima)-boca:

0. Ausente
1. Leve/intermitente
2. Leve/contínua ou moderada/intermitente
3. Moderada/contínua
4. Grave

Coréia (máxima)-tronco:

0. Ausente
1. Leve/intermitente
2. Leve/contínua ou moderada/intermitente
3. Moderada/contínua
4. Grave

Coréia (máxima)-extremidades:

0. Ausente
1. Leve/intermitente
2. Leve/contínua ou moderada/intermitente
3. Moderada/contínua
4. Grave

Retropulsão:

0. Normal
1. Recuperação espontânea
2. Cairia se examinador não segurasse
3. Tendência a queda espontânea
4. Não fica do pé

Toque dos dedos: D=

E=

0. Normal (>15/5s)
1. Desaceleração leve e/ou redução de amplitude (11-14/5s)
2. Alteração moderada. Fadigamento precoce. Pode ter interrupção do movimento (<10/5s)
3. Alteração grave. Hesitação frequente no início ou interrupção durante movimento (3-9/5s)
4. Não consegue realizar teste (0-2/5s)

Pronação-supinação: D=

E=

0. Normal
1. Desaceleração leve e/ou irregular
2. Desaceleração moderada e irregular
3. Desaceleração grave e irregular
4. Não consegue realizar teste

Linha:

0. ≥4 em 10s, sem pista
1. <4 em 10s, sem pista
2. ≥4 em 10s, com pista
3. <4 em 10s, com pista

Rigidez (MMSS): D=

E=

0. Ausente
1. Leve ou presente com ativação
2. Leve ou moderada
3. Grave, movimento sem restrições
4. Grave, com restrição do movimento articular

Bradicinesia:

0. Normal
1. Identificação mínima (normal?)
2. Leve, mas anormal
3. Identificação moderada, alguma hesitação
4. Identificação grave, atraso no início dos movimentos

Marcha:

0. Normal
1. Base alargada e/ou lenta
2. Base alargada anda com dificuldade
3. Anda somente com auxílio
4. Não anda

Marcha Tandem (10 passos):

0. Normal
1. 1-3 desvios da linha média
2. > 3 desvios
3. Não consegue completar
4. Não consegue realizar

HI:

CONJUNTA:

Anexo 5

Sintomas	Gravidade:	Frequência:
	0. Ausente;	0. Quase nunca;
	1. Leve/questionável;	1. Raro;
	2. Leve;	2. Às vezes;
	3. Moderada;	3. Frequentemente;
	4. Grave.	4. Quase sempre.
Humor triste, voz/expressão tristes; choro; inabilidade de se divertir.		
Baixa auto- estima/culpa: culpa a si mes- mo, comporta- mento autode- preciativo (acredita ser uma pessoa ruim ou não digna), sensação de fracasso.		
Ansiedade: preocupações recorrentes, antecipa o pior.		
Ideação suicida: acha que não vale a pena viver, tem pensamen- tos suicidas, tem ideação/plano, preparação para o ato.		

Agressividade,
comportamento
inadequado:
ameaçador,
violência física,
discurso explo-
sivo, linguagem
vulgar, amea-
çadora e inade-
quada.

Irritabilidade:
impaciência,
inflexibilidade,
impulsividade,
falta de cooper-
ação.

Obsessões:
idéias,
pensamento e
imagens
persistentes e
recorrentes.
Compulsões:
comportamentos
repetitivos e
intencionais.

Ilusões: idéias
falsas fixas não
compartilhada
culturalmente.

Alucinações:
percepção de
qualquer um dos
cinco sentidos,
sem que haja
estímulo.

Anexo 6

Cerebellar gray matter alterations in Huntington Disease: a voxel-based morphometry study

Paula C. Azevedo, MD^{1,2}; Rachel P. Guimarães, PhD¹; Camila C. Calligari¹; Lidiane S. Campos², MD; Luiza G. Piovesana², MD; Eliza M. Tamashiro², MD; Augusto C. Amato-Filho³, MD; Fernando Cendes^{1,2}, MD, PhD; Iscia Lopes-Cendes, MD, PhD⁴; Anelyssa D'Abreu^{1,2}, MD, PhD, MPH.

¹Neuroimaging Laboratory; ²Department of Neurology; ³Department of Radiology; ⁴ Department of Medical Genetics - University of Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, BRAZIL
Campinas, SP, Brazil. Postal code: 13083-887.

