



**Thiago Junqueira Ribeiro de Rezende**

**“Investigação do Dano Cortical  
Cerebral e Cerebelar em  
Pacientes com Doença de  
Machado-Joseph”**

**CAMPINAS**

**2014**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

**Thiago Junqueira Ribeiro de Rezende**

# **“Investigação do Dano Cortical Cerebral e Cerebelar em Pacientes com Doença de Machado-Joseph”**

**Orientador: Prof. Dr. Marcondes Cavalcante F. Junior**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Gabriela Castellano**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de *Mestre em Ciências*.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO THIAGO JUNQUEIRA RIBEIRO DE REZENDE E ORIENTADO PELO PROF. DR. MARCONDES CAVALCANTE FRANÇA JUNIOR

Assinatura do Orientador

---

**CAMPINAS**

**2014**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

R339i Rezende, Thiago Junqueira Ribeiro de, 1988-  
Investigação do dano cortical cerebral e cerebelar  
em pacientes com doença de Machado-Joseph / Thiago  
Junqueira Ribeiro de Rezende. -- Campinas, SP : [s.n.],  
2014.

Orientador : Marcondes Cavalcante França Junior.  
Coorientador : Gabriela Castellano.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Córtex cerebral. 2. Doença de Machado-Joseph.  
3. FreeSurfer (Software). 4. Espessura cortical. 5.  
Testes neuropsicológicos. I. França Junior, Marcondes  
Cavalcante. II. Castellano, Gabriela, 1970-. III.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Investigation of cortical and cerebellar brain damage in patients with Machado-Joseph disease

**Palavras-chave em inglês:**

Cerebral cortex

Machado-Joseph disease

FreeSurfer, Software

Cortical thickness

Neuropsychological tests

**Área de concentração:** Fisiopatologia Médica

**Titulação:** Mestre em Ciências

**Banca examinadora:**

Marcondes Cavalcante França Junior [Orientador]

Roberto José Maria Covolan

Luiz Eduardo Gomes Garcia Betting

**Data de defesa:** 16-04-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Fisiopatologia Médica

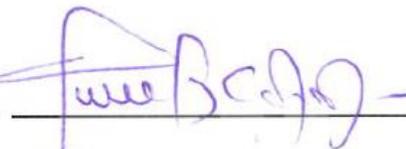
# BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

THIAGO JUNQUEIRA RIBEIRO DE REZENDE

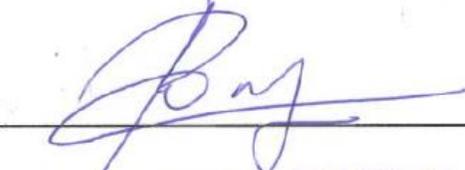
Orientador (a) PROF(A). DR(A). MARCONDES CAVALCANTE FRANCA JUNIOR

## MEMBROS:

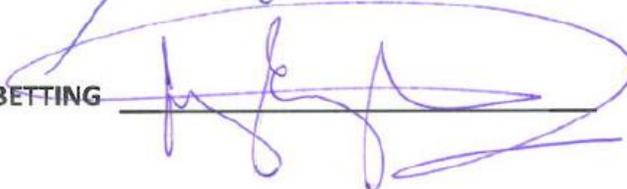
1. PROF(A). DR(A). MARCONDES CAVALCANTE FRANCA JUNIOR



2. PROF(A). DR(A). ROBERTO JOSE MARIA COVOLAN



3. PROF(A). DR(A). LUIZ EDUARDO GOMES GARCIA BETTING



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

Data: 16 de abril de 2014



## DEDICATÓRIA

À Deus por sempre  
iluminar meus passos,

À minha mãe, Regiane, e  
avós, Jairo e Leila, pelo  
exemplo de vida e apoio na  
realização deste sonho,

À Maria Cristina, pelo  
incentivo e apoio.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, a Deus por sempre me iluminar e cuidar de mim em todos os momentos.

A minha mãe e avós por serem exemplos de vida, caráter e dedicação. Obrigado por fazerem de mim o que sou hoje, devo tudo a vocês. Amo vocês!!!

A Maria Cristina, minha morena, por todo apoio, incentivo, paciência, dedicação e carinho. Minha evolução deve muito ao seu esforço. Te amo muito, Morena!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcondes, grande amigo, conselheiro e exemplo de pessoa e profissional, pela paciência infinita, incentivo e compreensão.

A minha orientadora, Profa. Dra. Gabriela, por ser um anjo na minha vida me dando a oportunidade de realizar este mestrado, além de toda paciência e conselhos.

Ao Rodolfo, um grande irmão que tenho o prazer de ter em minha vida, pelo apoio, amizade interminável, paciência, conselhos e ajudas inimagináveis, inclusive na realização deste trabalho. E como você sempre diz, “é uma cilada, Bino!”

A FAMÍLIA mais unida deste mundo, família França-Jr! Meus grandes irmãos, Raphael, Milena, Albertão e Marcelão, pelo apoio, paciência, confidências e risadas (que foram muitas).

Aos meus grandes amigos, Felipe Paiva e Brunno Campos, por toda ajuda e paciência, tenho uma enorme dívida com vocês.

Ao Thalles Andrade, grande amigo que me acompanha com paciência e bom humor durante todos estes anos.

Ao Prof. Dr. Jun Takahashi, por ser o grande responsável pela motivação diária que tenho em me tornar um físico médico de verdade.

Ao Prof. Dr. Everardo, por ser o grande responsável da minha inserção no meio acadêmico.

A minha segunda família, Rickson, David e Pedro e Vinícius, por todos os momentos e risadas. Vocês são especiais demais!

Aos colegas do Laboratório de Neuroimagem e Laboratório de Física Médica que de alguma forma contribuíram para este trabalho. Em especial agradeço ao Felipe Bergo por toda ajuda e paciência.

Aos pacientes e seus familiares.

*“If you want to be successful, it’s just this simple. Know what you are doing. Love what you are doing. And believe in what you are doing.”*

*Will Rogers (1879 - 1935)*

## Sumário

<b>Resumo .....</b>	<b>15</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>17</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>19</b>
<b>Objetivo Geral .....</b>	<b>32</b>
<b>Objetivos Específicos .....</b>	<b>32</b>
<b>Aspectos éticos da pesquisa.....</b>	<b>34</b>
<b>Seleção das Imagens .....</b>	<b>34</b>
<b>Seleção de controles.....</b>	<b>35</b>
<b>Estudo de Imagem.....</b>	<b>35</b>
<b>Aquisição.....</b>	<b>35</b>
<b>Dados Clínicos.....</b>	<b>35</b>
<b>Dados Neuropsicológicos.....</b>	<b>36</b>
<b>Espessura Cortical .....</b>	<b>36</b>
<b>Volume Subcortical .....</b>	<b>38</b>
<b>Análise de Correlação .....</b>	<b>39</b>
<b>Conclusão .....</b>	<b>73</b>
<b>Anexo .....</b>	<b>85</b>
<b>Anexo – Scripts.....</b>	<b>86</b>
<b>Script 1 – Roda Protocolo Estudo Transversal no FreeSurfer</b>	<b>86</b>
<b>Script 2 – Roda Estudo Longitudinal no FreeSurfer .....</b>	<b>88</b>
<b>Script 3 – Extrai Dados de ROIs Desenhados no FreeSufer ....</b>	<b>93</b>
<b>Script 4 – Roda o Protocolo FDT do FSL (TBSS).....</b>	<b>95</b>
<b>Script 5 – Roda o Protocolo TBSS do FSL.....</b>	<b>99</b>

## **Lista de Abreviaturas**

ASF – Fator de Escala do Atlas

BAI – *Beck Anxiety Inventory*

BDI – *Beck Depression Inventory*

CAG – Citosina-Adenina-Guanina

CAM – Campos Aleatórios de Markov

CCAS – *Cerebellar Cognitive Affective Syndrome*

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CSF – Líquor

DTI – *Diffusion Tensor Imaging*

eTIV – *Estimated Total Intracranial Volume*

FCM-UNICAMP – Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

FDG – Fluorodesoxiglicose

FOV – Campo de Visão

FWHM – *Full Width at Half-Maximum*

GLM – *General Linear Model*

GM – Substância Cinza

HC-UNICAMP – Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas

ICARS – *International Cooperative Ataxia Rating Scale*

MRI – *Magnetic Resonance Imaging*

OEP - Oftalmoplegia Externa Progressiva

PET – *Positron Emission Tomography*

SARA – Escala de avaliação e graduação de ataxia (Scale for the assessment and rating of ataxia)

SCA – Ataxia Espinocerebelar

SCA3/MJD – Doença de Machado-Joseph

SPECT – *Single Photon Emission Tomography*

TBSS – *Tract-Based Spatial Statistics*

TE – Tempo ao Eco

TR – Tempo de Repetição

VBM – Morfometria Baseada em Voxel

WM – Substância Branca

## **Lista de Figuras**

<b>Figura 1:</b> Distribuição epidemiológica de SCAs no Brasil .....	23
<b>Figura 2:</b> Correlação entre o tamanho do triplete de CAG e a idade de início da doença. ....	26
<b>Figura 3:</b> Map for group difference between patients and controls regarding cortical thickness. (Figure 1 - paper) .....	65

## Lista de Tabelas

<b>Table 1:</b> Demographics Data .....	59
<b>Table 2:</b> <i>Gyral-based areas with cortical thinning in patients with MJD/SCA3. Group difference for ROI analyses using Age, Gender and eTIV as covariates. Only structures with ANOVA corrected p-values &lt;0.001 are shown.....</i>	<i>59</i>
<b>Table 3:</b> <i>Subcortical structures with volumetric reduction in patients with MJD/SCA3. Only structures with ANOVA corrected p-values &lt;0.001 are shown.....</i>	<i>60</i>
<b>Table 4:</b> Multiple regression of thickness measurements vs clinical parameters in the MJD/SCA3 group. ....	61
<b>Table 5:</b> Multiple regression of thickness measurements vs neuropsychological tests in the MJD/SCA3 group. ....	62
<b>Table 6:</b> Cortical regions with significant thickness differences between patients and controls (Supplemental Data1). ....	63
<b>Table 7:</b> Multiple regression of subcortical volume measurements vs SARA score corrected to eTIV and gender in the MJD/SCA3 group (Supplemental Data2). ....	63
<b>Table 8:</b> Multiple regression of subcortical volume measurements vs Duration score corrected to eTIV and gender in the MJD/SCA3 group (Supplemental Data3). ....	64

# ***Resumo***

A doença de Machado-Joseph (SCA3/MJD) é a ataxia espinocerebelar mais frequente no mundo, resultante de uma expansão de tripletos CAG no gene *MJD1* localizado no cromossomo 14q. Clinicamente ela é caracterizada por danos nos gânglios da base, tronco e cerebelo. Atualmente existem poucos estudos baseados em imagens de ressonância magnética (MRI) que investigam danos no córtex cerebral em pacientes com SCA3/MJD. O objetivo deste estudo foi investigar danos no córtex cerebral na SCA3/MJD usando MRI e correlacionar as possíveis áreas afetadas com dados clínicos, genéticos e neuropsicológicos.

Foram recrutados para este estudo 49 pacientes com teste molecular de SCA3/MJD e 49 controles sadios. Os pacientes foram avaliados com a escala de ataxia SARA. Imagens de MR ponderadas em T1 foram adquiridas para todos os voluntários e usadas para a extração das medidas de espessura cortical, realizadas com o software FreeSurfer.

O tamanho da expansão CAG médio, SARA e idade de início foram  $72,1 \pm 4,2$ ,  $14,7 \pm 7,2$  e  $37,5 \pm 12,5$ , respectivamente. Os pacientes apresentaram redução de espessura nos córtex precentral e paracentral bem como nos hipocampus e lobos temporal e occipital. Também encontramos redução volumétrica no cerebelo, tálamo, caudado, putamen, globo pálido, tronco e diencéfalo ventral. A gravidade da doença apresentou correlação negativa com a espessura do giro precentral esquerdo ( $r=-0,302$ ,  $p=0,035$ ) e com o volume do tronco ( $r=-0,414$ ,  $p=0,003$ ). A espessura do giro angular direito apresentou correlação com a duração da doença ( $r=0,587$ ,  $p=0,001$ ), mas não com a expansão do triplete de CAG. O subteste de semelhança de WAIS III apresentou uma correlação com a espessura do sulco central esquerdo ( $r=0,752$ ,  $p=0,004$ ) e como o giro occipital superior direito ( $r=0,704$ ,  $p=0,016$ ).

Estes resultados sugerem que pacientes com SCA3/MJD apresentam dano cortical e subcortical difuso. Os achados estruturais se correlacionaram com as manifestações clínicas da doença, o que apoia a hipótese que a piora nas funções motora e cognitiva e o dano cerebral estão relacionados na SCA3/MJD.

# **Abstract**

Machado-Joseph disease (SCA3/MJD) is the most frequent spinocerebellar ataxia worldwide caused by an abnormal expansion of a CAG triplet at the *MDJ1* gene located on chromosome 14q. Clinically, it is characterized by brainstem, basal ganglia and cerebellar damage. There are few MRI-based studies that investigated cerebral cortex damage in SCA3/MJD. The objectives of this study are to investigate cerebral cortex damage in SCA3/MJD and to correlate affected areas with clinical, genetics and neuropsychological data.

We included 49 patients with molecular confirmation of SCA3/MJD and 49 healthy controls. The scale for assessment and rating of ataxia (SARA) was employed to quantify disease severity. We also performed a comprehensive neuropsychological battery to assess cognitive deficits. Volumetric T1 magnetic resonance images of the brain were acquired for all volunteers and used to calculate cortical thickness measures, performed using the FreeSurfer package.

Mean CAG expansion, SARA score and age-at-onset were  $72.1 \pm 4.2$ ,  $14.7 \pm 7.2$  and  $37.5 \pm 12.5$ , respectively. Patients had atrophy at precentral and paracentral cortices as well as the hippocampi, temporal and occipital lobes. We also found volumetric reduction of the cerebellum, thalamus, caudate, putamen, pallidum, brainstem and ventral diencephalon. SARA scores inversely correlated with left precentral gyrus thickness ( $r = -0.302$ ,  $p = 0.035$ ) and brainstem volume ( $r = -0.414$ ,  $p = 0.003$ ). Right angular gyrus thickness correlated with disease duration ( $r = 0.587$ ,  $p = 0.001$ ), but not (CAG) expansion. Similarity subscore of WAIS III presented a correlation with thickness of Left central sulcus ( $r = 0.752$ ,  $p = 0.004$ ) and Right superior occipital gyrus ( $r = 0.704$ ,  $p = 0.016$ ).

Therefore, patients with MJD/SCA3 have widespread cortical and subcortical atrophy. These structural findings correlate with clinical manifestations of the disease, which support the concept that cognitive/motor impairment and cerebral damage are related in MJD/SCA3.

# Introdução

A SCA3/DMJ é a forma mais comum de ataxia geneticamente definida em populações de origem portuguesa e apresenta prevalência em torno de 1:100.000 (Lopes-Cendes et al, 1997). No Brasil, esta doença, corresponde a cerca de 59,6% dos casos de ataxia autossômica dominante (de Castilhos *et al.* 2014). Trata-se de uma doença neurodegenerativa causada pela expansão de um triplete (CAG) no 10º exon do gene *MJD1* situado no cromossomo 14q24.3 – q31 (Kawaguchi et al, 1994). Essa mutação leva a expressão de uma cadeia excessivamente longa de poliglutaminas na proteína codificada, a ataxina-3 (Kawaguchi et al, 1994).

Estudos visuais prévios de neuroimagem em SCA3/MJD demonstraram redução do diâmetro da ponte e pedúnculo cerebelar superior, atrofia frontotemporal e diminuição do diâmetro transverso do globo pálido (Murata *et al.*, 1998). Por sua vez, estudos volumétricos (volumetria manual e VBM) demonstram a presença de atrofia do cerebelo, tronco cerebral, núcleo caudato e putamen. Outros estudos utilizando MRS demonstram redução de NAA/Cr ou da concentração absoluta de NAA na ponte e cerebelo de pacientes com ataxias cerebelares incluindo MJD (Viau *et al.*, 2005). Estudos de perfusão utilizando PET e SPECT mostram diminuição da perfusão cortical em SCA3/MJD, assim como do cerebelo e gânglios basais (Etchebehere *et al.*, 2001).

Há uma enorme concentração de trabalhos relacionados apenas ao cerebelo na SCA3/MJD. No entanto, existem alguns poucos estudos com fortes evidências do acometimento de outras estruturas corticais e subcorticais e nenhum com a utilização do *software* FreeSurfer que foi desenvolvido especificamente para avaliar o córtex cerebral, sendo muito utilizado atualmente na comunidade científica.

