



Estudo Longitudinal de Neuroimagem em Pacientes SCA1

Palavras-chave: SCA1, MRI, longitudinal

Aluna: Bruna Rezende Santos, RA: 167848 - UNICAMP

Orientador: Marcondes Cavalcante Franca Junior - Hospital de Clínicas - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A ataxia espinocerebelar tipo 1 (SCA1) é um dos subtipos de um grupo de distúrbios neurodegenerativos, de caráter progressivo e de hereditariedade autossômica dominante: as ataxias espinocerebelares (SCAs).¹ A baixa prevalência dessa condição na população dificulta a realização de estudos com coortes numerosas, sobretudo os histopatológicos. Em vista disso, por serem de fácil análise *in vivo*, as manifestações clínicas passaram a ser usadas como principal medida de progressão da doença, por meio de escalas padronizadas, como a “Scale for the Assessment of Rating Ataxia” (SARA)². No entanto, estudos recentes mostram que Imagens de Ressonância Magnética (MRI) são um meio seguro e sensível para se quantificar essa progressão, inclusive em pacientes pré-sintomáticos.^{3,4,5} Essas análises, por outro lado, são ainda pouco numerosas, o que tornam necessários mais estudos com MRI, principalmente os longitudinais, para possibilitar a identificação de biomarcadores de maior tamanho de efeito, o que é importante tanto para a melhor caracterização dos danos causados pela doença, quanto para o desenvolvimento de tratamentos.^{4,6,7,8} Este estudo, portanto, se propõe a identificar alterações longitudinais na substância cinzenta em uma coorte de pacientes com SCA1.

OBJETIVOS DA PESQUISA

Este estudo se propõe a analisar uma coorte de pacientes SCA1 por meio da escala padronizada para exame físico de pacientes com ataxia “Scale for the Assessment of Rating Ataxia” (SARA)^{2,9} e de sua correlação com imagens de ressonância magnética (Magnetic Resonance Imaging – MRI) para identificar alterações longitudinais em substância cinzenta.

MÉTODOS DA PESQUISA

Seleção dos sujeitos

Nós recrutamos 11 pacientes adultos com confirmação molecular de SCA1, que são regularmente acompanhados nos hospitais da UNICAMP, e 11 controles saudáveis pareados por sexo e idade. Ambos pacientes e controles foram examinados e passaram por exame de MRI na primeira e na última visita após seguimento médio de 5 anos. Em ambas as visitas dados clínicos como tempo de doença, duração e severidade da doença (quantificada pela escala SARA^{2,9}) foram obtidos. Somente a quantificação do tamanho da expansão do triplete de CAG foi quantificado na primeira visita do paciente. Este protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de nossa instituição de número CAAE 83241318.3.1001.5404. Foi obtido de cada participante um consentimento informado e escrito. Nenhum dos controles tinha histórico familiar de doenças neurológicas. Foram excluídos indivíduos com quaisquer contraindicações para a realização do exame de MRI, aqueles cujas imagens apresentem artefatos significativos de movimento ou que não tenham assinado o termo de consentimento.

	Pacientes		Controles Saudáveis		Valor p (teste t) (pacientes x controles)
	Tempo zero	Seguimento	Tempo zero	Seguimento	
Análise demográfica	N=11	N=11	N=11	N=11	
Idade (média±DP, anos)	46.8±10.8	52.1±11.3	42.2±14.5	46.9±14.1	0.07
Sexo (M:F)	5:06	5:06	4:07	4:07	0.16*
Idade de início (média±DP, anos)	40,2±12,3	40,2±12,3	-	-	-
Duração da doença (média±DP, anos)	5.0±4.2	10.5±4.9	-	-	-
CAGn média±DP	42.5±0.7	42.5±0.7	-	-	-
SARA (média±DP)	11.2±1.4	20.5±4.9	-	-	-
Intervalo entre MRI (média±DP, anos)	5.4±0.9	5.4±0.9	4.7±0.8	4.7±0.8	0.17

Tabela 1 - Análise demográfica de pacientes e controles saudáveis.