Word count:

Number of words in abstract: 150

Number of words in main text: 1699

Number of references: 40

Number of figures: 1

Number of tables: 1

Running title: 11

None of the authors have conflicts of interest directly related to the development of the manuscript. Full disclosure statement can be found at the end of the manuscript.

*Corresponding Author:

Anelyssa D'Abreu, MD, PhD, MPH

Neuroimaging Laboratory – UNICAMP – University of Campinas,

Rua Vital Brasil, 251, Cidade Universitária Zeferino Vaz

Campinas, SP, Brazil 13083-887

Phone: +55 19 3521 8242

E-mail: anelyssa@gmail.com

Abstract

Introduction: Neuropathological and neuroimaging studies in Huntington disease (HD) have demonstrated a cerebellar role. However, its involvement in disease pathophysiology is unclear.

Methods: We performed Unified HD rating scale-UHDRS and MOCA in 26 HD patients and 26 controls. We created a two-sample test to analyze cerebellar gray matter (GM) differences between groups and another to correlate GM alterations with UHDRS and MOCA, corrected for age, cytosine-adenine-guanine repeats and disease duration using the spatially unbiased atlas template (SUIT)-SPM-toolbox which preserve anatomical detailing.

Results: We found increased GM density at the anterior cerebellum compared to controls. Higher GM density in the postero-superior lobe correlated to mood symptoms. Worse motor function and better cognitive function correlated with GM changes in the posterior cerebellum ($p < 0.001$ and $k > 100$ voxels).

Conclusions: We observed GM changes in cerebellar regions involved in sensorimotor integration, motor planning and emotional processing, suggesting cerebellar involvement in the neuropathological process of HD.

Keywords: Huntington disease; cerebellum; SUIT; UHDRS; MOCA.

Introduction

Huntington disease (HD) is an autosomal dominant neurodegenerative disease, caused by a cytosine-adenine-guanine (CAG) triplet expansion in

the short arm of chromosome 4p16.3, in the Huntingtin (HT) gene. The expanded triplet with 36 repeats or greater confirms the molecular diagnosis of the disease (1). In addition, there is an inverse relationship between the number of triplet repeats with age of disease onset (2, 3) and the severity of clinical manifestations (4). HD is characterized by a neuropsychiatric syndrome that includes motor, cognitive and psychiatric symptoms, with chorea as the main motor manifestation (5).

The symptoms are largely explained by degeneration preferentially present in caudate, putamen, globus pallidus, thalamus and amygdala (6, 7). Although the HT is less frequent in the cerebellum (8, 9) than in these other brain areas mentioned above, there is cerebellar atrophy in early stages of HD independent of the degree of striatal degeneration (10). Cerebellar atrophy is directly associated with psychiatric symptoms in early phase of disease, (11, 12, 13, 14) and autopsy studies have showed atrophy of the paravermis and deep cerebellar nuclei (10, 15, 16).

Voxel based morphometry (VBM) is an excellent imaging analysis tool (17, 18, 19) and several studies have used it to study morphological changes in HD (17, 20, 21). However, it is not the best choice to evaluate the posterior fossa (22, 23, 24). SUIT is a spatially unbiased, high-resolution atlas template of the human cerebellum and brainstem, which maintains the anatomical detail of cerebellar structures (25). Multiple neuroimaging studies have benefited from this tool, but it has never been used in HD (26, 27, 28).

Our goal was to perform a detailed study of cerebellar morphology, using the SUIT toolbox, and to perform a clinical-anatomical correlation.

Methods

Subjects: The Institutional Review Board of our University Hospital approved the study and all subjects signed an informed consent. We recruited 26 right-handed patients (12 male; 49.42 ± 10.83 years) with molecularly confirmed HD (paternal and indeterminate inheritance were respectively 46.15% and 11.53%) and clinical signs of the disease from our Neuroge-

netics Outpatient Clinic between 2013 and 2015. The mean age of symptom onset was 40.23 ± 9.79 years and mean CAG repeat number was 42 ± 3.79 . Exclusion criteria were a history of alcohol abuse, other previous or current neurologic and psychiatric disorders, major comorbidities, or contraindications to having magnetic resonance imaging (MRI). We also included 26 controls, perfectly matched for gender and age, without personal or family history of neurological disorders and with normal neurological examination.