Desta forma, o objetivo deste trabalho, então, é investigar se pacientes com SCA3/MJD possuem dano cortical cerebral e se os mesmos correlacionam-se com os sintomas clínicos da doença. Os potenciais benefícios decorrentes desta proposta são abrangentes, incluindo pelo menos 2 aspectos importantes. Primeiro, por permitir uma melhor compreensão dos mecanismos da doença, em particular da correlação entre os locais da lesão e a evolução das mesmas. Segundo, porque os achados podem contribuir para aprimorar a qualidade do acompanhamento clínico destes indivíduos ao disponibilizar um potencial biomarcador de imagem.

A apresentação deste trabalho será dado da seguinte forma. O primeiro capítulo trata-se de uma revisão da literatura que aborda os aspectos clínicos e genéticos da doença, bem como os de neuroimagem. Em seguida, serão apresentados os objetivos deste trabalho de forma mais clara e sucinta. Depois, será relatada a metodologia utilizada. Os resultados serão demonstrados na forma de artigo submetido ao periódico *European Journal of Neurology*. Uma discussão final será apresentada após a exposição do artigo, seguida das conclusões do trabalho e referências bibliográficas. Além disso, este manuscrito consta de um anexo. Tal anexo traz os *scripts* feitos por mim para automatização de todos os processos feitos neste trabalho e em outras colaborações.

# **Revisão da Literatura**

A doença de Machado-Joseph (SCA3/MJD) é a forma mais comum de ataxia autossômica dominante no mundo (Figura 1), apresentando uma prevalência de 1:100000 em populações de origem portuguesa e, além disso, representa cerca de 59,6% dos casos de ataxia espinocerebelar (SCA) no Brasil (de Castilhos *et al.* 2014). Trata-se de uma doença neurodegenerativa de início tardio, com uma grande variabilidade clínica, e causada por expansões anormais do triplete CAG no 10º exon do gene *MJD1*, localizado no cromossomo 14q24.3-q31, o qual foi mapeado em 1993 (Romanul *et al.* 1977; Kawaguchi *et al.* 1994).

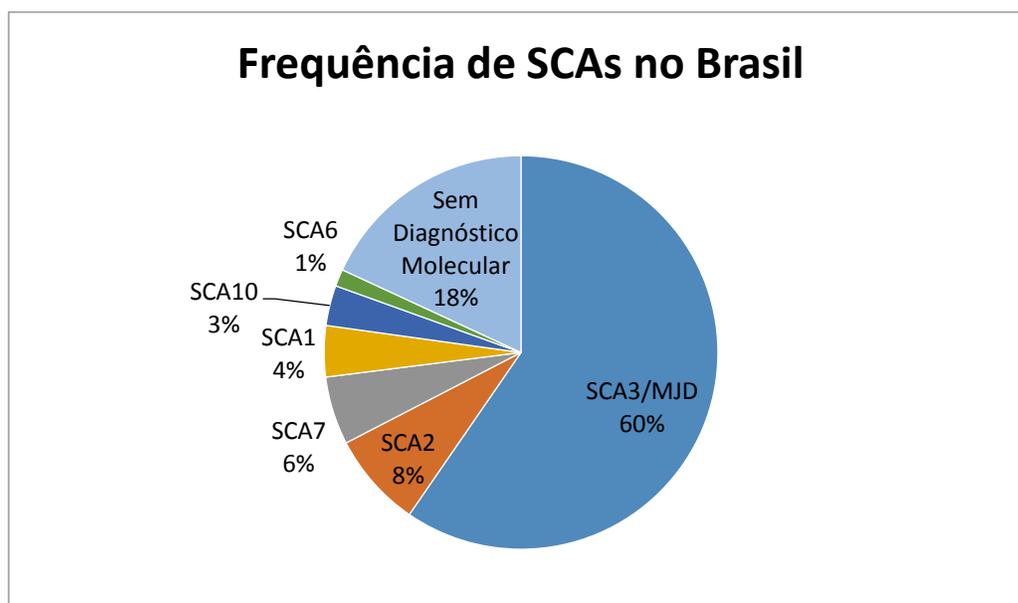


Figura 1: Distribuição epidemiológica de SCAs no Brasil (de Castilhos *et al.*, 2014)

O primeiro relato desta enfermidade ocorreu em 1972 em uma família de imigrantes portugueses em *Massachusetts*, apresentando uma ataxia leve, com início a partir dos 40 anos, associada com nistagmo, disartria, hiperreflexia e atrofia muscular distal (Nakano *et al.* 1972). Mais tarde, um segundo relato foi feito, porém com uma síndrome clínica diferente da observada no primeiro caso (Woods *et al.* 1972). Em 1977, Romanul *et al.* notaram que uma família de descendentes açorianos apresentava uma desordem neurodegenerativa semelhante aos dois casos, sendo assim, o pesquisador sugeriu que todos os casos estavam dentro de um mesmo espectro clínico. No entanto, essa observação só foi confirmada por Coutinho *et al.* em 1994, quando ela avaliou um

grande número de indivíduos afetados pela doença na ilha de Açores (Coutinho *et al.*, 1994). Além disso, com o passar dos anos, a doença foi descrita, também, em diferentes países e populações sem antecedentes açorianos (Rosenborg, 1992).

A mutação no gene *MJD1* também leva a um trato anormal de poliglutaminas (polyQ) na proteína ataxina-3 (Figura 2), o que torna a base genética da MJD/SCA3 similar às SCAs 1, 2, 6, 7 e 17, doença de Huntington e atrofia bulboespinal, as quais são coletivamente chamadas doenças polyQ (Kawaguchi *et al.* 1994). Em tais desordens, a doença se desenvolve quando o tamanho da expansão do triplete de CAG excede um valor limite. Indivíduos normais têm expansões de até 37 unidades, enquanto que nos portadores de SCA3/MJD a expansão varia de 56 a 85 unidades. O tamanho da expansão correlaciona-se inversamente com a idade de início dos sintomas da doença (França *et al.*, 2012). Dessa forma, a alteração genética responsável pela SCA3/MJD é considerada uma mutação instável e explica a razão pela qual a doença tende a se manifestar mais precoce e intensamente a cada geração sucessiva (fenômeno de antecipação genética). A idade média de início da doença é de 30 a 40 anos, podendo variar desde a primeira década (presumíveis homozigotos) até os 60 anos (Coutinho, 1994).

A SCA3/MJD apresenta uma variabilidade clínica muito grande, com sinais e sintomas relacionados ao envolvimento de múltiplas populações neuronais. A doença inicia-se, geralmente, com alterações de coordenação motora e equilíbrio dos casos após 2 anos de evolução (Coutinho, 1994). Esta alteração corresponde a uma ataxia global, levando a uma incapacidade lenta e progressiva de marcha e postura ereta. Outra característica adquirida com a evolução da doença é a perda da motilidade ocular, sendo, esta, relativamente característica na doença (Coutinho, 1994). O principal sintoma associado à esta alteração ocular é a presença de vários tipos de nistagmo: rítmico, muitas vezes rotatório, pendular, ou apenas decomposição dos movimentos oculares. Estas alterações são mais frequentes no olhar lateral que no vertical (Coutinho, 1994).

Manifestações piramidais também são frequentes na SCA3/MJD. Todavia, este sinal clínico é mais evidente em pacientes com início mais precoce da doença, no qual predominam sinais de liberação piramidal, como hiperreflexia profunda, espasticidade, clônus dos pés, sinal de Babinski e sinais pseudobulbares (Coutinho, 1994). Em geral, nestes casos, a força é preservada. Outra característica marcante em pacientes com SCA3/MJD é a presença de distúrbios de movimento, podendo existir um quadro predominantemente distônico ou parkinsoniano com bradicinesia, hipomimia e rigidez (Coutinho, 1994). Manifestações periféricas também são observadas, podendo ocorrer queixas tanto sensitivas (tátil, dolorosa, vibratória e postural) quanto motoras, com abolição dos reflexos aquileus e atrofia muscular distais, com fasciculações (Coutinho, 1994; França-Jr *et al.*, 2009). Este tipo de manifestação costuma ser mais evidente entre os pacientes com início mais tardio da doença.

Desde de que a doença foi caracterizada, inicialmente na década de 70, a heterogeneidade fenotípica tem sido reconhecida como uma das características marcantes da doença. Hoje são conhecidos 5 subtipos clínicos descritos desta doença. O tipo 1 ou “tipo Joseph” apresenta início precoce da doença, com uma média de 24 anos, e sinais clínicos marcados por ataxia e Oftalmoplegia Externa Progressiva (OEP), associados a sinais piramidais e distonia. A tipo 2 ou tipo “Thomas” inicia-se entre os 30-40 anos, apresentando ataxia e podendo, eventualmente, ocorrerem sinais piramidais, porém com sinais extrapiramidais e periféricos tênues. O tipo 3, “tipo Machado”, com início mais tardio, em torno dos 46 anos, é marcado com ataxia, OEP e sinais periféricos proeminentes (Coutinho 1992). O tipo 4 apresenta achados parkinsonianos proeminentes e praticamente isolados (Suite *et al.* 1986). Por último, o tipo 5 é marcado por uma síndrome de paraparesia espástica (Sakai *et al.* 1996). Jardim *et al.* 2001 mostraram que há uma correlação entre o tamanho do triplete CAG e a idade de início da doença, como pode ser visto na Figura 2, e com aumento da probabilidade de desenvolvimento de distonia e sinais piramidais (Jardim *et al.* 2001).

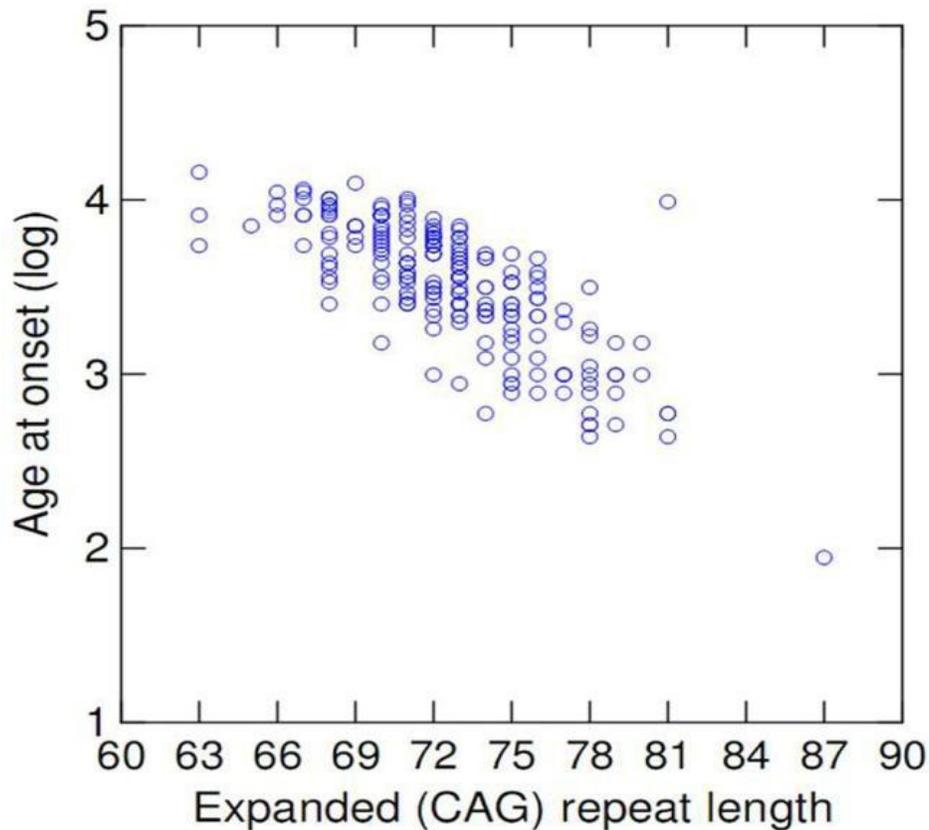


Figura 2: Correlação entre o tamanho do triplete de CAG e a idade de início da doença (França et al. 2012).

Além das manifestações motoras clássicas, pacientes com SCA3/MJD também possuem sintomas não motores. Nos últimos anos, vários trabalhos têm demonstrado que manifestações como fadiga, distúrbios de sono e dor são comuns nessa doença e podem contribuir bastante para a piora da qualidade de vida dos indivíduos afetados (D'Abreu *et al.*, 2009; França *et al.*, 2007; Kawai *et al.*, 2004). As alterações do sono são mais frequentes, sendo a insônia a alteração do sono mais comum nestes pacientes, enquanto roncos e apnéia do sono ocorrem nos pacientes mais velhos e com maior duração de doença. Além disso, a síndrome das pernas inquietas é outro sinal marcante nestes pacientes (Coutinho, 1994; D'Abreu *et al.*, 2009).

Em relação a distúrbios cognitivos, os pacientes apresentam deficiência da memória verbal e visual, alterações da fluência verbal e disfunções visuoespaciais e construcionais. Os escores dos testes neuropsicológicos, porém, não apresentam relação com o tamanho da expansão do CAG, nem com a idade de

início da doença ou com a duração da mesma. Transtornos depressivos e de ansiedade também são observados de forma bastante frequente (Coutinho, 1994; Kawai *et al.*, 2004). Alterações do olfato são também frequentes na doença de Machado-Joseph, porém sua etiologia permanece incerta (Braga-Neto *et al.*, 2012).

Dor crônica é um sintoma comum e incapacitante nestes pacientes e muitas vezes, precede ou acompanha o início dos sintomas da doença (França *et al.*, 2007). A dor localiza-se principalmente na região lombar ou nas pernas. Acredita-se que a disfunção de circuitos dopaminérgicos estriatais e diencefálicos esteja envolvida na origem da dor. Outros fatores causais associados são as posturas anormais, distonia e neuropatia periférica (França *et al.*, 2007).

Dürr *et al.* avaliou a perda neuronal ou gliose no cérebro (tratos medulares, substância negra, núcleo rubro, núcleo subtalâmico, núcleos de nervos cranianos) e nervos periféricos e concluiu que estes danos são responsáveis pela variabilidade clínica da doença (Dürr *et al.* 1996). Além disso, foi achado que a degeneração de substância cinza envolve múltiplas áreas, dentre elas podemos citar: circuito motor cérebro-tálamo-cortical, circuito gânglios da base-tálamo-cortical, dentre outros. Entretanto, a degeneração de substância branca é restrito, somente, ao cerebelo, medula espinhal e tronco.

Para melhor avaliação e quantificação da ataxia o uso de escalas é bem difundido. Há duas principais em uso, a ICARS (*International Cooperative Ataxia Rating Scale*) e a SARA (*Scale for the Assessment and Rating of Ataxia*), que é a mais usada atualmente e de aplicação mais prática. A escala SARA passou por um rigoroso processo de validação que incluiu três ensaios clínicos envolvendo grupos de indivíduos com SCA, com ataxia por outras etiologias e controles (Schmitz-Hübsch, 2006). A SARA é dividida em 8 partes: (1) marcha (0-8 pontos); (2) postura (0-6 pontos); (3) sentar (0-4 pontos); (4) alterações na fala (0-6 pontos); (5) teste índice-índice (0-4 pontos); (6) teste índice-nariz (0-4 pontos); (7) movimentos alternados (0-4 pontos); (8) teste calcanhar-joelho (0-4 pontos). Os subitens 5 a 8 são realizados bilateralmente e o escore é definido através das

médias entre os lados direito e esquerdo. A pontuação total da escala é de 40 pontos, sendo que, quanto maior a pontuação, pior o desempenho.

Quanto aos estudos de neuroimagem, os principais achados de trabalhos prévios demonstraram alterações cerebrais importantes em indivíduos com SCA3/MJD, tais como atrofia da ponte, putamen, núcleo caudado, pedúnculo cerebelar superior e globo pálido, além de um significativo aumento do IV ventrículo, diminuição do cerebelo e atrofia dos lobos frontal e temporal (Liang *et al.*, 2009; Horimoto *et al.*, 2008; D'Abreu *et al.*, 2011; Guimarães *et al.*, 2013).