Aquisição das Imagens

As aquisições das imagens de ressonância magnética foram realizadas em um equipamento de 3 Teslas Achieva (Philips, Holanda). Foi utilizada uma bobina padrão de cabeça com 8 canais com capacidade para aplicar a técnica SENSE. Foram adquiridas imagens ponderadas em T1 (avaliação substância cinzenta). Os seguintes parâmetros foram utilizados:

- Sequência T1 volumétrica (3D) do crânio: espessura entre os cortes de 1 mm, TE=3.2ms, TR=7.1ms, ângulo de excitação (flip angle) 8°, voxels isotrópicos de 1 x 1 x 1 mm e FOV = 240x240.
- Além disso, imagens de rotina T1 e T2 foram adquiridas também a fim de excluir qualquer achado incidental que não tenha relação com a doença (microsangramentos, doenças de substância branca).

Segmentação

As imagens adquiridas (T1) foram processadas usando os seguintes softwares: FreeSurfer para avaliar a segmentação da substância cinzenta (GM) cerebral, córtex e núcleos profundos; Acapulco para avaliar o córtex cerebelar.

Substância Cinzenta Cerebral

FreeSurfer

As medidas de espessura foram obtidas através do software FreeSurfer (versão 6.0) descritos pelos protocolos propostos por Fischl and Dale, 2000 e Fischl et al. 1999b. Resumidamente, as imagens são corrigidas para inhomogeneidades do campo magnético, alinhadas ao atlas de Talairach e Tournoux¹⁰ e é feita a remoção de tecido não cerebral (skullstrip). Em seguida, há a segmentação dos voxels em GM, WM e CSF, os quais são identificados baseados na sua localização, na sua intensidade e na intensidade dos voxels vizinhos. Uma rede de faces de triângulos é construída em torno da superfície de WM, onde cada voxel é caracterizado por 2 triângulos. A rede, por sua vez, é suavizada usando um algoritmo que leva em consideração a intensidade local na imagem original¹¹, para uma resolução subvoxel, usando interpolação trilinear. A fim de garantir que a superfície possui as mesmas propriedades topológicas de uma esfera, os defeitos topológicos (buracos na superfície) são corrigidos¹². Neste sentido, uma representação mais realística da interface entre GM e WM é necessária. Portanto, uma segunda interação de suavização é aplicada produzindo, assim, uma superfície chamada White Surface. Neste contexto, a superfície cortical externa, a qual compreende a pia mater, é produzida empurrando (nudging outwards) a White Surface rumo a pia mater em um ponto onde o contraste do tecido é máximo.¹³ Esta superfície recebe o nome de pial surface.

Essa superfície é, então, segmentada em pequenas regiões neuroanatômicas, segundo Desikan et al. 2006, usando um processo automatizado proposto por Fischl et al., 2004. Para isto, a pial surface é mapeada homeomorficamente (homeomorphically map ping) em um sistema de coordenadas esféricas¹⁴, ou seja, a pial surface é inflada na forma de uma esfera, e os padrões de dobramento são correspondidos à um atlas de probabilidades. Com isso, por meio de um processo de segmentação 11 Bayesiano, é atribuída para cada vértice uma marcação neuroanatômica que, por sua vez, possuem seus rótulos confrontados com relação à atribuição de seus vizinhos utilizando, para isto, um algoritmo de Campos Aleatórios de Markov.^{15,16} A espessura cortical é calculada, então, como a menor distância entre a pial e white surface para cada vértice

através do manto cortical. Para todas as análises, os mapas serão suavizados usando um filtro de kernel Gaussiano através da superfície com um FWHM de 10 mm e com uma média entre os sujeitos.

Substância Cinzenta Cerebelar

Acapulco

A volumetria cerebelar foi calculada por meio do software Automatic Cerebellum Anatomical Parcellation using U-Net with locally constrained optimization (Acapulco), que é um software baseado em algoritmos deep learning dedicado a segmentar e quantificar os lóbulos cerebelares.¹⁷ O pipeline segue o protocolo descrito por Han e colegas. Em resumo, é criada uma máscara cerebral usando o Robust Brain Extraction (ROBEX)¹⁷ seguido por uma correção de inhomogeneidade de campo usando o algoritmo N444. Em seguida, a imagem do sujeito é registrada linearmente no espaço MNI usando o software ANTs¹⁸, o Acapulco emprega o template ICBM 2009c de 1 mm isotrópico. O parcelamento cerebelar é feito usando duas redes neurais convolucionais 3D que são retro projetadas para o espaço original usando o software ANTs novamente.¹⁷ O Acapulco calcula o volume de cada lóbulo cerebelar para ambos os hemisférios.