Clinical Assessment: We conducted interviews with subjects, family members and caregivers, as well as checked their CAG repeat size, professional and family history, environmental and drug exposure, medication and clinical comorbidities. A neurologist expert in Movement Disorders performed a comprehensive neurologic examination and applied a specific clinical rating scale for HD - Unified Huntington's Disease Rating Scale (UHDRS), which includes motor and psychiatric evaluations, properly validated in Portuguese (29). For cognitive assessment we used the Montreal Cognitive Assessment (MOCA).

MRI acquisition protocol: Images were acquired at a 3T Achieva MR unit-PHILIPS Intera®, release 2.6.1.0. In addition to the usual diagnostic sequences, we obtained volumetric T1-weighted image, with isotropic voxels of 1mm^3 , acquired in sagittal plane (1mm thick, flip angle 8° , TR 7.1, TE3.2, matrix 240×240 , and FOV 240×240 mm). An experienced neuro-radiologist assessed all images, blindly, to rule out other neurological diseases and artifacts.

VBM-SUIT tool: The images were divided into patients and controls. Each subject was treated at level of voxel-by-voxel. The 3D-MRI images acquired in DICOM format were transformed to NIfTI (DCM2Nii software: <http://www.mccauslandcenter.sc.edu/mricro/mricron/dcm2nii.html>). In order to minimize any error chances, the images were aligned along the anterior commissure and rotated in sagittal, coronal and axial planes. We used the SUIT tool which isolates the infratentorial structures from surrounding tissue and generates targeted maps (gray matter, white matter and cerebrospinal fluid), providing a more accurate alignment between subjects than “whole-brain” methods

(<http://www.icn.ucl.ac.uk/motorcontrol/imaging/suit.htm>). The SUI tool classifies the cerebellar lobules more precisely than other VBM techniques (27, 28). The segmented gray matter (GM) images were normalized to the SUI template. Then, we repositioned the generated maps to correct the variation of induced spatial normalization volume. Next, we conducted homogeneity tests using the images covariance. Finally, the images were smoothed by a Gaussian filter kernel with 8 mm full-width half maximum (FWHM) contained in SPM8 / Dartel (<http://www.fil.ion.ucl.ac.uk>) to satisfy the normal distribution assumed for statistical analysis of regional differences. The generated statistical parametric map identifies regions with significant differences in cerebellum.

Statistical analysis: Using SPM8, we created a two-sample test corrected for age for voxel-by-voxel analysis and detection of GM differences between the groups. A statistical parametric map was generated, which identified the cerebellar regions with significant differences (p uncorrected < 0.001 , extent threshold $k \geq 100$ voxels). Anatomical localizations of cerebellar lobules and vermis were determined by the Probabilistic MRI atlas of human cerebellum by Diedrichsen et al (30).

Results

We only considered clusters ≥ 100 voxels. We found increased GM ($p < 0.05$; FEW correction) in regions I-IV of the cerebellar lobes bilaterally compared to controls (Table 1). There was no atrophy ($p < 0.05$; FEW correction). However, when we ran the analysis with less strict limits, (p uncorrected < 0.001 , extent threshold $k \geq 100$ voxels), we observed GM decrease in regions VI on the right and V-VI on the left (Table 1).

A two-sample test correlated the following clinical variables with GM density, adjusted for age, disease duration and CAG repeat number simultaneously (table 1 and figure 1):

a) UHDRS-Mood score: the mean score was 10 ± 7.55 . Mood score was higher in subjects with higher GM density in region Crus II on the right. In region VI on the left the higher the mood scores, the lower the GM density.

b) UHDRS-Motor score: the mean score was 21 ± 4.24 . We found

that the higher the GM density in vermis regions VIII and IX, the higher the motor scores. Whereas, the lower the GM density in Crus I and II, IV, V, VI, VIIb and VIII, at right, the greater the motor score.

c) MOCA score: the mean score was 22 ± 2.12 . Subjects with higher cognitive scores had higher GM density in the left region VIII.

Discussion

While most previous studies found cerebellar atrophy in HD, we observed mostly increased GM density at the anterior cerebellum, compared to controls. We only observed atrophy with a less restrictive analysis. Higher GM density in the postero-superior lobe was associated with mood disorders symptoms; worse motor function correlated with GM density alterations in the central portion of the postero-inferior lobe and lateral portion of the postero-superior lobe on the right; and better cognitive function with higher GM density in the left side of the postero-inferior lobe. The GM density excess was found symmetrically in regions I-IV of anterior cerebellar lobe. The subarea III, mainly lobule IV are directly involved in upper limb motor control (31). Gait and appendicular ataxia, dysarthria, as well as the control of tongue movements and orofacial muscles are directly related to the integrity of these regions (32).