Um estudo, usando volumetria manual, avaliou 15 pacientes com diagnóstico de MJD/SCA3 e demonstrou uma redução do mesencéfalo, ponte, bulbo, vérmis, hemisférios cerebelares e volume total do cerebelo. Além disso, foram encontradas correlações significativas entre idade, duração da doença, CAG e escore da escala ICARS com as medidas volumétricas de cerebelo e tronco (Camargos *et al.*, 2011). Outro estudo, também usando volumetria manual e VBM, demonstrou uma significativa redução do volume do tronco e cerebelo, com indícios de dano no córtex cerebral (Schulz *et al.*, 2010). Oliveira *et al.* analisaram a textura cerebral em 18 pacientes e encontraram diferenças significativas no núcleo caudado, tálamo e putamen (Oliveira *et al.*, 2010). Estes autores sugerem que a idade dos pacientes e o tempo de doença se correlacionam com alterações de volume e textura, em particular no tronco e cerebelo (Camargos *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2011, Guimarães *et al.*, 2013). Lukas *et al.*, em um estudo de VBM, mostraram que portadores de SCA3/MJD possuem atrofia medular (Lukas *et al.*, 2006). Além disso, em um estudo de espectroscopia D'Abreu *et al.* descreveram anormalidades na substância branca (WM), apontando para uma possível perda neuronal e axonal (D'Abreu *et al.*, 2008). Há também um estudo usando TBSS (*Tract-Based Spatial Statistics*) que encontrou disfunções micro-estruturais na substância branca (WM) do cerebelo e tronco (Guimarães *et al.*, 2013).

D'Abreu *et al.*, em um estudo usando VBM, encontraram redução na substância cinza (GM) de ambos os hemisférios, no vermis cerebelar, tronco,

núcleo lentiforme, núcleo caudado, claustrum, lobo frontal (córtex motor principalmente), lobo parietal, giro occipital, lobo límbico e tálamo. Contudo, as alterações de WM ficaram restritas ao cerebelo (D'Abreu *et al.*, 2011).

Estudos usando PET (*Positron Emission Tomography*) e SPECT (*Single Photon Emission Tomography*) revelaram anormalidades de perfusão nos lobos parietal, porção inferior do lobo frontal, porção mesial e lateral do lobo temporal, gânglios basais e cerebelo (Etchebehere *et al.* 2001). A captação de FDG em pacientes com SCA3/MJD estava significativamente diminuída não somente nas regiões com aparente envolvimento, mas também no córtex cerebral e striatum (Taniwaki *et al.*, 1997).

Em virtude da manifestação clínica marcante de ataxia, a maior parte dos estudos neuropatológicos e de neuroimagem têm focado no cerebelo, gânglios da base e tronco (Tokumaro *et al.* 2003). Em relação aos estudos de neuroimagem, a grande maioria se restringiu às técnicas de análise visual ou volumetria manual de cortes transversais, e somente recentemente alguns estudos vem usando medidas volumétricas (D'Abreu *et al.*, 2010). Esta abordagem, apesar de útil, necessita de muito tempo para a execução e é altamente dependente da habilidade e experiência do usuário, tendo resultados menos consistentes.

Nesse sentido, têm surgido métodos automatizados, que possuem uma alta reprodutibilidade e acurácia, podendo ser mais eficientes que o método manual (Woo *et al.*, 2008). Um *software* muito utilizado atualmente para volumetria automática e estudo do córtex cerebral é o *FreeSurfer* (<http://surfer.nmr.mgh.harvard.edu>) (Fischl *et al.*, 2002). Este programa realiza a segmentação automática de todas as estruturas do córtex cerebral e região subcortical, calculando o volume de estruturas desejadas e espessura do córtex cerebral.

Para realizar as tarefas citadas acima com precisão e exatidão, o *software* corregistra a imagem de ressonância do indivíduo a ser analisado com um template construído a partir de imagens segmentadas manualmente (Cerasa *et al.*, 2009). Há vários estudos validando o uso do *FreeSurfer* na quantificação de

volume e segmentação de estruturas subcorticais e corticais em diversas condições neurológicas (Pengas *et al.* 2009), o que enfatiza ainda mais a sua implementação e utilização.

Dessa forma, consideramos que a realização de uma investigação de imagem com este tipo de abordagem volumétrica e automatizada seria bastante oportuna na SCA3/MJD, especialmente por permitir uma avaliação mais robusta das regiões corticais, tanto do cérebro quanto do cerebelo. Alguns estudos utilizando outras técnicas e abordagens de imagem apresentaram indícios de dano no manto cortical na SCA3/MJD. Tokumaro *et al.* (2003) mostraram a atrofia dos lobos frontal e temporal na SCA3/DMJ. Além disso, alguns poucos estudos usando imagens de PET e SPECT também sugeriram o envolvimento de áreas corticais nessa doença (Etchebehere *et al.* 2001). D'Abreu *et al.* (2011) sugeriram ainda o envolvimento de outras áreas corticais em SCA3/DMJ. Portanto, há uma crescente evidência de anormalidades estruturais e funcionais associadas à SCA3/DMJ não relacionadas ao cerebelo.

# Objetivos

## Objetivo Geral

Investigação do dano cortical cerebral e cerebelar em pacientes com SCA3/MJD.

## Objetivos Específicos

- Determinar a espessura do córtex cerebral em pacientes com SCA3/MJD e compará-la à de controles saudáveis;
- Investigar a correlação entre a espessura do córtex cerebral em pacientes com SCA3/MJD e dados clínicos e genéticos;
- Determinar o volume do córtex cerebelar em pacientes com SCA3/MJD e compará-lo ao de controles saudáveis;
- Investigar a correlação entre o volume do córtex cerebelar em pacientes com SCA3/MJD e dados clínicos e genéticos;
- Investigar a correlação da espessura do córtex cerebral de possíveis regiões atrofiadas com testes neuropsicológicos.

# **Materiais e Métodos**

## **Aspectos éticos da pesquisa**

O projeto envolveu o uso de imagens de ressonância magnética do encéfalo de pacientes com SCA3/MJD e controles saudáveis que já haviam sido adquiridas previamente, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP (protocolo 608/2010), e estão armazenadas no banco de dados do Laboratório de Neuroimagem da FCM-UNICAMP. Desta forma, não houve riscos adicionais aos voluntários da pesquisa. Todas as análises realizadas e as publicações resultantes guardam/guardarão o sigilo relativo aos pacientes e controles.

## **Seleção das Imagens**

Neste trabalho foram usadas imagens de pacientes com SCA3/MJD e controles que constam no banco de dados do Laboratório de Neuroimagem do HC-UNICAMP. Os pacientes em questão são acompanhados regularmente no ambulatório de Neurogenética do HC-UNICAMP com diagnóstico confirmado, por teste molecular, de SCA3/MJD, aceitaram participar da pesquisa e tiveram seus dados clínicos coletados e armazenados em um banco de dados.

Foram incluídos pacientes de ambos os sexos e de todas as faixas etárias.

Foram excluídos:

- Pacientes que não tinham diagnóstico confirmado de SCA3/MJD por teste molecular;
- Pacientes com contraindicação para realização de estudo por imagem;
- Pacientes que não haviam assinado um termo de consentimento livre e esclarecido;
- Pacientes cujas imagens apresentavam artefatos significativos de movimento.

## **Seleção de controles**

Foram utilizados como controles:

- Pessoas sem enfermidades neurológicas ou antecedentes de ataxia e que apresentavam exame neurológico normal e com imagens livres de artefatos.

## **Estudo de Imagem**

### **Aquisição**

Os pacientes foram submetidos a exame de ressonância magnética em equipamento de 3T Achieva da PHILIPS. A sequência utilizada para todas as análises foi uma sequência T1 volumétrica do crânio, adquirido segundo o protocolo descrito abaixo:

- 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 1.0 x 1.0 x 1.0 mm e FOV = 240x240.

### **Dados Clínicos**

Os dados clínicos/genéticos usados no projeto foram: (1) tamanho do triplete expandido CAG, obtido via teste molecular realizado no laboratório de genética molecular da FCM - UNICAMP; (2) pontuação na escala SARA; (3) Idade do paciente; (4) Idade de início da doença e (5) Duração da doença, estes últimos obtidos no momento da aquisição do exame de imagem.

## Dados Neuropsicológicos

Um subgrupo de 28 pacientes também foi submetido à avaliação neuropsicológica, realizada por um psicólogo treinado (ver Lopes *et al.*, 2013). Foram incluídos os seguintes testes: Teste de aprendizagem auditivo verbal de Rey - RAVLT (Malloy-Diniz *et al.* 2007); Matrizes progressivas de Raven – Escala Geral (Raven 2003); Blocos de Corsi-Span (Lezak 1995); Dígitos span – Subteste (WAIS-III) (Nascimento 2004); Teste de fluência verbal (categoria animal) (Lezak 1995); Memória lógica, Memória para Figuras - subtestes (WMS-R) (Wechsler 1983); Teste de repetição de pseudopalavras (Santos e Bueno 2003); Semelhanças- subtestes (WAIS III) (Nascimento 2004); Teste de nomeação de Boston (BNT) (Kaplan e Weintraub 1983); Teste de organização visual - Hooper (Hooper 1983); e Teste Winsconsin de classificação de cartas - abreviado (WCT) (Cunha 2005). O Inventário de depressão (BDI) e ansiedade de Beck (BAI) (Beck 1993) bem como o inventário neuropsiquiátrico (NPI) (Cummings *et al.* 1994) também foram aplicados para avaliar os sintomas de depressão e ansiedade. Todos os testes utilizados já estavam validados para a língua portuguesa.

## Espessura Cortical

As medidas de espessura foram obtidas através do software FreeSurfer (versão 5.3) usando os protocolos propostos por (Fischl e Dale, 2000) e (Fischl *et al.*, 1999b). Resumidamente, as imagens são corrigidas para inhomogeneidades do campo magnético, alinhadas ao atlas de Talairach e Tournoux (Talairach e Tournoux, 1988), e é feita a remoção de tecido não cerebral (*skull-stripping*). Em seguida, é feita a segmentação da GM, WM e líquido (CSF) nas imagens, sendo os voxels correspondentes identificados baseados na sua localização, na sua intensidade e na intensidade dos voxels vizinhos. O cérebro, então, é dividido em dois hemisférios que formam uma massa de voxels conectados por meio do esquema de conectividade de seis vizinhos próximos. Uma rede de faces de

triângulos é construída sobre a superfície de WM, onde cada voxel é caracterizado por dois triângulos. A rede, por sua vez, é suavizada usando um algoritmo que leva em consideração a intensidade local na imagem original (*Dale e Sereno, 1993*), para uma resolução subvoxel, usando interpolação trilinear. A fim de garantir que a superfície possua as mesmas propriedades topológicas de uma esfera, os defeitos topológicos (buracos na superfície) são corrigidos (*Fischl et al., 2001*). Para isso, 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 à *pia mater* em um ponto onde o contraste do tecido é máximo (*Fischl e Dale, 2000*). Esta superfície recebe o nome de *pial surface*.

Essa superfície é, então, segmentada em pequenas regiões neuroanatômicas, segundo um atlas proposto em (*Desikan et al., 2006*), usando um processo automatizado proposto por *Fischl et al. (2004)*. Para isto, a *pial surface* é mapeada homeomorficamente (*homeomorphically mapping*) em um sistema de coordenadas esféricas (*Fischl et al., 1999b*), ou seja a *pial surface* é inflada na forma de uma esfera, e os padrões de dobramento são relacionados a um atlas de probabilidades. Com isso, por meio de um processo de segmentação Bayesiano, é atribuída para cada vértice uma marcação neuroanatômica. Os vértices, por sua vez, possuem seus rótulos confrontados com relação à atribuição de seus vizinhos, utilizando, para isto, um algoritmo de Campos Aleatórios de Markov (*Fischl et al., 2002, 2004*). A espessura cortical é calculada, então, como a menor distância entre a *pial* e a *white surface* para cada vértice, através do manto cortical. Para todas as análises, os mapas foram suavizados usando um filtro de kernel Gaussiano através da superfície com um FWHM de 10 mm. Um modelo linear geral (GLM) foi ajustado para cada vértice a fim de avaliar a diferença de espessura entre pacientes e controles. Nesse modelo, foram usados como regressores a idade, gênero, volume intracranial total estimado (eTIV) e grupo. Os mapas estatísticos (teste-t) foram corrigidos para múltiplas comparações usando

simulações de Monte Carlo (Hagler *et al.*, 2006), possibilitando a identificação de *clusters* significativos estatisticamente.

Além da comparação *vertex-wise*, o FreeSurfer permite que seja feita a comparação das espessuras médias para as regiões segundo os atlas de *Desikan* e *Detrieux* (Desikan *et al.* 2006; Detrieux *et al.*, 2010). Nesta análise, realizamos uma ANCOVA com a idade, gênero e eTIV como covariáveis para avaliar a diferença de espessura entre pacientes e controles. A fim de corrigir os resultados para múltiplas comparações, empregamos o teste de Dunn-Sidak (nível de significância foi ajustado para  $\alpha=0,001$ ).

### **Volume Subcortical**

Depois que as imagens passaram por todo o processo descrito acima, foi realizado, também com o FreeSurfer, o seguinte protocolo para calcular o volume de GM para as estruturas subcorticais. Primeiramente, foi feita a identificação das estruturas. Para isto, o programa corregistra a imagem de ressonância do indivíduo a ser analisado com um *template* (atlas probabilístico) construído a partir de imagens segmentadas manualmente. Para ajustar o *template* pré-existente à imagem, o software aplica algumas transformações lineares e não lineares na imagem para deformá-la da melhor forma, de modo que ocorra uma união perfeita do atlas gerado com a imagem. Por fim, uma segmentação Bayesiana é feita para garantir que as marcações estão relacionadas no local correto. Para corrigir possíveis erros de segmentação o *script* do FreeSurfer opera com três informações. A primeira consiste na probabilidade *a priori* de uma dada classe de tecido ocorrer para uma dada posição do atlas. A segunda é dada pela probabilidade de um dado voxel corresponder a um dado tecido e, por fim, a terceira é a probabilidade da configuração espacial do marcador corresponder a um dado tecido (Cerasa *et al.*, 2009).

O uso do atlas probabilístico na segmentação ajuda na classificação de estruturas devido à informação espacial contida nele (Fox *et al.*, 1994). Este tipo de atlas atribui propriedades estatísticas às estruturas anatômicas. Sendo assim,

cada coordenada espacial possui uma assinatura anatômica, diferindo de uma imagem crua que é dependente da orientação, posição e forma da cabeça do paciente durante a aquisição da imagem. A informação espacial auxilia na classificação do seguinte modo: (1) o número de classes anatômicas possíveis para uma dada posição global no cérebro é muito pequena; (2) estruturas neuroanatômicas ocorrem em um padrão espacial característico relativas umas às outras; (3) muitas classes de tecidos são espacialmente heterogêneas em imagens de ressonância magnética (Fischl *et al.*, 2002). Além disso, o uso de Campos Aleatórios de Markov (CAM) (German e German, 1984) maximiza a probabilidade da identificação do voxel não somente em termos de sua intensidade ou probabilidade a priori, mas também como função da vizinhança do voxel em questão. Logo, o CAM fornece algumas restrições para a segmentação, aumentando a probabilidade de acerto ao rotular um dado voxel (Fischl *et al.* 2002).

O volume intracranial total estimado (eTIV) é dado por dois fatores. O primeiro é o fator de escala do atlas (ASF), dado pelo determinante da matriz de transformação linear. Neste contexto, o ASF representa a expansão do volume ( $ASF > 1$ ) ou contração ( $ASF < 1$ ) necessário para ajustar a imagem do paciente ao *template*. O segundo é o volume do *template* usado; esta quantia é constante e deriva de um valor médio obtido através de medições manuais do eTIV de vários sujeitos (Buckner *et al.*, 2004). Porém, o volume das estruturas subcorticais e corticais é calculado através da soma dos voxels compreendidos dentro da região segmentada de interesse.

A avaliação da variação de volume subcortical entre pacientes e controles foi feita, também, usando uma ANCOVA com a idade, gênero e eTIV como covariáveis; e os resultados também foram corrigidos para múltiplas comparações com o teste de Dunn-Sidak (com nível de significância  $\alpha=0,001$ ).

## **Análise de Correlação**

### ***Dados Corticais***

A análise de correlação entre os dados clínicos/genéticos e os dados de imagem foi feita somente para aquelas regiões que apresentaram-se atrofiadas na análise de grupo. Primeiramente, foi feito um GLM de uma única variável, sendo estas: idade, comprimento da expansão de CAG, idade de início, duração da doença e a escala de ataxia.