Análise estatística

Para todas as análises, subtraímos as medidas obtidas na primeira RM (t1) da segunda RM (t2) para cada paciente e cada controle. O resultado encontrado foi utilizado para avaliar as diferenças entre os grupos (pacientes vs controles). Antes disto, verificamos se os dados seguiam a distribuição normal por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. Notamos que a maioria dos dados seguem uma distribuição não-paramétrica e, portanto, utilizamos o teste de Mann-Whitney para comparação de grupos. Antes da comparação, removemos efeitos de idade, gênero e tamanho da cabeça de todos os dados usando um modelo linear geral. O nível de significância, alfa, foi ajustado para $P < 0,05$ e utilizamos o teste de Bonferroni para remover efeitos de múltiplas comparações.

RESULTADOS

Não houve diferença de idade entre os grupos de pacientes e controles saudáveis para a primeira imagem e para a segunda (Tabela 1). Não houve diferença na proporção dos gêneros e no tempo de seguimento entre os grupos (Tabela 1).

A ataxia foi o principal sintoma em todos os casos, com distúrbios da marcha, incoordenação axial e apendicular. Todos os pacientes apresentavam sinais piramidais, com reflexos exaltados, entretanto, espasticidade não foi encontrada. A diferença média nas pontuações SARA entre os tempos foi de 9,3 pontos (variando de 3 à 17), o que dá uma razão de 1,72/ano. O valor mínimo foi observado em paciente pré-sintomático com pequeno número de repetição CAGn (40) e o maior valor foi encontrado no paciente com maior número de repetição CAGn (49).

Para a análise dos dados do FreeSurfer, foi possível usar as ressonâncias de todos os 11 pacientes. No entanto, para as análises do Acapulco, houve erros significativos de segmentação em um dos indivíduos, e tivemos que realizar os cálculos com um N de 10 pacientes. Para as análises de imagem, não encontramos nenhum resultado significativo após correção para múltiplas comparações. Porém, devido ao pequeno tamanho amostral e raridade da doença iremos reportar alguns resultados que encontramos após análise de grupo.

Acapulco - Média e DP da diferença entre volumes final e inicial			
Córtex Cerebelar			
Estruturas	Pacientes	Controles	Valor-P
Lobo I-III esquerdo	-64,4 ± 49,0	-18,6 ± 56,4	0,009175
Lobo IV esquerdo	-122,3 ± 210,9	125,8 ± 205,1	0,048644
Lobo VIIB esquerdo	-682,2 ± 574,2	-181,5 ± 272,0	0,04114
Lobo IV direito	-49,2 ± 217,8	78,2 ± 230,1	0,048644
Lobo VIIB direito	-369,8 ± 313,5	-14,7 ± 85,6	0,048644

Tabela 2 – Resultados da análise das segmentações obtidas pelo Acapulco.

FreeSurfer - Média e DP da diferença entre volumes final e inicial			
Substância Cinzenta Profunda			
Estruturas	Pacientes	Controles	Valor-P
Putamen direito	-563,8 ± 341,8	-73,1 ± 93,7	0,027823
Hipocampo direito	-285,7 ± 208,7	-3,2 ± 95,5	0,011468
Diencéfalo ventral esquerdo	-403,1 ± 279,2	-24,1 ± 113,4	0,023486
Córtex cingulado anterior	-45,7 ± 28,6	5,1 ± 30,3	0,00281
Tronco encefálico	-1870,2 ± 1097,6	-156,8 ± 409,5	0,011468
Substância Cinzenta de Córtex Esquerdo			
Estruturas	Pacientes	Controles	Valor-P
Giro pré-central	-0,175 ± 0,140	-0,013 ± 0,087	0,027823
Polo occipital	0,105 ± 0,121	-0,047 ± 0,094	0,019748

Tabela 3 – Resultados da análise das segmentações obtidas pelo FreeSurfer.