We found atrophy mostly in areas VI of posterior cerebellar lobes bilaterally and V of anterior cerebellar lobe on the left. Both are part of the sensorimotor cerebellum, directly involved in learning and cognitive processing (34). These areas are also indirectly attached to prefrontal cortex through the dentatorubralthalamic tract, and the ventral portion of dentate nucleus is the interface between these two areas (31).

We demonstrated that UHDRS-mood scores were higher in subjects with lower GM density in region VI on the left, which is directly involved in processing, empathy and perception of emotional intonation (33, 34) and higher GM density in region Crus II on the right, which is connected to the posterior parietal and prefrontal cortices – limbic areas (35).

There was a positive correlation between UHDRS-motor score and the GM density in vermic areas VIII and IX. Curiously, these areas are known as the limbic portion of the cerebellum and are responsible for affective

processing, and, with other posterior cerebellar regions, participate in higher cognitive tasks (36). Structural posterior vermic lesions are the anatomical substrate of the cerebellar cognitive affective syndrome (37). Since none of those areas are primarily related to motor function, it is possible they are markers of disease severity, and there was some collinearity between motor and non-motor scores.

We noted that higher motor scores were associated with lower GM density affecting a large cerebellar region: crus I and II, IV, V, VI, VIII and VIIb on the right and VI, VIIb and VIII on the left. These areas are involved in motor control (regions I-V, with a secondary representation in VIIIa/b lobules), multiple domain executive function (lobules VI and VII), saccades refinement and sequential movements of hands (medially) and feet (laterally) (lobules VI and crus I), which include motor control and motor behavioral action (38, 39). The ipsilateral somatotopic cerebellar representation justifies the right-sided predominance (38). Together, those areas are responsible for fine motor control, more complex and elaborate activities as well as sensorimotor learning.

Patients with higher MOCA scores had higher GM density in lobule VIII on the left, which is involved in sensitivomotor tasks and working memory (38), suggesting a cerebellar role in cognitive dysfunction in HD.

This study is the first to provide a detailed assessment of the cerebellum in HD (10, 11, 40). Even those that exclusively evaluated the cerebellum (11), only observed white matter changes, using a volumetric approach, rather than a voxel-by-voxel comparison. The SUIT tool isolates the cerebellum from other brain structures, providing a topographic detailing of each cerebellar lobe, and assessing both GM increases and reductions. We interpreted our GM excess results as a compensatory mechanism or as a structural anatomical breakdown caused by the disease, these findings may also have been influenced by reduced mean time of disease duration in our sample.

The major limitation of our study was the small number of subjects. This may account for the negative findings for GM atrophy with FWE correction. However, HD is a relatively rare disease and it is very difficult to perform MRI without sedation in some subjects.

In summary, we observed that cerebellum is most likely associated with HD pathophysiology, not only in its motor component, but also in its psychiatric and cognitive manifestations.