Em seguida, foi feita uma regressão múltipla para analisar o fator determinante da atrofia cortical e investigar possíveis correlações com testes neuropsicológicos. A regressão da espessura cortical foi realizada controlando para idade, gênero, comprimento da expansão de CAG, idade de início e duração da doença. Para avaliar a correlação dos dados neuropsicológicos com a espessura cortical, o GLM foi ajustado controlando para os seguintes fatores: BDI, BAI, idade, SARA e escolaridade. A análise de correlação com uma única variável e múltipla tiveram seus testes corrigidos para múltiplas correções através do teste de Dunn-Sidak,  $\alpha=0,0014$ . Todas as análises foram feitas no *software* Systat v13.0.

### ***Dados Subcorticais***

Para investigar uma possível relação entre os volumes subcorticais e cada um dos parâmetros clínicos/genéticos (idade, expansão do triplete de CAG, idade de início, duração da doença e a escala SARA), usamos uma regressão múltipla com gênero e eTIV como regressores fixos. Os testes foram corrigidos para múltiplas comparações, Dunn-Sidak  $\alpha=0,003$ , sendo que todos os testes foram realizados no Systat v13.0.

O processamento das imagens foi realizado no FreeSurfer, e todos os protocolos usados neste trabalho foram automatizados por meio de *scripts* em python. Os códigos dos *scripts* estão no Anexo desta dissertação, bem como outros desenvolvidos pelo autor para estudos colaborativos durante o mestrado.

# Resultados

***Resultados apresentados na forma de artigo  
submetido à European Journal of Neurology:  
Cerebral Cortex Involvement in Machado-  
Joseph disease***

# Cerebral Cortex Involvement in Machado-Joseph disease

Thiago Junqueira Ribeiro de Rezende<sup>1,2</sup>, Bsc, Anelyssa D'Abreu<sup>1</sup>, MD PhD, Rachel P. Guimarães<sup>1</sup>, Msc, Tátilla M. Lopes<sup>1</sup>, Msc, Iscia Lopes-Cendes<sup>3</sup>, MD PhD, Fernando Cendes<sup>1</sup>, MD PhD, Gabriela Castellano<sup>2</sup>, PhD, Marcondes C. França Junior<sup>1</sup>, MD PhD

<sup>1</sup>Departament of Neurology, <sup>2</sup>Department of Cosmic Rays and Chronologic, <sup>3</sup>Department of Medical Genetics, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil

**Word Count:** Title 53 characters, Abstract 248 words, Manuscript 4175 words, References 31,

**Figures:** 01 **Table:** 08

**Running title:** Cortical Damage in Machado-Joseph Disease

**KeyWords:** Machado-Joseph disease, cerebral cortex, FreeSurfer, Cortical thickness, Neuropsychological tests

The authors report no conflict of interest regarding this research. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

**Address correspondence to:**

Marcondes Cavalcante França Junior, MD, PhD

Department of Neurology, University of Campinas – UNICAMP.

Rua Tessália Vieira de Camargo, 126. Cidade Universitaria “Zeferino Vaz”

Campinas, SP, Brazil - 13083-887

Tel: +55 19 3521 9217, Fax: +55 19 351 7933

E-mail: [mcfrancajr@uol.com.br](mailto:mcfrancajr@uol.com.br)

## ABSTRACT

**Background:** Machado-Joseph disease (MJD/SCA3) is the most frequent spinocerebellar ataxia, and characterized by brainstem, basal ganglia and cerebellar damage. Few MRI-based studies have investigated damage in the cerebral cortex. The objective is to determine whether patients with MJD/SCA3 have cerebral cortex atrophy, to identify regions more susceptible to damage and to look for the clinical and neuropsychological correlates of such lesions.

**Methods:** Forty-nine patients with MJD/SCA3 (mean-age  $47.7 \pm 13.0$  years, 27 men) and 49 matched healthy controls were enrolled. All subjects underwent MRI scans in a 3T device, and 3D T1 images were used for volumetric analyses. Measurement of cortical thickness and volume was performed using the FreeSurfer software. Groups were compared using ANCOVA with age, gender and estimated intracranial volume as covariates, and GLM was used to assess correlations between atrophy and clinical variables.

**Results:** Mean CAG expansion, SARA score and age-at-onset were  $72.1 \pm 4.2$ ,  $14.7 \pm 7.3$  and  $37.5 \pm 12.5$  years, respectively. The main findings were: i) bilateral paracentral cortex atrophy, as well as the caudal middle frontal gyrus, superior and transverse temporal gyri, and lateral occipital cortex in the left hemisphere and supramarginal gyrus in the right hemisphere ii) volumetric reduction of basal ganglia and hippocampi; iii) significant correlation between SARA and brainstem and precentral gyrus atrophy. Furthermore, some of the affected cortical regions showed significant correlations with neuropsychological data.

**Conclusions:** Patients with MJD/SCA3 have widespread cortical and subcortical atrophy. These structural findings correlate with clinical manifestations of the

disease, which support the concept that cognitive/motor impairment and cerebral damage are related in disease.

## **INTRODUCTION**

Machado-Joseph Disease (MJD/SCA3) is the most frequent autosomal dominant spinocerebellar ataxia worldwide. It is a neurodegenerative disease characterized by remarkable phenotypic heterogeneity and caused by an unstable mutation (CAG repeat expansion) at the *ATXN3 (MJD1)* gene on chromosome 14q. The clinical manifestations include ataxia, peripheral neuropathy, ophthalmoparesis, pyramidal symptoms, dystonia, sleep disorders, or Parkinsonism. Furthermore, it is known that CAG repeat length correlates with age at onset and disease severity (1).

Neuroimaging studies have been very valuable in characterizing brain damage in spinocerebellar ataxias (SCAs) and Machado-Joseph disease in particular. In MJD/SCA3, however, some of these MRI-based studies relied solely upon visual analysis or manual quantification (2). In fact, only a few have used automated volumetric measurements (2-4). Furthermore, most neuroimaging reports have focused on the cerebellum and its direct connections, such as brainstem, spinal cord and basal ganglia, because ataxia is the major clinical characteristic in the disease (1, 5). Interestingly, little is known about cerebral cortical damage in these patients (6). D'Abreu et al employed a voxel-based morphometry (VBM) approach in a large cohort of patients and found atrophy in the neocortex, including frontal, parietal, temporal and occipital lobes (7). Furthermore, some studies using Positron Emission Tomography (PET) and Single Photon Emission Tomography (SPECT) showed involvement of the cortex in this illness (8).

These imaging data strongly suggest that neurodegeneration in MJD/SCA3 extends far beyond the cerebellum and motor pathways. In the last few years, cognitive deficits have been increasingly recognized in the disease. Lopes et al. (9)

found episodic and working memory deficits, whereas Kawai et al.(10) also identified difficulties in visuospatial and language tasks. Such neuropsychological abnormalities cannot be explained exclusively by cerebellar damage. In this scenario, it is crucial to systematically investigate cerebral cortex damage in patients with MJD/SCA3 and to determine whether it correlates with neuropsychological findings. Recent advances in MRI analyses now enable reliable investigation of cerebral cortex damage, using tools such as the FreeSurfer package (<http://surfer.nmr.mgh.harvard.edu>). FreeSurfer performs automatic segmentation of all cortical and subcortical structures in the brain, thus enabling determination of the volume, area and thickness of the cerebral cortex. Measurements are accurate and present high reproducibility (11). This methodology has been successfully used in other neurodegenerative disorders. Therefore, the primary aim of this study was to determine whether patients with MJD/SCA3 have cerebral cortex atrophy and to identify regions more susceptible to damage. As a secondary objective, we looked for clinical correlates of such involvement including both motor and cognitive functioning.

## **MATERIALS**

### Participants

This study was approved by our institution research ethics committee and written signed consent was obtained from all subjects. Forty-nine adult symptomatic patients (27 men) with molecular confirmation of MJD/SCA3 and 49 healthy controls (27 men) were enrolled in the study (Table 1). All patients were recruited from the Neurology and Neurogenetics outpatient clinics (Department of Neurology, University of Campinas, Campinas, Brazil) between 2009 and 2013. Patients with motion artifacts on MRI scans and/or unavailable clinical or genetic data were excluded from the study.

### Neurological and cognitive evaluation

For each patient, we recorded information about age at onset, disease duration and CAG repeat length. In addition, a neurologist performed the Scale for

Assessment and Rating of Ataxia (SARA) (12) on the same day of the MRI acquisition.

A subgroup of 28 patients also underwent neuropsychological assessment, performed by a trained psychologist (9). Mean age and educational level of these subjects were  $46.5 \pm 11.5$  and  $10.0 \pm 4.0$  years, respectively. We included the following tests, validated for Portuguese language: Rey auditory verbal learning test-RAVLT (coding, delayed recall and recognition; Corsi block-tapping task (forward and backward); digits span - forward and backward; semantic verbal fluency (animal category); figure memory, logical memory I and II and associated paired visual I and II subtests (WMS-R); similarities and picture completion (WAIS III subtest); Boston naming test (BNT); Hooper visual organization; Wisconsin card sorting test; and Raven Progressive Matrix Test (General Scale). Beck inventories for depression (BDI) and anxiety (BAI) were also applied to these 28 patients to evaluate depressive symptoms and anxiety. Mean BAI, BDI and Educational Level scores in this subgroup were  $10.0 \pm 9.7$ ,  $15.0 \pm 13.0$  and  $9.8 \pm 3.8$ , respectively.

#### Image acquisition

Anatomical MRI scans were obtained on a 3T Achieva magnetic resonance scanner (Philips, Netherlands) using a standard 8-channel head coil. We employed a T1 volumetric sequence for all analyses. MRI parameters were: slice thickness of 1 mm, echo time (TE) = 3.2ms, repetition time (TR) = 7.1ms, excitation angle (flip angle) 8, isotropic voxels of 1.0 x 1.0 x 1.0 mm, field-of-view (FOV) = 240x240.

#### Cortical thickness analyses

Cortical thickness was determined using the FreeSurfer software v.5.3. This measure was chosen because it is more sensitive to cortical variations than area and volume (13). Measurements were performed according to the protocol suggested by Fischl and Dale (11).

Images were corrected for magnetic field inhomogeneity, aligned to the *Talairach and Tournoux* atlas (14), and skull-stripped. Next, voxels were labeled as gray matter (GM), white matter (WM) or cerebral spinal fluid (CSF). From these,

using triangle meshes, two surfaces were created: the white surface, which is the interface between GM and WM, and the pial surface (11). Cortical thickness was calculated as the shortest distance between the pial and white surface at each vertex across the cortical mantle. For all analyses, a Gaussian filter with 10 mm FWHM was used for smoothing the surface. Furthermore, estimated total intracranial volume (eTIV)(15) and the volume for subcortical regions (16) were calculated. Regional cortical thickness variations between the patient and control groups were assessed using a General Linear Model (GLM) with age, gender, eTIV, and group as regressors. Afterwards, group difference t-test maps were corrected for multiple comparisons using Monte Carlo simulations, enabling the identification of significant vertex-wise group clusters.

In addition to vertex-wise comparisons, FreeSurfer enables the comparison of cortical thickness and subcortical volume measurements for parcellation (16, 17) taking into account anatomical atlases such as proposed by Desikan (18). In this analysis, we performed ANOVA with age, gender and eTIV as covariates to assess cortical thickness and subcortical volume differences between the two groups for each region. In order to correct for multiple comparisons, we employed the Dunn-Sidak multiple comparison test (level of significance  $\alpha = 0.001$ ).

### Correlation analyses

#### *Cortical data*

For correlation analyses with clinical and genetic data, we chose to investigate only those regions where cortical thickness was reduced in MJD/SCA3 patients. First, a single variable GLM was performed, using individually as regressors each one of the following parameters: age, age at onset, duration, CAG repeat length and SARA score.

We then performed multiple regression analyses to investigate: i) the determinants of cortical damage, and ii) correlations with neuropsychological tests. First, a regression of cortical thickness was performed, controlling for age, length of the expanded CAG repeat, age at onset and disease duration. As a second step,

we performed a GLM of neuropsychological data vs thickness measurements, adjusted for the following variables: Beck Depression Inventory (BDI), Beck Anxiety Inventory (BAI), SARA, Age, Gender and Educational level. Systat v13.0 was employed for these analyses. The p-values were set to 0.0014 (Dunn-Sidak correction for multiple comparisons).

### *Subcortical data*

We used linear regression analyses to investigate possible relationships between subcortical volumes and severity of disease (SARA score), adjusted for the following variables: eTIV and gender. These analyses were performed in SYSTAT v13.0 and the level of significance was set at  $p=0.003$  (corrected for multiple comparisons, Dunn-Sidak).

## **RESULTS**

### Cortical thickness analyses

Using vertex-wise analysis, significant differences in cortical thickness between patients and controls were found in the left hemisphere at the superior frontal, superior temporal and precentral cortices, and in the right hemisphere at the superior frontal cortex. These data are shown in Figure1 and Supplemental Data1.

Using the Desikan atlas, significant cortical thinning was found in several regions of both hemispheres (Table 2).

### Volumetric analyses

Several subcortical structures presented significantly smaller volumes in patients with MJD/SCA3 when compared to healthy controls (Table 3). Interestingly, both hippocampi were also atrophic in the MJD/SCA3 group (right:  $4026 \pm 474$  vs  $4435 \pm 507$  mm<sup>3</sup>,  $p<0.001$ ; left:  $3941 \pm 482$  vs  $4259 \pm 489$ mm<sup>3</sup>,  $p<0.001$ ).

### Correlation analyses

## *Cortical data*

### *Single variable*

In the group of patients with MJD/SCA3, the length of the expanded CAG repeat correlated with the thickness of the posterior ramus of the left lateral sulcus ( $r = 0.505$ ,  $p < 0.001$ ). Moreover, the duration of the disease inversely correlated with the caudal middle frontal ( $r = -0.418$ ,  $p = 0.003$ ) and the transverse temporal ( $r = -0.392$ ,  $p = 0.005$ ) cortices in the left hemisphere. In addition, there was a significant inverse correlation between SARA scores and the thickness of the left precentral gyrus ( $r = -0.302$ ,  $p = 0.035$ ), anterior transverse temporal gyrus ( $r = -0.303$ ,  $p = 0.034$ ), superior temporal sulcus ( $r = -0.354$ ,  $p = 0.013$ ), caudal middle frontal ( $r = -0.330$ ,  $p = 0.020$ ), paracentral cortex ( $r = -0.311$ ,  $p = 0.03$ ) and transverse temporal cortex ( $r = -0.346$ ,  $p = 0.015$ ). No significant correlations were found between cortical thickness and age at onset of the disease.

### *Multiple regression*

In the multiple regression model, the thickness of the right angular gyrus, and of the posterior ramus of the lateral and left caudal middle frontal cortex, was significantly correlated with age, age at onset and disease duration (Table 4). We did not find any correlation between the length of the expanded CAG repeat and thickness measurements.

Regarding neuropsychological tests, we found a correlation between: Similarity test (Wechsler Intelligence Adult scale III subtest) and precentral gyrus thickness; RAVEN: Raven Progressive Matrix Test (General Scale) and middle occipital gyrus thickness; Similarity test and superior occipital gyrus thickness (Table 5).

## *Subcortical Data*

We found a significant correlation between SARA scores and subcortical volumes: brainstem ( $r = 0.581$ ,  $p < 0.001$ ), left thalamus volume ( $r = 0.624$ ,  $p < 0.001$ ) and ventral diencephalon both at right ( $r = 0.575$ ,  $p < 0.001$ ) and left ( $r = 0.641$ ,  $p < 0.001$ ) (Supplemental Data2). Duration of the disease also correlated with volumes of left ( $r = 0.619$ ,  $p < 0.001$ ) and right ( $r = 0.578$ ,  $p < 0.001$ ) ventral diencephalon and right cerebellar white matter ( $r = 0.543$ ,  $p = 0.001$ ) (Supplemental Data3). We did not find any correlations between subcortical volumes and age, age at onset and length of the expanded CAG repeat.

## **DISCUSSION**

This is the first study specifically devoted to investigate cerebral cortical damage in MJD/SCA3, using high resolution MRI scans and robust software for cortical thickness measurements (FreeSurfer). We were able to demonstrate multifocal cortical damage in the disease in a large cohort of patients. Motor regions of the frontal lobes were particularly affected, but cortical thinning also included areas of the parietal, temporal and occipital lobes. Gliosis and neuronal loss probably underlie these volumetric abnormalities (19). Previous studies have indeed found loss of giant Betz neurons of layer V predominantly in the primary motor cortex of MJD/SCA3 patients, which is in line with our own results (20). Although we found several atrophic cortical areas, damage was not homogeneously distributed over the cortical mantle. If we consider that ataxin-3 (both normal and expanded) is expressed all over the cortex (21), this suggests that some cortical neurons, such as pyramidal cells, are more vulnerable to the harmful effects of the mutant protein.