FreeSurfer

Na análise de GM do córtex cerebral, obtivemos diferença $P < 0,05$ apenas no hemisfério esquerdo, nas seguintes estruturas: giro precentral ($p = 0,030$) e pólo occipital ($p = 0,020$). Já na GM profunda, obtivemos diferença significativa em tronco encefálico ($p = 0,01$), córtex cingulado anterior ($p = 0,003$), diencéfalo ventral esquerdo ($p = 0,020$), hipocampo direito ($p = 0,010$) e putâmen direito ($p = 0,030$).

Acapulco

Na análise do volume do córtex cerebelar pelo Acapulco, nós obtivemos o resultado $p < 0,05$ em: lóbulos I-III esquerdos ($p = 0,009$), Lóbulo IV esquerdo ($p = 0,049$), lóbulo IV direito ($p = 0,049$), lóbulo VIIIB esquerdo ($p = 0,041$) e lóbulo VIIIB direito ($p = 0,049$).

DISCUSSÃO

O resultado da aplicação da escala clínica SARA nos nossos pacientes foi coincidente com a relação inversamente proporcional, já relatada em outros artigos, entre o número de repetições CAG e a idade de início dos sintomas bem como de sua progressão.^{3,5}

Não obtivemos nenhum resultado significativo ($p < 0,05$) ao aplicarmos as correções de múltiplas comparações. Podemos relacionar este fato ao número reduzido de indivíduos em nossa coorte. Por ser uma doença de desenvolvimento lento, com um tempo longo de progressão dos sintomas, torna-se difícil encontrar mudanças longitudinais.

Uma das dificuldades em se realizar pesquisa com a SCA-1 é justamente o fato de ser uma doença rara. Além disso, os sintomas se iniciam em idades mais avançadas e as próprias manifestações da doença podem impedir a realização de um exame demorado, que exige uma posição estática, como a MRI. Como consequência, torna-se difícil recrutar pacientes e acompanhá-los por um bom período de tempo.

Alguns dos pacientes de quem já havíamos obtido a primeira ressonância vieram a óbito neste período de seguimento. Além disso, alguns deles possuem graves dificuldades de locomoção devido ao agravamento progressivo da ataxia, o que impossibilita a realização da ressonância. Outros pacientes se recusaram a realizar o exame devido à claustrofobia.

Vale destacar, porém, as regiões que obtivemos diferenças significativas entre pacientes e controles, mesmo sem a aplicação das correções, uma vez que elas coincidem com as áreas de perda volumétrica já descritas em outras pesquisas com pacientes SCA-1, além de se relacionarem com os sintomas dos pacientes. Encontramos diferenças já esperadas em córtex cerebelar, substância cinzenta de tronco encefálico, regiões de córtex cerebral, como já descrito em pesquisas anteriores.^{4,6,7,8}

CONCLUSÃO

Não obtivemos resultados longitudinais significativos após correção para múltiplas comparações. Outros estudos futuros são necessários, com uma maior coorte e também com a avaliação da substância branca sobretudo com técnicas de difusão (DTI).