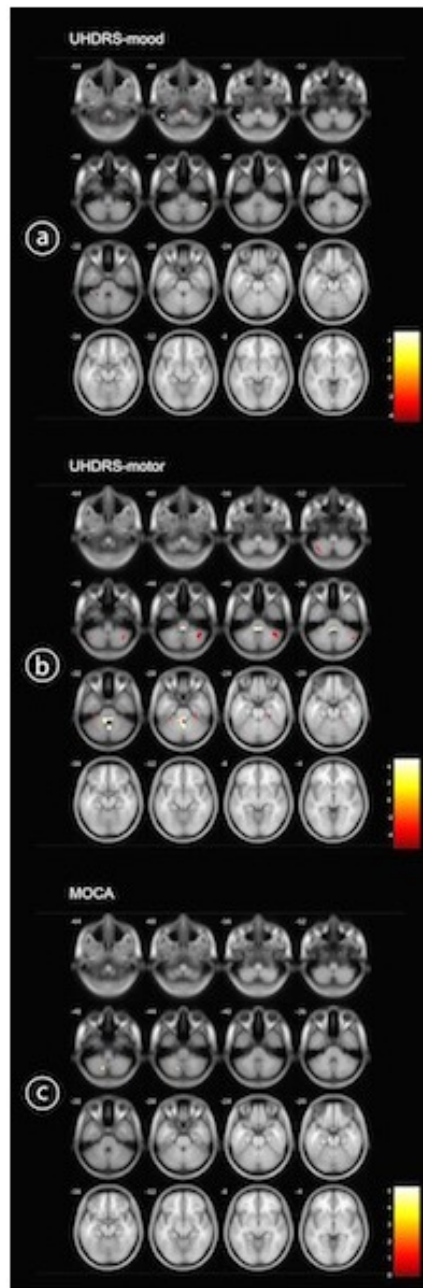


Figure 1: a) Negative (red) and positive (yellow) correlation between UHDRS-mood score and GM density; b) Negative (red) and positive (yellow) correlation between UHDRS-motor score and GM density; c) Positive (yellow) correlation between MOCA score and GM density; UHDRS - unified Huntington's disease rating scale; MOCA - Montreal cognitive assessment; GM - gray matter.

Table 1: Results of VBM (SUIT tool) and clinical correlations

MNI peak co- ordinates <i>x y z</i>	Cluster	Voxels	AAL
General analysis			
GM excess areas using $p < 0.05$ FWE corrected and $K > 100$ voxels			
0 -47 -21	5491	378	R lobules I-IV
10 -36 -47	4895	357	L lobules I-IV
GM decrease areas using $p < 0.001$ and $K > 100$ voxels			
-18 -46 -9	11426	246	R lobule VI
16 -64 -9	6052	143	L lobule V
-4 -51 2	12562	121	L lobule VI
Clinical correlations using $p < 0.001$ and $K > 100$ voxels			
Positive correlation: UHDRS-mood score and GM			
48 -43 -46	297	233	R lobule crus II
Negative correlation: UHDRS-mood score and GM			
-26 -44 -31	180	119	L lobule VI
Positive correlation: UHDRS-motor score and GM			
3 -60 -31	2783	315 191	Vermis- lobule VIII Vermis-lobule IX
Negative correlation: UHDRS-motor score and GM			
39 -60 -51	590	383 197	L lobule VII b L lobule VIII
38 -53 -45	1635	393 382 368 334	R lobule crus II R lobule VIII R lobule VII b R lobule crus I
28 -32 -26	624	401 107	R lobules IV/V R lobule VI
-30 -37 -30	276	201	L lobule VI
Positive correlation: MOCA and GM			
-13 -65 -47	247	247	L lobule VIII

VBM: voxel-based morphometry; SUIT: spatially unbiased atlas template; FWE: family wise error; K: Extent threshold; AAL: Automated anatomical labeling; GM: gray matter; R: right; L: left; UHDRS: unified Huntington's disease rating scale; MOCA: Montreal cognitive assessment.

Author roles:

1- Research Project

- a- Conception: Paula Christina de Azevedo; Anelyssa D'Abreu; Íscia Lopes Cendes;
- b- Organization: Paula Christina de Azevedo; Anelyssa D'Abreu; Rachel Paes Guimarães; Íscia Lopes Cendes;
- c- Execution: Paula Christina de Azevedo; Rachel Paes Guimarães; Camila C Callegari; Lidiane S Campos; Luiza G Piovesana; Eliza M. Tamashiro; Augusto C Amato-Filho;

2- Estatistical analysis:

- a- Design: Paula Christina de Azevedo; Anelyssa D'Abreu
- b- Execution: Paula Christina de Azevedo; Rachel Paes Guimarães;
- c- Review and critique: Anelyssa D'Abreu; Íscia Lopes Cendes; Fernando cendes.

3- Manuscript preparation:

- a- Writing of the first draft: Paula Christina de Azevedo; Anelyssa D'Abreu;
- b- Review and critique: Rachel P Guimarães; Camila C Callegari; Lidiane S Campos; Luiza G Piovesana; Eliza M. Tamashiro; Augusto C Amato-Filho; Fernando Cendes; Iscia Lopes-Cendes; Anelyssa D'Abreu.