Most MRI-based studies in MJD/SCA3 focused in the cerebellum and subcortical structures (5, 22). In accordance with these previous reports, our data also indicate volumetric reduction of both thalami and basal ganglia, as well as the cerebellum and brainstem. These are regions involved in motor control that account for the main clinical manifestations found in patients with MJD/SCA3, such as ataxia, dystonia and pyramidal signs. In our analyses, severity of ataxia correlated with brainstem and thalamic volumes, which gives further support to this

hypothesis. On the other hand, available data that report cortical damage in MJD/SCA3 are scant (5). Some PET and SPECT studies identified cortical areas of hypoperfusion in SCA3, including the inferior and superior portions of the frontal lobes, lateral portion of the temporal lobes, parietal lobes and occipital lobes (8). D'Abreu et al. performed VBM analyses and found widespread cortical atrophy in a large cohort of patients (7). These results are similar to the ones reported here, but we did not find atrophy in some regions reported in that paper, such as insula, cuneus and precuneus (7). This apparent discrepancy is probably explained by the different technical approaches employed by the VBM and FreeSurfer to determine GM volumes. Previous studies, combining VBM and surface-based techniques showed that the two approaches tends to have different results (13, 26). Briefly, VBM relies upon comparisons of GM densities in normalized images, whereas FreeSurfer performs an automated segmentation and calculates thickness in native space images (12, 16, 23-35). VBM merges information about morphology, size and position to identify cortical GM (23), whereas the FreeSurfer approach gives a direct measure of cortical morphology. This last measure is less susceptible to positional and anatomical variance (27) and more sensitive to detect abnormalities in diseased brain (16, 26).

In SCA3, some clinical features are mostly determined by expanded CAG repeat length, such as dystonia, whereas others are time-dependent, such as peripheral nerve damage (28). Therefore, we tried to identify the determinants of cortical damage using multiple variable regression analyses. The thickness of right angular gyrus, caudal middle frontal cortex and posterior fissure significantly correlated with disease duration, but not with CAG repeat length. These results suggest that cerebral cortical damage in MJD/SCA3 is mostly time-dependent, rather than CAG expansion-dependent. It seems that the MJD/SCA3 mutation accelerates an age-dependent phenomenon of neuronal death in some cortical regions.

A major finding in our analyses was motor cortex atrophy in MJD/SCA3 when compared to healthy controls. Furthermore, severity of disease, expressed

by SARA scores, correlated with thickness of precentral and paracentral cortices. Taken together, these data indicate that motor impairment in MJD/SCA3 is caused not only by cerebellar damage, but is also related to cerebral cortex atrophy. A possible explanation is that precentral neuronal loss might disrupt the corticospinal, cortico-bulbar and cortico-ponto-cerebellar tracts. This hypothesis is supported by two recently published DTI-based study in MJD/SCA3, which found abnormal radial diffusivity in the frontal lobe white matter (4). It would be interesting now to validate these findings in a longitudinal study and to separately evaluate patients with different clinical subtypes of the disease.

Several papers have described cognitive impairment in patients with MJD/SCA3, including verbal and visual memory deficits, visuospatial dysfunction and executive dysfunction (9). Depressive symptoms are common as well (9). Some authors consider that these neuropsychological abnormalities in MJD/SCA3 are related to the cerebellar cognitive affective syndrome (CCAS) (29). This syndrome was first described by Schmahmann & Sherman (30) in patients presenting behavioral changes and multiple cognitive deficits due to lesions confined within the cerebellum. The anatomical substrate for CCAS probably involves dysfunction of circuits that connect the cerebellum with the prefrontal, superior parietal, superior temporal and limbic cortices (30). Although this is a sound hypothesis, one must consider that patients with MJD/SCA3 have extra-cerebellar pathology. In fact, we have found volumetric reduction in some cortical areas that might be involved with the mental abnormalities found in MJD/SCA3. Occipital and cingulate gyri damage, for instance, may be associated with visuospatial deficits and mood disorders, respectively. We also found bilateral hippocampal atrophy in the MJD/SCA3 group, which may help to explain both visual and verbal memory impairment in these patients. In addition, we found that some of the affected cortical regions correlated neuropsychological tests, which further supports the concept that cognitive impairment and cerebral damage are related in MJD/SCA3. Thickness of right superior occipital gyrus presented a direct correlation with the similarity subscore of the Wechsler Intelligence Adult scale 3<sup>rd</sup> version and left middle occipital gyrus also correlated with Raven Progressive

Matrix Test (General Scale). These findings can be explained because these subtests require the individual to describe how alike are two given things (similarity) as well as to perform a mental visualization of the patterns used in the Raven progressive matrix, thus demanding intact visuospatial functioning. An unexpected finding was the association between left precentral gyrus thickness and similarity subscore. However, Porro et al. in a functional MRI study found activation of this region in cognitive tasks that involve motor imagery (31).

## **CONCLUSION**

Patients with MJD/SCA3 have cerebral cortical damage, including regions associated with motor and cognitive function. Interestingly, motor and cognitive dysfunction in these patients was significantly associated to the volumetric reduction of some cortical regions. Furthermore, cerebral cortical damage in SCA3/MJD is mostly time-dependent, rather than (CAG) expansion-dependent. Taken together, these data indicate that neurodegeneration in SCA3/MJD extends far beyond the cerebellum and that some clinical manifestations may be caused by direct cerebral cortical damage.

## **REFERENCES**

1. D'Abreu A, Franca MC, Jr., Paulson HL, Lopes-Cendes I. Caring for Machado-Joseph disease: current understanding and how to help patients. *Parkinsonism Relat Disord.* 2010;16:2-7.
2. D'Abreu A, Franca MC, Jr., Yasuda CL, Souza MS, Lopes-Cendes I, Cendes F. Thalamic volume and dystonia in Machado-Joseph disease. *J Neuroimaging.* 2011;21:91-3.
3. Schulz JB, Borkert J, Wolf S, Schmitz-Hubsch T, Rakowicz M, Mariotti C, et al. Visualization, quantification and correlation of brain atrophy with clinical symptoms in spinocerebellar ataxia types 1, 3 and 6. *Neuroimage.* 2010;49:158-68.
4. Guimaraes RP, D'Abreu A, Yasuda CL, Franca MC, Jr., Silva BH, Cappabianco FA, et al. A multimodal evaluation of microstructural white matter damage in spinocerebellar ataxia type 3. *Mov Disord.* 2013;28:1125-32.

5. Tokumaru AM, Kamakura K, Maki T, Murayama S, Sakata I, Kaji T, et al. Magnetic resonance imaging findings of Machado-Joseph disease: histopathologic correlation. *J Comput Assist Tomogr*. 2003;27:241-8.
6. Rub U, Brunt ER, Deller T. New insights into the pathoanatomy of spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease). *Curr Opin Neurol*. 2008;21:111-6.
7. D'Abreu A, Franca MC, Jr., Yasuda CL, Campos BA, Lopes-Cendes I, Cendes F. Neocortical atrophy in Machado-Joseph disease: a longitudinal neuroimaging study. *J Neuroimaging*. 2012;22:285-91.
8. Etchebehere EC, Cendes F, Lopes-Cendes I, Pereira JA, Lima MC, Sansana CR, et al. Brain single-photon emission computed tomography and magnetic resonance imaging in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol*. 2001;58:1257-63.
9. Lopes TM, D'Abreu A, Franca MC, Jr., Yasuda CL, Betting LE, Samara AB, et al. Widespread neuronal damage and cognitive dysfunction in spinocerebellar ataxia type 3. *J Neurol*. 2013;260:2370-9.
10. Kawai Y, Takeda A, Abe Y, Washimi Y, Tanaka F, Sobue G. Cognitive impairments in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol*. 2004;61:1757-60.
11. Fischl B, Dale AM. Measuring the thickness of the human cerebral cortex from magnetic resonance images. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:11050-5.
12. Schmitz-Hubsch T, du Montcel ST, Baliko L, Berciano J, Boesch S, Depondt C, et al. Scale for the assessment and rating of ataxia: development of a new clinical scale. *Neurology*. 2006;66:1717-20.
13. Hutton C, Draganski B, Ashburner J, Weiskopf N. A comparison between voxel-based cortical thickness and voxel-based morphometry in normal aging. *Neuroimage*. 2009;48:371-80.
14. J. T, P. T. *Co-planar Stereotaxic Atlas of the Human Brain.*: Thieme, NY.; 1988.
15. Buckner RL, Head D, Parker J, Fotenos AF, Marcus D, Morris JC, et al. A unified approach for morphometric and functional data analysis in young, old, and demented adults using automated atlas-based head size normalization: reliability

and validation against manual measurement of total intracranial volume. *Neuroimage*. 2004;23:724-38.

16. Fischl B, Salat DH, Busa E, Albert M, Dieterich M, Haselgrove C, et al. Whole brain segmentation: automated labeling of neuroanatomical structures in the human brain. *Neuron*. 2002;33:341-55.

17. Fischl B, van der Kouwe A, Destrieux C, Halgren E, Segonne F, Salat DH, et al. Automatically parcellating the human cerebral cortex. *Cereb Cortex*. 2004;14:11-22.

18. Desikan RS, Segonne F, Fischl B, Quinn BT, Dickerson BC, Blacker D, et al. An automated labeling system for subdividing the human cerebral cortex on MRI scans into gyral based regions of interest. *Neuroimage*. 2006;31:968-80.

19. Durr A, Stevanin G, Cancel G, Duyckaerts C, Abbas N, Didierjean O, et al. Spinocerebellar ataxia 3 and Machado-Joseph disease: clinical, molecular, and neuropathological features. *Ann Neurol*. 1996;39:490-9.

20. Seidel K, Siswanto S, Brunt ER, den Dunnen W, Korf HW, Rub U. Brain pathology of spinocerebellar ataxias. *Acta Neuropathol*. 2012;124:1-21.

21. Paulson HL, Das SS, Crino PB, Perez MK, Patel SC, Gotsdiner D, et al. Machado-Joseph disease gene product is a cytoplasmic protein widely expressed in brain. *Ann Neurol*. 1997;41:453-62.

22. Rub U, Gierga K, Brunt ER, de Vos RA, Bauer M, Schols L, et al. Spinocerebellar ataxias types 2 and 3: degeneration of the pre-cerebellar nuclei isolates the three phylogenetically defined regions of the cerebellum. *J Neural Transm*. 2005;112:1523-45.

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

34. Dale AM, Fischl B, Sereno MI. Cortical surface-based analysis. I. Segmentation and surface reconstruction. *Neuroimage*. 1999;9:179-94.

25. Fischl B, Sereno MI, Dale AM. Cortical surface-based analysis. II: Inflation, flattening, and a surface-based coordinate system. *Neuroimage*. 1999;9:195-207.

26. Pereira JB, Ibarretxe-Bilbao N, Marti MJ, Compta Y, Junque C, Bargallo N, et al. Assessment of cortical degeneration in patients with Parkinson's disease by

voxel-based morphometry, cortical folding, and cortical thickness. *Hum Brain Mapp.* 2012;33:2521-34.

27. Voets NL, Hough MG, Douaud G, Matthews PM, James A, Winmill L, Webster P, Smith S. Evidence for abnormalities of cortical development in adolescent-onset schizophrenia. *Neuroimage.* 2008;43:665–675.

28. Schmitz-Hübsch, Coudert M, Bauer P, Giunti P, Globas C, Baliko L, Filla A, Mariotti C, Rakowicz M, Charles P, Ribai P, Szymanski S, Infante J, van de Warrenburg BP, Dürr A, Timmann D, Boesch S, Fancellu R, Rola R, Depondt C, Schöls L, Zdienicka E, Kang JS, Döhlinger S, Kremer B, Stephenson DA, Melegh B, Pandolfo M, di Donato S, du Montcel ST, Klockgether T. Spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6: disease severity and nonataxia symptoms. *Neurology.* 2008;71:982-9.

29. Braga-Neto P, Dutra LA, Pedroso JL, Felicio AC, Alessi H, Santos-Galduroz RF, et al. Cognitive deficits in Machado-Joseph disease correlate with hypoperfusion of visual system areas. *Cerebellum.* 2012;11:1037-44.

30. Schmahmann JD, Sherman JC. The cerebellar cognitive affective syndrome. *Brain.* 1998;121:561-79.

31. Porro CA, Francescato MP, Cettolo V, Diamond ME, Baraldi P, Zuiani C, et al. Primary motor and sensory cortex activation during motor performance and motor imagery: a functional magnetic resonance imaging study. *J Neurosci.* 1996;16:7688-98.

## **FIGURE LEGENDS**

Figure 1: Map for group difference between patients and controls regarding cortical thickness, vertex-by-vertex analysis.

## **TABLE LEGENDS**

Table 1: Demographics Data

Table2: Gyral-based areas with cortical thinning in patients with MJD/SCA3.

Table3: Subcortical structures with volumetric reduction in patients with MJD/SCA3.

Table 4: Multiple regression of thickness measurements vs clinical parameters in the MJD/SCA3 group.

Table 5: Multiple regression of thickness measurements vs neuropsychological tests in the MJD/SCA3 group.

## TABLES

Table 1: Demographics Data

	Patients (n=49)	Controls (n=49)
Gender (men/women)	27/22	27/22
Age* (mean $\pm$ SD, years)	47.7 $\pm$ 13.0	47.5 $\pm$ 12.7
CAG (mean $\pm$ SD)	72.1 $\pm$ 4.2	-
Age at onset (mean $\pm$ SD, years)	37.5 $\pm$ 12.5	-
Duration (mean $\pm$ SD, years)	10.0 $\pm$ 4.7	-
SARA (mean $\pm$ SD)	14.7 $\pm$ 7.3	-

\*P-value= 0.932, t-test

Table 2: Gyral-based areas with cortical thinning in patients with MJD/SCA3. Group difference for ROI analyses using Age, Gender and eTIV as covariates. Only structures with ANOVA corrected p-values <0.001 are shown.

Structure	MJD mean (mm)	Control mean (mm)
<b>LEFT HEMISPHERE</b>		
Middle Occipital Gyrus	2.27 $\pm$ 0.19	2.40 $\pm$ 0.17
Precentral Gyrus	2.49 $\pm$ 0.18	2.63 $\pm$ 0.20
Anterior Transverse Temporal Gyrus	2.13 $\pm$ 0.27	2.31 $\pm$ 0.24
Posterior Ramus of the Lateral Sulcus	2.14 $\pm$ 0.22	2.30 $\pm$ 0.20
Inferior Part of the Precentral Sulcus	2.12 $\pm$ 0.15	2.26 $\pm$ 0.16
Superior Temporal Sulcus	2.19 $\pm$ 0.17	2.32 $\pm$ 0.14
<b>RIGHT HEMISPHERE</b>		
Paracentral Lobule and Sulcus	1.98 $\pm$ 0.18	2.16 $\pm$ 0.17
Middle-Posterior Part of the Cingulate Gyrus and Sulcus	2.35 $\pm$ 0.19	2.47 $\pm$ 0.14
Short Insular Gyri	3.35 $\pm$ 0.30	3.49 $\pm$ 0.19
Superior Occipital Gyrus	1.89 $\pm$ 0.19	2.03 $\pm$ 0.21
Angular Gyrus	2.35 $\pm$ 0.17	2.47 $\pm$ 0.17
Precentral Gyrus	2.43 $\pm$ 0.25	2.62 $\pm$ 0.22
Posterior Ramus of the Lateral Sulcus	2.22 $\pm$ 0.18	2.34 $\pm$ 0.14
Central Sulcus	1.62 $\pm$ 0.12	1.72 $\pm$ 0.12
Marginal Branch of the Cingulate Sulcus	1.99 $\pm$ 0.16	2.11 $\pm$ 0.16
Medial Occipito-Temporal Sulcus and Lingual Sulcus	2.22 $\pm$ 0.21	2.37 $\pm$ 0.19

Table 3: Subcortical structures with volumetric reduction in patients with MJD/SCA3. Only structures with ANOVA corrected p-values <0.001 are shown.