REFERÊNCIAS

- 1) RICH, S. S.; WILKIE, P.; SCHUT, L.; VANCE, G. *et al.* Spinocerebellar ataxia: localization of an autosomal dominant locus between two markers on human chromosome 6. *Am J Hum Genet*, 41, n. 4, p. 524-531, Oct 1987.
- 2) SCHMITZ-HÜBSCH, T.; DU MONTCEL, S. T.; BALIKO, L.; BERCIANO, J. *et al.* Scale for the assessment and rating of ataxia: development of a new clinical scale. *Neurology*, 66, n. 11, p. 1717-1720, Jun 2006.
- 3) SCHÖLS, L.; BAUER, P.; SCHMIDT, T.; SCHULTE, T. *et al.* Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol*, 3, n. 5, p. 291-304, May 2004.
- 4) DEELCHAND, D. K.; JOERS, J. M.; RAVISHANKAR, A.; LYU, T. *et al.* Sensitivity of Volumetric Magnetic Resonance Imaging and Magnetic Resonance Spectroscopy to Progression of Spinocerebellar Ataxia Type 1. *Mov Disord Clin Pract*, 6, n. 7, p. 549-558, Sep 2019.
- 5) JACOBI, H.; DU MONTCEL, S. T.; BAUER, P.; GIUNTI, P. *et al.* Long-term disease progression in spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6: a longitudinal cohort study. *Lancet Neurol*, 14, n. 11, p. 1101-1108, Nov 2015.
- 6) JACOBI, H.; REETZ, K.; DU MONTCEL, S. T.; BAUER, P. *et al.* Biological and clinical characteristics of individuals at risk for spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6 in the longitudinal RISCA study: analysis of baseline data. *Lancet Neurol*, 12, n. 7, p. 650-658, Jul 2013.
- 7) MORIARTY, A.; COOK, A.; HUNT, H.; ADAMS, M. E. *et al.* A longitudinal investigation into cognition and disease progression in spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, 6, and 7. *Orphanet J Rare Dis*, 11, n. 1, p. 82, 06 2016.
- 8) MARTINS JUNIOR, C. R.; MARTINEZ, A. R. M.; VASCONCELOS, I. F.; DE REZENDE, T. J. R. *et al.* Structural signature in SCA1: clinical correlates, determinants and natural history. *J Neurol*, 265, n. 12, p. 2949-2959, Dec 2018.
- 9) BRAGA-NETO, P.; GODEIRO-JUNIOR, C.; DUTRA, L. A.; PEDROSO, J. L. *et al.* Translation and validation into Brazilian version of the Scale of the Assessment and Rating of Ataxia (SARA). *Arq Neuropsiquiatr*, 68, n. 2, p. 228-230, Apr 2010.
- 10) TALAIRACH, J.; TOURNOUX, P. *Co-planar Stereotaxic Atlas of the Human Brain*, Thieme, NY. 1988.
- 11) DALE, A. M.; SERENO, M. I. Improved Localization of Cortical Activity by Combining EEG and MEG with MRI Cortical Surface Reconstruction: A Linear Approach. *J Cogn Neurosci*, 5, n. 2, p. 162-176, 1993.
- 12) FISCHL, B.; LIU, A.; DALE, A. M. Automated manifold surgery: constructing geometrically accurate and topologically correct models of the human cerebral cortex. *IEEE Trans Med Imaging*, 20, n. 1, p. 70-80, Jan 2001.
- 13) FISCHL, B.; DALE, A. M. Measuring the thickness of the human cerebral cortex from magnetic resonance images. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, n. 20, p. 11050-11055, Sep 2000.
- 14) FISCHL, B.; SERENO, M. I.; TOOTELL, R. B.; DALE, A. M. High-resolution intersubject averaging and a coordinate system for the cortical surface. *Hum Brain Mapp*, 8, n. 4, p. 272-284, 1999.
- 15) FISCHL, B.; SALAT, D. H.; BUSA, E.; ALBERT, M. *et al.* Whole brain segmentation: automated labeling of neuroanatomical structures in the human brain. *Neuron*, 33, n. 3, p. 341-355, Jan 2002.
- 16) FISCHL, B.; VAN DER KOUWE, A.; DESTRIEUX, C.; HALGREN, E. *et al.* Automatically parcellating the human cerebral cortex. *Cereb Cortex*, 14, n. 1, p. 11-22, Jan 2004.
- 17) HAN, S.; CARASS, A.; HE, Y.; PRINCE, J. L. Automatic cerebellum anatomical parcellation using U-Net with locally constrained optimization. *Neuroimage*, 218, p. 116819, 09 2020.
- 18) TUSTISON, N. J.; COOK, P. A.; KLEIN, A.; SONG, G. *et al.* Large-scale evaluation of ANTs and FreeSurfer cortical thickness measurements. *Neuroimage*, 99, p. 166-179, Oct 01 2014.