References

- 1) Roos A.C.R. Huntington's disease: a clinical review. Orphanet Journal of Rare Diseases, 2010, 5:40;
- 2) Duyao M., Ambrose C., Myers R., et al. Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. Nat Genet1993;4: 387–392;
- 3) Stine O.C., Pleasant N., Franz M.L., Abbott M.H., Folstein S.E., Ross C.A. Correlation between the onset age of Huntington's disease and length of the trinucleotide repeat in IT-15. Hum. Mol. Genet., 1993, 2(10): 1547-49;

- 4) Furtado S., Suchowersky O., Rewcastle N.B., et al. Relationship between trinucleotide repeats and neuropathological changes in Huntington's disease. *Ann Neurol* 1996;39:132–136;
- 5) Fahn S. & Jankovic J. *Principles and Practice of Movement Disorders*, 2007;
- 6) Bhide P.G., Day M., Sapp E., Schwarz C., Sheth A., Kim J., et al. Expression of normal and mutant huntingtin in the developing brain. *J Neurosci* 1996; 16: 5523-35;
- 7) Sapp E., Schwarz C., Chase K., Bhide PG., Young AB, Penney J., et al. Huntingtin localization in brains of normal and Huntington's disease patients. *Ann Neurol* 1997; 42: 604-12;
- 8) Graveland G.A., Williams R.S. and DiFiglia M. Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease. *Science*, 1985, 227, 770–773;
- 9) Vonsattel J.P. & DiFiglia M., Huntington disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1998, 57, 369–384;
- 10) Rüb U., Hoche F., Brunt E.R., Heinsen H., Seidel K., Turco D.D., Paulson H.L., Bohl J., Gall C., Vonsattel J.P., Korf H.W., Dunnen W.F. Degeneration of the Cerebellum in Huntington's Disease (HD): Possible Relevance for the Clinical Picture and Potential Gateway to Pathological Mechanisms of the Disease Process, *Brain Pathology*, 2013, 23:165–177;
- 11) Rees E.M., Farmer R., Cole J.H., Haider S., Durr A., Landwehrmeyer B., Scahill R.I., Tabrizi S.J., Hobbs N.Z. Cerebellar Abnormalities in Huntington's Disease: A Role in Motor and Psychiatric Impairment? *MovDisord*, 2014, 29(13): 1648-54;
- 12) Lauterbach EC. Bipolar disorders, dystonia, and compulsion after dysfunction of the cerebellum, dentatorubrothalamic tract, and substantia nigra. *Biol Psychiatry* 1996;40:726-730;
- 13) Kutty IN, Prendes JL. Psychosis and cerebellar degeneration. *J Nerv Mental Dis* 1981;169:390-391;
- 14) Starkstein SE, Robinson RG, Berthier ML, Price TR. Depressive disorders following posterior circulation as compared with middle cerebral-artery infarcts. *Brain* 1988;111:375-387;

- 15) Jeste DV, Barban L, Parisi J. Reduced Purkinje cell density in Huntington's disease. *Exp Neurol* 1984;85;
- 16) Rodda R.A. Cerebellar atrophy in Huntington's disease. *J Neurol Sci*, 1981, 50:147-157;
- 17) Mühlau M., Wohlschläger A.M., Gaser C., Valet M., Weindl A., Nunnemann S., Peinemann A., Etgen T., Ilg R. Voxel-Based Morphometry in Individual Patients: A Pilot Study in Early Huntington Disease. *Journal of Neuroradiology*, 2009, 30:539–43;
- 18) Kassubek J., Juengling F.D., Kioschies T., Henkel K., Karitzky J., Kramer B., Ecker D., Andrich J., Saft C., Kraus P., Aschoff A.J., Ludolph A.C., Landwehrmeyer G.B. Topography of cerebral atrophy in early Huntington's disease: a voxel based morphometric MRI study. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 2004; 75: 213–220;
- 19) Ashburner J. & Friston K.J. Voxel-Based Morphometry — The Methods. *Journal of NeuroImage* 11, 2000, 805–821;
- 20) Henley S.M.D., Wild E.J., Hobbs N.Z., Scahill R.I., Ridgway G.R., MacManus D.G., Barker R.A., Fox N.C., Tabrizi S.J. Relationship between CAG repeat length and brain volume in pre-manifest and early Huntington's disease. *Journal of Neurology*, 2009, 256:203–212;
- 21) Peinemann A., Schuller S., Pohl C., Jahn T., Weindl A., Kassubek J. Executive dysfunction in early stages of Huntington's disease is associated with striatal and insular atrophy: A neuropsychological and voxel-based morphometric study. *Journal of the Neurological Sciences* 2005, 239, 11-19;
- 22) Desmond JE, Gabrieli JD, Wagner AD, Ginier BL, Glover GH. Lobular patterns of cerebellar activation in verbal working-memory and finger-tapping tasks as revealed by functional MRI. *J Neurosci*. 1997 Dec 15;17(24):9675-85;
- 23) Middleton F.A. and Strick P.L. Cerebellar output channels. *Int Rev Neurobiol*. 1997;41:61-82;
- 24) Ramnani N. The primate cortico-cerebellar system: anatomy and function. *Nat Rev Neurosci*. 2006 Jul;7(7):511-22;