<b>Structure</b>	<b>MJD mean (mm<sup>3</sup>)</b>	<b>Control mean (mm<sup>3</sup>)</b>
<b>LEFT HEMISPHERE</b>		
<b>Cerebellum WM</b>	8511 ± 1951	15204 ± 2298
<b>Cerebellum GM</b>	38270 ± 4735	44921 ± 6052
<b>Thalamus</b>	6184 ± 758	7439 ± 1036
<b>Caudate</b>	3005 ± 355	3471 ± 427
<b>Putamen</b>	5099 ± 608	5804 ± 956
<b>Pallidum</b>	1167 ± 200	1395 ± 261
<b>Ventral diencephalon</b>	2972 ± 364	3742 ± 374
<b>RIGHT HEMISPHERE</b>		
<b>Cerebellum WM</b>	8322 ± 1863	15449 ± 2063
<b>Cerebellum GM</b>	38781 ± 4895	45603 ± 5819
<b>Thalamus</b>	5782 ± 640	6631 ± 737
<b>Caudate</b>	3169 ± 392	3678 ± 543
<b>Putamen</b>	5101 ± 585	5747 ± 821
<b>Pallidum</b>	1186 ± 163	1565 ± 240
<b>Ventral diencephalon</b>	3018 ± 352	3852 ± 460
<b>Brainstem</b>	14313 ± 2367	20929 ± 2445

Table 4: Multiple regression of thickness measurements vs clinical parameters in the MJD/SCA3 group.

<b>Structure</b>	<b>R-adjust</b>	<b>p-value regression</b>	<b>Independent Variables</b>	<b>Regression Coef.</b>	<b>p-value</b>
<b>LH_ Caudal Middle Frontal Cortex</b>	0.569	0.004	<i>Age</i>	-0.240	0.029
			<i>CAG</i>	-0.007	0.129
			<i>Onset</i>	0.239	0.029
			<i>Duration</i>	0.223	0.040
			<i>Gender</i>	0.070	0.105
<b>RH_Angular Gyrus</b>	0.662	<0.001	<i>Age</i>	-0.390	0.001
			<i>CAG</i>	-0.003	0.469
			<i>Onset</i>	0.386	0.001
			<i>Duration</i>	0.376	0.001
			<i>Gender</i>	0.111	0.010
<b>RH_ Posterior Ramus of the Lateral Sulcus</b>	0.603	0.001	<i>Age</i>	-0.266	0.029
			<i>CAG</i>	-0.006	0.232
			<i>Onset</i>	0.258	0.033
			<i>Duration</i>	0.248	0.039
			<i>Gender</i>	0.058	0.219

Table 5: Multiple regression of thickness measurements vs neuropsychological tests in the MJD/SCA3 group.

Neuropsychological Test	R-adjust	p-value adjust	Independent Variables	Regression Coef.	p-value
<b>Similarity*</b>	0.823	0.001	<b>LH_Precentral Gyrus</b>	<b>-13.261</b>	<b>0.041</b>
			BDI	-0.260	0.044
			BAI	0.217	0.156
			SARA	0.160	0.395
			AGE	0.057	0.611
			Educational level	1.543	<0.001
			Gender	-3.319	0.164
			<b>RAVEN**</b>	0.900	<0.001
BDI	-0.209	0.131			
BAI	0.135	0.419			
SARA	-0.047	0.805			
AGE	-0.170	0.171			
Educational level	2.708	<0.001			
Gender	0.497	0.846			
<b>Similarity*</b>	0.837	<0.001			
			BDI	-0.251	0.044
			BAI	0.151	0.315
			SARA	0.191	0.278
			AGE	0.018	0.872
			Educational level	1.688	<0.001
			Gender	-2.611	0.255

\*Similarity: Wechsler Intelligence Adult scale III subtest

\*\*RAVEN: Raven Progressive Matrix Test (General Scale)

Table 6: Cortical regions with significant thickness differences between patients and controls (Supplemental Data1).

Cortical Area	Cluster size (mm <sup>2</sup> )	TalX	TalY	TalZ	MJD mean (mm)	Control Mean (mm)	CWP
LH Superior Frontal	1538.32	-22.6	-15.7	65.4	2.42 ± 0.16	2.50 ± 0.15	0.013
LH Superior Temporal	1351.34	-48.3	-15.6	-2.4	2.58 ± 0,23	2.70± 0.20	0.027
LH Precentral	1415.30	-54.1	1.1	32.7	2.27 ± 0.15	2.40 ± 0.14	0.021
RH Superior Frontal	1119.17	20.6	26.2	48.0	2.12 ± 0.17	2.29 ± 0.16	0.014

Table 7: Multiple regression of subcortical volume measurements vs SARA score corrected to eTIV and gender in the MJD/SCA3 group (Supplemental Data2).

Structure	R-adjust	p-valor regression	Independent Variables	Regression Coef.	p-value
Brainstem	0.581	<0.001	Gender	-1928.658	0.002
			eTIV	-0.001	0.731
			SARA	-137.261	0.002
LH_Thalamus	0.624	<0.001	Gender	-817,945	<0.001
			eTIV	0.001	0.139
			SARA	-26.330	0.041
RH_ Ventral Diencephalon	0.575	<0.001	Gender	-351.105	<0.001
			eTIV	<0.001	0.771
			SARA	-13.465	0.031
LH_ Ventral Diencephalon	0.641	<0.001	Gender	-382.586	<0.001
			eTIV	<0.001	0.619
			SARA	-17.896	0.004

Table 8: Multiple regression of subcortical volume measurements vs Duration score corrected to eTIV and gender in the MJD/SCA3 group (Supplemental Data3).

<b>Structure</b>	<b>R-adjust</b>	<b>p-value regression</b>	<b>Independent Variables</b>	<b>Regression Coef.</b>	<b>p-value</b>
<b>Brainstem</b>	0.595	<0.001	<i>Gender</i>	-1673.558	0.006
			eTIV	<0.001	0.868
			<i>Duration</i>	-173.765	0.001
<b>RH_Cerebellum White Matter</b>	0.543	0.001	<i>Gender</i>	-565.998	0.236
			eTIV	0.002	0.261
			<i>Duration</i>	-149.374	<0.001
<b>RH_Ventral Diencephalon</b>	0.578	<0.001	<i>Gender</i>	-326.596	<0.001
			eTIV	<0.001	0.522
			<i>Duration</i>	-16.747	0.026
<b>LH_Ventral Diencephalon</b>	0.619	<0.001	<i>Gender</i>	-355.429	<0.001
			eTIV	<0.001	0.989
			<i>Duration</i>	-19.118	0.011

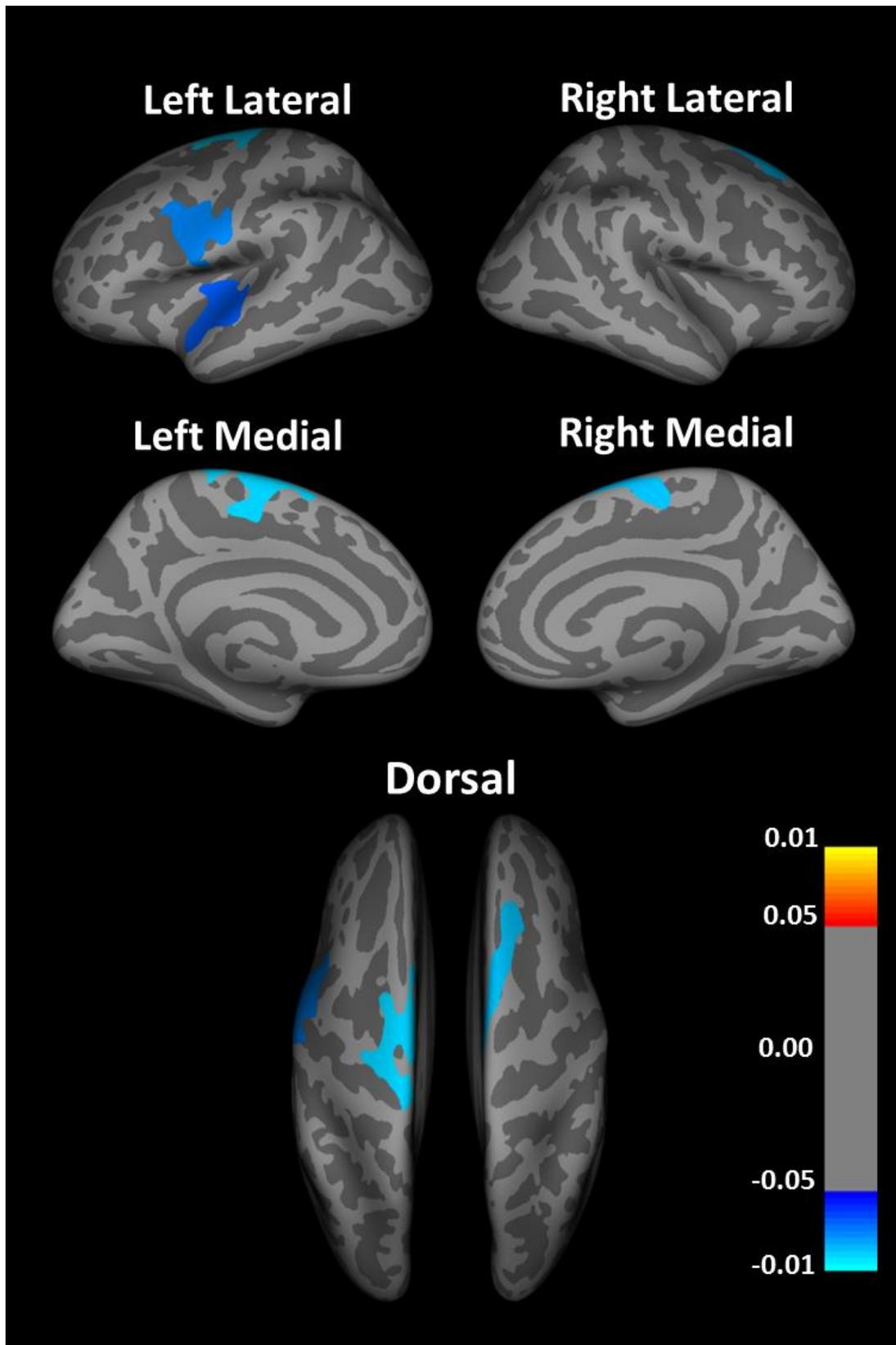


Figura 3: Map for group difference between patients and controls regarding cortical thickness. (Figure 1 - paper)

# Discussão

Este é o primeiro estudo especificamente devotado à investigação de dano cortical cerebral em pacientes com SCA3/MJD, usando imagens de ressonância magnética de alta resolução e um *software* robusto para realizar medidas e análise de espessura cortical (FreeSurfer). O trabalho foi capaz de evidenciar dano cortical multifocal na SCA3/MJD em uma grande coorte de pacientes. A região motora, no lobo frontal de ambos hemisférios, foi particularmente afetada. Contudo, também foi encontrado afinamento cortical nos lobos occipital, temporal e parietal. A gliose e a perda neuronal provavelmente estão envolvidas nestas anormalidades volumétricas (Dürr *et al.*, 1996). Um estudo neuropatológico encontrou, de fato, uma perda dos neurônios gigantes de Betz da camada V no córtex motor primário de pacientes com SCA3/MJD, o qual está em acordo com os resultados aqui apresentados (Seidel *et al.*, 2012). Embora tenham sido encontradas muitas áreas corticais atrofiadas, o dano não foi homogeneamente distribuído sobre o manto cortical. Considerando que a ataxina-3, tanto a expandida quanto a normal, é expressa em todo o córtex (Paulson *et al.* 1997), isto sugere que alguns neurônios são mais sensíveis aos efeitos tóxicos da proteína mutante.

A maioria dos estudos baseados em MRI na SCA3/MJD focaram no cerebelo e estruturas subcorticais (Tokumaru *et al.* 2003; Rüb *et al.* 2005; Yamada *et al.* 2005). Em acordo com estes estudos prévios, os dados aqui apresentados também indicaram redução volumétrica dos tálamos e gânglios basais, bem como do cerebelo e tronco. Estas regiões estão envolvidas no controle motor e acredita-se que são as principais responsáveis pelas manifestações clínicas encontradas nos pacientes com SCA3/MJD, tais como ataxia, distonia e sinais piramidais. Nas análises aqui realizadas, a gravidade da doença, expressa pela escala de ataxia se correlacionou com os volumes do tronco e tálamo, o qual cria um forte pilar de sustentação desta hipótese. Por outro lado, há muito poucos dados que relatam evidências de dano cortical (Tokumaru *et al.*, 2003; Murata *et al.*, 1998; D'Abreu *et al.*, 2012). Alguns estudos de PET ou SPECT identificaram áreas corticais de hipoperfusão em SCA3/MJD, incluindo a porção inferior e superior do lobo frontal, porção lateral do lobo temporal, lobo occipital e parietal (Etchebehere *et al.*, 2001;

Taniwaki et al., 1997; Braga-Neto et al., 2012). D'Abreu et al. realizaram um estudo com VBM e encontraram atrofia cortical muito difusa em uma grande coorte de pacientes (D'Abreu et al., 2012). Estes resultados são similares aos nossos, mas não foram aqui encontrados danos em algumas regiões relatadas no artigo de D'Abreu et al., tais como a ínsula, cuneus e precuneus (D'Abreu et al. 2012). Esta aparente discrepância é provavelmente explicada pelas diferentes abordagens técnicas que o SPM (software com o qual se realiza o procedimento VBM) e o FreeSurfer usam para determinar o volume de GM.

Como notado, os dois softwares, FreeSurfer e VBM, apresentaram alguns resultados semelhantes e outros díspares. Tais diferenças podem ser explicadas com base em várias questões. A priori, a área e a espessura são métodos fundamentalmente baseados em superfície e medem diferenças na GM baseadas na geometria da superfície cortical. Ao contrário, o método VBM (implementado no SPM) realiza comparações baseadas em voxel para todo o cérebro de locais de GM entre os grupos de sujeitos (Ashburner e Friston, 2000, 2001). Estudos anteriores combinando VBM com a espessura cortical demonstraram que estas técnicas tendem a apresentar resultados diferentes (Hyde et al., 2010; Jiao et al., 2010; Voets et al., 2008; Pereira et al., 2012). Pereira et al. 2012 e Jiao et al. 2010 encontraram que os modelos de diagnóstico baseados na espessura cortical foram superiores aos resultados encontrados por medidas de VBM. Segundo Hutton et al. (2009), técnicas baseadas na medida de espessura cortical detectam um número maior de alterações no córtex cerebral, com o envelhecimento normal, quando comparadas com o VBM. As diferenças atribuídas a estas técnicas são relacionadas às limitações em avaliar a GM cortical pelo VBM, que funde informações sobre morfologia, tamanho e posição (Ashburner and Friston, 2001), resultando em dados provenientes da mistura de espessura e área cortical (Park et al. 2009; Voets et al. 2008), sendo, portanto, medidas menos específicas. Além disso, análises de VBM são particularmente sensíveis a erros de registros através das diferenças entre os cérebros e à classificação incorreta das classes de tecidos durante a segmentação, o qual pode ser erroneamente interpretado como redução de área e espessura (Ashburner, 2009). No entanto, a espessura cortical fornece

um dado mais direto da morfologia cortical, que é menos susceptível à variância posicional, dado que a extração do córtex segue a superfície da GM, apesar das variações locais na sua posição (*Kim et al., 2005; MacDonald et al., 2000*). Além disso, a principal vantagem da medida de espessura cortical é que elas permitem precisão subvoxel, pois estas medidas estão atribuídas a vértices individuais em vez de voxels (*Fischl and Dale, 2000*). Por último, o grau de suavização que cada técnica exige para validar o resultado estatístico final é diferente. Além disso, *Voets et al. (2008)* demonstraram que o VBM é sensível a dimorfismos na citoarquitetura do córtex cerebral, o que pode acarretar mudanças na área cortical e conseqüentemente em um resultado falso positivo.

Com respeito aos resultados apresentados neste estudo relativo à análise de grupo, é notado que há algumas diferenças entre os resultados obtidos pela análise vértice-por-vértice e ROI análise. A primeira abordagem, requer uma rigorosa sobreposição espacial dos vértices demonstrando um afinamento cortical significativo a fim de capturar a diferença entre os grupos, por exemplo o córtex precentral. No entanto, a abordagem baseada em ROI exibe uma medida de espessura cortical que, na verdade, é um valor médio dado pela média da espessura de todos os vértices dentro de um dado ROI, que neste caso é uma região anatômica. Além disso, A ROI análise permite identificar diferenças mesmo no caso de sujeitos com um envolvimento heterogêneo do giro cortical de interesse (*Agosta et al. 2012*). Contudo, a análise vértice-por-vértice permite investigar todo o córtex e possui a vantagem de encontrar regiões que não são relacionadas previamente à doença. Entretanto, ela também vincula o risco inerente de gerar resultados falso positivos mesmo com correção para múltiplas comparações devido ao grande número de vértices os quais são comparados. Ao contrário, a ROI análise, corrigida para múltiplas comparações, vem apresentando fortes diferenças absolutas na espessura cortical média e resultados altamente significantes mesmo para aquelas regiões anatômicas as quais não são significantes na abordagem vértice-por-vértice (*Schultz et al. 2010*). Resumindo, primeiramente é feito uma análise exploratória, vértice-por-vértice, podendo, assim, existir um subconjunto de vértices que são diferentes entre os grupos. A

ROI análise é feita então, pois o efeito pode ser pequeno para cada vértice e a média sobre os vértices pode melhorar o poder estatístico da medida, a menos que o efeito seja restrito à um número muito pequeno de vértices.