- 25)Diedrichsen, J. A spatially unbiased atlas template of the human cerebellum. *NeuroImage*, 2006, 33 (1), 127–138;
- 26)Piccinin C.C., Santos M.C.A., Piovesana L.G., Campos L.S., Guimarães R.P., Campos B.M., Torres F.R., França M.C., Amato-Filho A.C., Lopes-Cendes I., Cendes F., D’Abreu A. Infratentorial gray matter atrophy and excess in primary craniocervical dystonia. *Parkinsonism and Related Disorders*, 2014, 20:198-203;
- 27)Piccinin C.C., Piovesana L.G., Santos M.C.A., Guimarães R.P., Campos L.S., Campos B.M., Rezende T.J.R., Campos L.S., Torres F.R., Amato-Filho A.C., França M.C., Lopes-Cendes I., Cendes F., D’Abreu A. Diffuse decreased gray matter in patients with idiopathic craniocervical dystonia: a voxel-based morphometry study. *Front Neurol*. 2015 Jan 8;5:283;
- 28)Guimarães R.P., D’Abreu A., Yasuda C.L., França Jr M.C., Silva B.H.B., Cappabianco F.A.M., Bergo F.P.G., Lopes-Cendes I.T., Cendes F. A multimodal evaluation of microstructural white matter damage in spinocerebellar ataxia type 3. *Mov Disord*, 2013, 28(8): 1125-32;
- 29)Tumas V., Camargos S.T., Jalali P.S., Galesso A.P., Wilson Marques Jr W. Internal consistency of a brazilian version of the Unified Huntington’s Disease Rating Scale. *Arquivos de Neuropsiquiatria*, 2004; 62(4): 977-982;
- 30)Diedrichsen J., Balster J.H., Flavell J., Cussans E., Ramnani N. A probabilistic MR atlas of the human cerebellum. *Neuroimage*, 2009, 46:39-16;
- 31)Strick P.L., Dum R.P., Fiez J.A. Cerebellum and nonmotor function. *Annu. Rev. Neurosci.*, 2009, 32:413–34;
- 32)Baloh R., Yee R., Honrubia V. Late cortical cerebellar atrophy. *Brain*, 1986, 109:159–180;
- 33)Stoodley C., Schmahmann J.D. Evidence for topographic organization in the cerebellum of motor control versus cognitive and affective processing. *National Institute of Health Public Access*, 2010, 46(7): 831-844;

- 34) Singer T, Seymour B, O'Doherty J, Kaube H, Dolan R, Frith C. Empathy for pain involves the affective but not sensory components of pain. *Science* 2004;303:1157–1162;
- 35) Kelly R, Strick P. Cerebellar loops with motor cortex and prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience* 2003;23:8432–8444;
- 36) Bobee S, Mariette E, Tremblay-Leveau H, Caston L. Effects of early midline cerebellar lesion on cognitive and emotional functions in the rat. *Behavioural Brain Research* 2000;112:107–117;
- 37) Schmahmann JD, Sherman JC. The cerebellar cognitive affective syndrome. *Brain* 1998;121:561–579;
- 38) Stoodley CJ, Schmahmann JD. Functional topography in the human cerebellum: A meta-analysis of neuroimaging studies. *NeuroImage* 2009a;44:489–501;
- 39) Schlerf J, Wiestler T, Verstynen T and Diedrichsen J. Big Challenges from the “Little Brain” — Imaging the Cerebellum. *Advanced Brain Neuroimaging Topics in Health and Disease - Methods and Applications*, chapter 8, 2014, 199-223;
- 40) Fennema-Notestine C, Archibald SL, Jacobson MW, Corey-Bloom J, Paulsen JS, Peavy GM, Gamst AC, Hamilton JM, Salmon DP, Jernigan TL. In vivo evidence of cerebellar atrophy and cerebral white matter loss in Huntington disease. *Neurology*. 2004 Sep 28;63(6):989-95.