Na SCA3/MJD, algumas características clínicas são principalmente determinadas pelo tamanho do trato de CAG expandido, por exemplo, a distonia, embora outras sejam tempo-dependentes, tal como danos nos nervos periféricos (Schmitz-Hübsch *et al.* 2008; Klockgether *et al.* 1999). Portanto, o objetivo aqui foi tentar identificar os determinantes do dano cortical usando a análise de regressão de múltiplas variáveis. A espessura do giro angular direito, córtex caudal frontal medial e fissura posterior se correlacionaram significativamente com a duração da doença, mas não com o tamanho da expansão de CAG. Estes resultados sugerem que o dano cortical cerebral na SCA3/MJD é mais dependente do tempo do que da expansão de CAG. Com isso, pode-se propor a hipótese que a mutação da SCA3/MJD acelera o fenômeno de morte natural dependente da idade em algumas regiões corticais.

O principal resultado proveniente das análises deste trabalho foi a atrofia do córtex motor em pacientes com SCA3/MJD, quando comparado com controles saudáveis. Além disso, a gravidade da doença, expressa pela escala SARA, se correlacionou com a espessura do córtex precentral e paracentral. Juntos, estes dados indicam que a disfunção motora na SCA3/MJD é causada não somente pelo dano cerebelar, mas, também, é associado a danos no córtex cerebral. Uma possível explicação para este resultado sugere a ruptura de circuitos neuronais, tais como o córtico-espinal, córtico-bulbar e córtico-pontino-cerebelar, causada pela perda neuronal do córtex precentral. Esta hipótese é validada por um estudo muito recente, o qual baseia-se em técnicas de DTI (*Difussion Tensor Imaging*) em pacientes com SCA3/MJD, cujo principal resultado relata medidas de difusividade radial anormais na WM do lobo frontal (Guimarães *et al.* 2013). A fim de validar, de fato, estes resultados, seria interessante analisar estes dados em um estudo longitudinal e, separadamente, analisar pacientes com diferentes subtipos clínicos da doença.

Vários estudos têm descrito piora cognitiva em pacientes com SCA3/MJD, incluindo déficits de memória visual e verbal, e disfunção visuoespacial e executiva (Kawai *et al.* 2004; Zawacki *et al.* 2004; Lopes *et al.* 2013; Braga-Neto *et al.* 2012). Sintomas depressivos são comuns também (Cecchin *et al.*, 2007); Lopes *et al.* 2013). Alguns autores consideram que estas anormalidades neuropsicológicas na SCA3/MJD são relacionadas à Síndrome Afetiva Cognitiva Cerebelar (Cerebellar Cognitive Affective Syndrome, CCAS) (Braga-Neto *et al.* 2012). Esta síndrome foi primeiramente descrita por Schmahmann & Sherman (Schmahmann *et al.* 1998) em pacientes que apresentavam mudanças de comportamento e déficits cognitivos múltiplos oriundos de lesões, exclusivamente, no cerebelo. O substrato anatômico para a CCAS provavelmente envolve a disfunção de circuitos que conectam o cerebelo com os córtices pré-frontal, superior parietal, superior temporal e límbico (Schmahmann *et al.* 1998). Embora esta seja uma hipótese pertinente, deve-se considerar que pacientes com SCA3/MJD possuem patologia extra-cerebelar. De fato, foi encontrada aqui uma redução volumétrica em algumas áreas corticais que podem estar envolvidas com as anormalidades mentais encontradas nos pacientes com SCA3/MJD. Danos no giro occipital e no cíngulo podem estar associados com déficits visuoespaciais e distúrbios comportamentais, respectivamente. Também foi encontrada atrofia hipocampal no grupo de SCA3/MJD, o qual pode ajudar a explicar a alteração da memória verbal e visual nestes pacientes. Além disso, várias regiões corticais afetadas se correlacionaram com resultados de testes neuropsicológicos, os quais embasam melhor a ideia da relação entre piora cognitiva e dano cerebral na SCA3/MJD. A espessura do sulco occipitotemporal medial apresentou correlação direta com o teste de matrizes progressivas de Raven e a espessura do giro occipital superior direito e o subteste de semelhanças da Escala de Inteligência de Wescheler, 3ª versão. Isto pode ser explicado pelo fato de ambos os testes requererem que o indivíduo descreva a semelhança de duas coisas e, com isso, demanda um funcionamento visuoespacial intacto. Ademais, a associação entre a espessura do giro precentral esquerdo com o teste de semelhanças foi um achado inesperado. Contudo, Porro *et al.*, em um estudo de fMRI, encontraram ativação

desta região em tarefas cognitivas que envolvem imaginação motora (Porro *et al.*, 1996). Concluindo, o presente estudo apresenta novas evidências de que déficits cognitivos em pacientes com SCA3/MJD podem estar relacionados tanto ao dano cerebral quanto ao dano cerebelar.

# Conclusão

1. Pacientes com doença de Machado-Joseph possuem dano cortical cerebral focal em regiões associadas com a função motora e cognitiva.
2. Pacientes com doença de Machado-Joseph apresentam dano subcortical e cerebelar,
3. Pacientes com SCA3/MJD apresentam atrofia hipocampal bilateral.
4. Os danos corticais e subcorticais se correlacionam com as manifestações clínicas, tanto motoras quanto cognitivas, da doença.
5. A gravidade da doença se correlacionou com a atrofia do córtex motor primário e volume do tronco encefálico. Estes dados sugerem que a disfunção motora não é causada exclusivamente pela degeneração do cerebelo.
6. O dano cortical cerebral em SCA3/MJD mostrou-se mais tempo-dependente do que CAG-dependente.
7. A degeneração cortical de algumas regiões se correlacionou com o declínio cognitivo dos pacientes com SCA3/MJD.

# Referências

- Agosta F, Valsasina P, Riva N, Copetti M, Messina MJ, Prella A, Comi G, Filippi M. The cortical signature of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*. 2012; 7(8)
- Ashburner J, Friston KJ. Voxel-based morphometry—The methods. *Neuroimage* 2000; 11:805–821.
- Ashburner J, Friston KJ. Why voxel-based morphometry should be used. *Neuroimage* 2001; 11:805–821.
- Ashburner J. Computational anatomy with the SPM software. *Magn Res Imaging* 2009; 27:1163–1174.
- Beck AT. Beck depression inventory manual: Psychology Corporation, San Antonio, 1993.
- Braga-Neto P, Dutra LA, Pedroso JL, et al. Cognitive deficits in Machado-Joseph disease correlate with hypoperfusion of visual system areas. *Cerebellum*. 2012;11:1037-44.
- Braga-Neto P, Felicio AC, Hoexter MQ, Pedroso JL, Dutra LA, Alessi H, Minett T, Santos-Galduroz RF, da Rocha AJ, Garcia LA, Bertolucci PH, Bressan RA, Barsottini OG. Cognitive and olfactory deficits in Machado-Joseph disease: A dopamine transporter study. *Parkinsonism Relat Disord* 2012; 18:854-858.
- Buckner RL, Head D, Parker J, Fotenos AF, Marcus D, Morris JC, et al. A unified approach for morphometric and functional data analysis in young, old, and demented adults using automated atlas-based head size normalization: reliability and validation against manual measurement of total intracranial volume. *Neuroimage*. 2004; 23:724-38.
- Camargos ST, Marques WJr, Santos AC. Brain stem and cerebellum volumetric analysis of Machado Joseph disease patients. *Arq Neuropsiquiatr*. 2011;69:292-296.
- Cerasa A., Messina D., Nicoletti G., et al. Cerebellar atrophy in essential tremor using an automated segmentation method. *Am. J. Neuroradiol*. 2009; 30:1240-1243.

Coutinho P. Doença de Machado-Joseph: Tentativa de definição. PhD Dissertation, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Porto; 1992.

Cunha JA, Trentini CM, Argimon IL, et al. Teste Wisconsin de classificação de cartas: Casa do Psicólogo, São Paulo 2005.

D'Abreu A, França M Jr, Conz L, Friedman J H, Nucci A M, Cendes F, Lopes-Cendes I. Sleep symptoms and their clinical correlates in Machado-Joseph disease. *Acta Neural Scand* 2009; 119:277-280.

D'Abreu A, França MCJr, Paulson HL, et al. Caring for Machado-Joseph disease: Current understanding and how to help patients. *Parkinsonism and Related Disorders* 2010; 16:2-7.

D'Abreu A, França MCJr, Yasuda CL, et al. Neocortical atrophy in Machado-Joseph disease: A longitudinal neuroimaging study. *J. Neuroimaging* 2012; 22:285-291.

D'Abreu A, França MCJr, Yasuda CL, et al. Thalamic volume and dystonia in Machado-Joseph disease. *J. Neuroimaging* 2011; 21:e91-93

Dale AM, Fischl B, Sereno MI. Cortical surface-based analysis. I. Segmentation and surface reconstruction. *Neuroimage*. 1999; 9:179-94.

Dale, A.M., Sereno, M.I. Improved localization of cortical activity by combining EEG and MEG with MRI cortical surface reconstruction. *J. Cogn. Neurosci* 1993; 5:162–176.

de Castilhos RM, Furtado GV, Gheno TC, Schaeffer P, Russo A, Barsottini O, Pedroso JL, Salarini DZ, Vargas FR, Lima MA, Godeiro C, Santana-da-Silva LC, Toralles MB, Santos S, van der Linden H Jr, Wanderley HY, de Medeiros PF, Pereira ET, Ribeiro E, Saraiva-Pereira ML, Jardim LB. Spinocerebellar ataxias in Brazil-frequencies and modulating effects of related genes. *Cerebellum*. 2014 13:17-28.

Desikan, R.S., Ségonne, F., Fischl, B., Quinn, B.T., Dickerson, B.C., Blacker, D., Buckner, R.L., Dale, A.M., Maguire, R.P., Hyman, B.T., Albert, M.S., Killiany, R.J.

An automated labeling system for subdividing the human cerebral cortex on mri scans into gyral based regions of interest. *NeuroImage* 2006; 31:968–980.

Duda, R.O., Hart, P.E., Stork, D.G. *Pattern Classification*, 2nd ed R Wiley, New York, 2001.

Dürr A, Stevanin G, Cancel G, Duyckaerts C, Abbas N, Didierjean O et al. Spinocerebellar ataxia 3 and Machado-Joseph disease: clinical, molecular, and neuropathological features. *Ann Neurol*. 1996; 39:490-499.

Etchebehere EC, Cendes F, Lopes-Cendes I, et al. Brain single-photon emission computed tomography and magnetic resonance imaging in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol*. 2001; 58:1257-1263.

Fischl B, Dale AM. Measuring the thickness of the human cerebral cortex from magnetic resonance images. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97:11050-11055.

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* 2001; 20:70–80.

Fischl, B., Salat, D.H., Busa, E., Albert, M., Dieterich, M., Haselgrove, C., van der Kouwe, A., Killiany, R., Kennedy, D., Klaveness, S., Montillo, A., Makris, N., Rosen, B., Dale, A.M. Whole brain segmentation: automated labeling of neuroanatomical structures in the human brain. *Neuron* 2002; 33:341–355.

Fischl, B., Sereno, M.I., Dale, A.M. Cortical surface-based analysis II: inflation, flattening, and a surface-based coordinate system. *NeuroImage* 1999a; 9:195–207.

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*. 1999b; 8:272–284.

Fischl, B., van der Kouwe, A., Destrieux, C., Halgren, E., Ségonne, F., Salat, D.H., Busa, E., Seidman, L.J., Goldstein, J., Kennedy, D., Caviness, V., Makris, N., Rosen, B., Dale, A.M. Automatically parcellating the human cerebral cortex. *Cereb. Cortex* 2004; 14:11–22.

Fox, P.T., Perlmutter, J.S., and Raichle, M.E. Stereotactic method for determining anatomical localization in physiological brain images. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 1984; 4: 634.

França M Jr, D'Abreu A, Friedman J H, Nucci A M, Lopes-Cendes I. Chronic pain in Machado-Joseph disease. A frequent and disabling symptom. *Arch Neurol* 2007; 64:1767-1770

França MC Jr, D'abreu A, Nucci A, Cendes F, Lopes-Cendes I. Prospective study of peripheral neuropathy in Machado-Joseph disease. *Muscle Nerve* 2009; 40:1012-8.

França MC Jr, Emmel VE, D'Abreu A, et al. Normal ATXN3 Allele but Not CHIP Polymorphisms Modulates Age at Onset in Machado-Joseph Disease, *Front Neurol*. 2012; 3:164.

Geman S, and Geman D. Stochastic relaxation, Gibbs distributions and the Bayesian restoration of images. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* 1984; 6:721–741.

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; 28:1125-1132.

Hagler DJ, Jr., Saygin AP, Sereno MI. Smoothing and cluster thresholding for cortical surface-based group analysis of fMRI data. *Neuroimage*. 2006; 33:1093-1103.

Han X, Jovicich J, et al. Reliability of MRI-derived measurements of human cerebral cortical thickness: The effects of field strength, scanner upgrade and manufacturer. *NeuroImage* 2006; 32:180 –194.

Hooper HE. Hooper visual organization test (VOT): Western Psychological Services, Los Angeles. 1983.

Hutton C, Draganski B, Ashburner J, Weiskopf N. A comparison between voxel-based cortical thickness and voxel-based morphometry in normal aging. *Neuroimage*. 2009; 48:371-80.

Hyde KL, Samson F, Evans AC, Mottron L. Neuroanatomical differences in brain areas implicated in perceptual and other core features of autism revealed by cortical thickness analysis and voxel-based morphometry. *Hum Brain Mapp* 2010; 31:556–566.

Jardim LB, Pereira ML, et al. Neurologic findings in Machado-Joseph disease: relation with disease duration, subtypes and (CAG)<sub>n</sub>. *Arch Neurol* 2001; 58:899-904.

Jiao Y, Chen R, Ke X, Chu K, Lu Z, Herskovits EH. Predictive models of autism spectrum disorder based on brain regional cortical thickness. *Neuroimage* 2010; 50:589–599.

Kaplan EF, Goodglass H, Weintraub S. *The Boston naming test*, Lea & Febiger, Philadelphia, 1983.

Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, et al. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat. Genet* 1994; 8:221-8.

Kawai Y, Takeda A, Abe Y, Washimi Y, Tanaka F, Sobue G. Cognitive impairments in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol* 2004; 61:1757-1760.

Kim JS, Singh V, Lee JK, Lerch J, Ad'Dabbagh Y, MacDonald D, Lee JM, Kim SI, Evans AC. Automated 3-D extraction and evaluation of the inner and outer cortical surfaces using a Laplacian map and partial volume effect classification. *Neuroimage* 2005; 27:210–211.

Kraft A, Grimsen C, Kehrer S, et al. Neurological and neuropsychological characteristics of occipital, occipito-temporal and occipito-parietal infarction. *Cortex*. 2012 Oct 27.

Lezak MD. *Neuropsychological assessment* (3<sup>th</sup> ed), New York: Oxford University Press, 1995.

Lopes TM, D'Abreu A, Franca MC, Jr., et al. Widespread neuronal damage and cognitive dysfunction in spinocerebellar ataxia type 3. *J Neurol.* 2013;260:2370-9.

Lopes-Cendes I, Teive HG, Calcagnotto ME, et al. Frequency of the different mutations causing spinocerebellar ataxia (SCA1, SCA2, MJD/SCA3 and DRPLA) in a large group of Brazilian patients. *Arq Neuropsiquiatr* 1997; 55: 519-29.

MacDonald, D., Kabani, N., Avis, D., Evans, A.C. Automated 3- D extraction of inner and outer surfaces of cerebral cortex from MRI. *Neuroimage* 2000; 12, 340–356.

Malloy-Diniz LF, Lasmar VA, Gazinelli Lde S, et al. The Rey Auditory-Verbal Learning Test: applicability for the Brazilian elderly population. *Rev Bras Psiquiatr.* 2007; 29:324-9.

McDonald CR, Hagler DJ Jr, Ahmadi ME, et al. Regional neocortical thinning in mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2008; 49:794-803.

Nakano KK, Dawson DM, Spence A. Machado disease. A hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology* 1972; 22:49-55.

Nascimento E. Escala de Inteligência Wechsler para adultos: Adaptação e padronização de uma amostra brasileira: Casa do Psicólogo, São Paulo. 2004.

Oliveira S, D'Abreu A, França M, Lopes-Cendes I, Cendes F, Castellano G. MRI-Texture analysis of corpus callosum, thalamus, putamem, and caudate in Machado-Joseph disease. *J Neuroimaging* 2010; 22:46-52.

Park H-J, Lee JD, Kim EY, Park B, Oh M-K, Lee S, Kim J-J. Morphological alterations in the congenital blind based on the analysis of cortical thickness and surface area. *Neuroimage* 2009; 47:98–106.

Paulson HL, Das SS, Crino PB, et al. Machado-Joseph disease gene product is a cytoplasmic protein widely expressed in brain. *Ann Neurol.* 1997; 41:453-62.

Pengas G, Pereira JM, Williams GB, et al. Comparative reliability of total intracranial volume estimation methods and the influence of atrophy in a longitudinal semantic dementia cohort. *J. Neuroimaging* 2009; 19:37-46.

Pereira, J.B., Ibarretxe-Bilbao, N., Marti, M.J., Compta, Y., Junqué, C., Bargallo, N., Tolosa, E. Assessment of cortical degeneration in patients with Parkinson's disease by voxel-based morphometry, cortical folding, and cortical thickness. *Hum Brain Mapp* 2012; 33:2521- 34.

Porro CA, Francescato MP, Cettolo V, et al. Primary motor and sensory cortex activation during motor performance and motor imagery: a functional magnetic resonance imaging study. *J Neurosci.* 1996; 16:7688-7698.

Romanul FC, Fowler HL, Radvany J, et al. Azorean disease of the nervous system. *N. Engl. J. Med.* 1977; 296:1505-1508.

Rüb U, Brunt ER, Deller T. New insights into the pathoanatomy of spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease). *Curr Opin Neurol* 2008; 21:111-116.

Rub U, Gierga K, Brunt ER, et al. Spinocerebellar ataxias types 2 and 3: degeneration of the pre-cerebellar nuclei isolates the three phylogenetically defined regions of the cerebellum. *J Neural Transm.* 2005; 112:1523-1545.

Sakai T, Kawakami H: Machado-Joseph disease: A proposal of spastic paraplegic subtype. *Neurology* 1996; 46:846-847.

Schmahmann JD, Sherman JC. The cerebellar cognitive affective syndrome. *Brain.* 1998; 121:561-579.

Schmitz-Hübsch et al. Scale for the assessment and rating of ataxia. *Neurology* 2006; 66:1717–1720.

Schmitz-Hubsch T, Coudert M, Bauer P, et al. Spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6: disease severity and nonataxia symptoms. *Neurology.* 2008; 71:982-989.

Schmitz-Hubsch T, du Montcel ST, Baliko L, et al. Scale for the assessment and rating of ataxia: development of a new clinical scale. *Neurology.* 2006; 66:1717-20.

Schultz CC, Koch K, Wagner G, Roebel M, Nenadic I, Schachtzabel C, Reichenbach JR, Sauer H, Schlösser RG. Complex pattern of cortical thinning in schizophrenia: results from an automated surface based analysis of cortical thickness. *Psychiatry Res.* 2010;30;134-40.

Schulz JB, Borkert J, Wolf S, et al. Visualization, quantification and correlation of brain atrophy with clinical symptoms in spinocerebellar ataxia types 1, 3 and 6. *Neuroimage.* 2010; 49:158-68.

Seidel K, Siswanto S, Brunt ER, et al. Brain pathology of spinocerebellar ataxias. *Acta Neuropathol.* 2012; 124:1-21.

Suite ND, Sequeiros J, McKhann GM: Machado-Joseph disease in a Sicilian-American family. *J Neurogenet* 1986; 3:177-182.

Talairach J, Tournoux P. *Co-planar Stereotaxic Atlas of the Human Brain*, Thieme, NY. 1988.

Tokumaru AM, Kamakura K, Maki T, et al. Magnetic resonance imaging findings of Machado-Joseph disease: histopathologic correlation. *J Comput Assist Tomogr.* 2003; 27:241-8.

Viau M, Marchand I, Bard C, Boulanger Y. 1H magnetic resonance spectroscopy of autosomal ataxias. *Brain Res.* 2005; 1049:191-202.

Voets NL, Hough MG, Douaud G, Matthews PM, James A, Winmill L, Webster P, Smith S. Evidence for abnormalities of cortical development in adolescent-onset schizophrenia. *Neuroimage* 2008; 43:665–675.

Wechsler D. *Wechsler memory scale—revised*: The Psychological Corporation, San Antonio. 1987.

Winkler, A. M., Kochunov P., Blangero J., Almasy, A., Zilles, K., Fox, P. T., Duggirala, R., Glahn, D. C., 2012. Cortical Thickness or gray matter volume? The importance of selecting the phenotype for imaging genetics studies. *Neuroimage.* 2010 15:1135-46.

Wolf U, Rapoport MJ, Schweizer TA. Evaluating the affective component of the cerebellar cognitive affective syndrome. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci* 2009; 21:245–53.

Woo, S. T. Validation of hippocampal volumes measured using a manual method and two automated methods (FreeSurfer and IBASPM) in chronic major depressive disorder, *Neuroradiology* 2008; 50:569-581.

Woods BT, Schaumburg HH. Nigro-spino-dental degeneration with nuclear ophthalmoplegia: a unique and partially treatable clinic-pathological entity. *J. Neurol. Sci.* 1972; 17:149-166.

# **Anexo**

## Anexo – Scripts

Durante o período do mestrado, tive a tarefa de implementar o *software* FreeSurfer no laboratório e fui, de fato, o primeiro a usá-lo de maneira sistemática. Conforme houve a necessidade de rodar as imagens com maior frequência e de forma otimizada, acabei desenvolvendo *scripts* que automatizaram todos os processos usados por mim. No entanto, foram feitos outros *scripts* para trabalhos que acabei atuando como colaborador usando ou o FreeSufer ou o TBSS do FSL. Atualmente todos estes códigos vem sendo largamente usados por mim e por outros usuários do Laboratório de Neuroimagem para diversas análises.

### Script 1 – Roda Protocolo Estudo Transversal no FreeSurfer

```
##### UNIVERSITY OF CAMPINAS

##### March 2013

##### Autors: THIAGO JUNQUEIRA R. DE REZENDE (thiago.jrezende@gmail.com)
##### RODOLFO RODRIGUES DE ARAUJO (rodolfoRodrigues_at_gmail.com)

##### This script runs, in parallel, VBM6mim images to carry out for transversal study
in FREESURFER

##### It is need install the python lib in your PC #####

import os

import Queue

from threading import Thread

PROCESSADORES = 4

PASTA = '/home/nf04/nii/'

PASTA_SUBJECTS = '/home/nf04/subjects/'

q = Queue.Queue()
```

```

def ejecuta():
    while True:
        img = q.get()
        img_comp = PASTA + img
        rec_img1 = PASTA_SUBJECTS + img
        os.system('recon-all -i ' + img_comp + ' -s ' + rec_img1 )
        os.system('recon-all -motioncor -s ' + rec_img1)
        os.system('recon-all -all -s ' + rec_img1)
        os.system('recon-all -s ' + rec_img1 + ' -qcache')
        q.task_done()

def ejecuta_todos(pasta):
    imgs = os.listdir(pasta)

    for i in imgs:
        q.put(i)

    for i in range(PROCESSADORES):
        t = Thread(target=ejecuta)
        t.daemon = True
        t.start()

    q.join()

if __name__ == '__main__':
    ejecuta_todos(PASTA)

```

## Script 2 – Roda Estudo Longitudinal no FreeSurfer

```
##### UNIVERSITY OF CAMPINAS

##### July 2013

##### Autores: THIAGO JUNQUEIRA R. DE REZENDE (thiago.jrezende@gmail.com)
##### RODOLFO RODRIGUES DE ARAUJO (rodolfo@rodriques@gmail.com)

##### This script runs, in parallel, VBM images to carry out for longitudinal study in
FREESURFER

##### It is need install the python lib in your PC
```

```
import os

import glob

import Queue

from threading import Thread

PROCESSADORES = 4

PASTA = '/home/nf04/subjects/'

PASTA_SUBJECTS = '/home/nf04/subjects/'

NOME_PASTA = ''

q1 = Queue.Queue()

q2 = Queue.Queue()

q3 = Queue.Queue()

def gera_templateId(pasta):

    dir = pasta.rsplit('/', 1)[0]

    nome = pasta.rsplit('/', 1)[1]

    return dir + '/t_' + nome.split('_')[0]
```

```

def executa_fase1():
    while True:
        img = q1.get()
        img_comp = PASTA + img
        templateID = NOME_PASTA
        rec_img1 = PASTA_SUBJECTS + img
        os.system('recon-all -subjid ' + img_comp + ' -all ')
        q1.task_done()

def executa_fase2():
    while True:
        img = q2.get()
        tp_linha = ''
        #templateId = 't_' + img.split(' ')[0].split('_')[0]
        templateId = gera_templateId(img.split(' ')[0])
        for i in img.split(' '):
            tp_linha += ' -tp ' + i
        img_comp = PASTA + img
        rec_img1 = PASTA_SUBJECTS + img
        print 'recon-all -base ' + templateId + ' ' + tp_linha + ' -all'
        os.system('recon-all -base ' + templateId + ' ' + tp_linha + ' -all')

        q2.task_done()

def executa_fase3():

```

```

while True:
    img = q3.get()
    img_comp = PASTA + img
    rec_img1 = PASTA_SUBJECTS + img
#    templateId = 't_' + img.split('_')[0]
    templateId = gera_templateId(img.split(' ')[0])
    print 'recon-all -long ' + img + ' ' + templateId + ' -all'
    os.system('recon-all -long ' + img + ' ' + templateId + ' -all')
    q3.task_done()

def executa_todos_fase1(pasta):
    imgs = glob.glob(pasta + '/pac*')
    imgs.sort()

    for i in imgs:
        q1.put(i)

    for i in range(PROCESSADORES):
        t = Thread(target=executa_fase1)
        t.daemon = True
        t.start()

q1.join()

```

```

def ejecuta_todos_fase2(pasta):
    imgs = glob.glob(pasta + '/pac*')
    imgs.sort()
    lista_pacientes = []
    ultimo_paciente = ''
    datos_paciente = ''
    for i in imgs:
        paciente = i.split('_')[0]
        if ultimo_paciente == paciente:
            datos_paciente = datos_paciente + ' ' + i
        else:
            if datos_paciente != '':
                lista_pacientes.append(datos_paciente)
            datos_paciente = i
            ultimo_paciente = paciente

    if datos_paciente != '':
        lista_pacientes.append(datos_paciente)

    for paciente in lista_pacientes:
        q2.put(paciente)

    for i in range(PROCESSADORES):
        t = Thread(target=ejecuta_fase2)
        t.daemon = True
        t.start()

```

```
q2.join()

def ejecuta_todos_fase3(pasta):
    imgs = glob.glob(pasta + '/pac*')
    imgs.sort()

    for i in imgs:
        q3.put(i)

    for i in range(PROCESSADORES):
        t = Thread(target=ejecuta_fase3)
        t.daemon = True
        t.start()

    q3.join()

if __name__ == '__main__':
    ejecuta_todos_fase1(PASTA)
    ejecuta_todos_fase2(PASTA)
    ejecuta_todos_fase3(PASTA)
```

### Script 3 – Extraí Dados de ROIs Desenhados no FreeSufer

```
##### UNIVERSITY OF CAMPINAS

##### JULY 2013

##### Autores: THIAGO JUNQUEIRA R. DE REZENDE (thiago.jrezende@gmail.com)
##### RODOLFO RODRIGUES DE ARAUJO (rodolfo@rodriques@gmail.com)

##### This script extract datas of ROIs performed into QDEC

##### It is need install the python lib in your PC
```

```
import os
```

```
import Queue
```

```
from threading import Thread
```

```
PROCESSADORES = 4
```

```
PASTA = '/home/nf04/'
```

```
PASTA_SUBJECTS = '/home/nf04/subjects/'
```

```
q = Queue.Queue()
```

```
def executa():
```

```
    while True:
```

```
        img = q.get()
```

```
        rec_img1 = img
```

```
        os.system('mris_anatomical_stats -l lh.SARostralcingulate.label -t
lh.thickness -b -f ' + rec_img1 + '/stats/lh.SARostralcingulate_MJD.stats ' + rec_img1
+ ' lh ')
```

```
        q.task_done()
```

```
def executa_todos(pasta):
```

```
imgs = os.listdir(pasta)

for i in imgs:
    q.put(i)

for i in range(PROCESSADORES):
    t = Thread(target=executa)
    t.daemon = True
    t.start()
q.join()

if __name__ == '__main__':
    executa_todos(PASTA_SUBJECTS)
```

## Script 4 – Roda o Protocolo FDT do FSL (TBSS)

```
##### UNIVERSITY OF CAMPINAS #####
##### DECEMBER 2013 #####
##### Autores: THIAGO JUNQUEIRA R. DE REZENDE (thiago.jrezende_at_
gmail.com)#####
##### RODOLFO RODRIGUES DE ARAUJO (rodolfoRodrigues_at_
gmail.com)#####
##### This script performed FDT fsl's process #####
##### It is need install the python lib in your PC #####
```

```
import os
import glob
import Queue
from threading import Thread

PROCESSADORES = 4
PASTA = '/home/thiagoj/DTI_nii/'
PASTA_DTI = '/home/thiagoj/DTI/'
#BVEC = '/home/thiagoj/bvec/'
#BVAL = '/home/thiagoj/bval/'
NOME_PASTA = ''
name = ''
q1 = Queue.Queue()
q2 = Queue.Queue()
q3_1 = Queue.Queue()
q3_2 = Queue.Queue()
q4 = Queue.Queue()

def gera_output(pasta):
    dir = pasta.rsplit('/', 1)[0]
    nome = pasta.rsplit('/', 1)[1]
    return nome.split('.')[0]

def executa_fase1():
    while True:
        img = q1.get()
        img_comp = img
        output = NOME_PASTA
        output = gera_output(img_comp.split(' ')[0])
        print 'eddy_correct ' + img_comp + ' ' + output + ' 0'
        #print img_comp, q1.qsize()
        #os.system('eddy_correct ' + img_comp + ' ' + output +
' 0')
        q1.task_done()

def executa_fase2():
    while True:
        img = q2.get()
        img_comp = PASTA_DTI + img
```

```

        output = NOME_PASTA
        output = gera_output(img_comp.split(' ')[0]) + '_nodif'
        print 'fslroi ' + img + ' ' + output + ' 0 1'
        #print img, q2.qsize()
        os.system('fslroi ' + img + ' ' + output + ' 0 1')
        q2.task_done()

def executa_fase3():

    print q4.qsize()

    while True:
        img = q4.get()
        img_comp = PASTA_DTI + img
        output = NOME_PASTA
        output = gera_output(img_comp.split(' ')[0]) + '_brain'
        print 'bet ' + img + ' ' + output + ' -m -f 0.3'
        #print img, q4.qsize()
        os.system('bet ' + img + ' ' + output + ' -m -f 0.3')
        q4.task_done()

def executa_fase4():

    #print q3_1.qsize()
    #print q3_2.qsize()
    #print q4.qsize()
    #print q5.qsize()

    while True:
        img3_1 = q3_1.get()
        img3_2 = q3_2.get()
        img_nii = PASTA_DTI + img3_1
        output = NOME_PASTA
        output = gera_output(img_nii.split(' ')[0]) + '_dti'
        bvec = gera_output(img_nii.split(' ')[0]) + '.bvec'
        bval = gera_output(img_nii.split(' ')[0]) + '.bval'
        if gera_output(img3_2.split(' ')[0]) ==
gera_output(img3_2.split(' ')[0]):
            print 'dtifit -k ' + img3_1 + ' -o ' +
output + ' -m ' + img3_2 + ' -r ' + bvec + ' -b ' + bval
            os.system('dtifit -k ' + img3_1 + ' -o ' +
output + ' -m ' + img3_2 + ' -r ' + bvec + ' -b ' + bval)
            q3_1.task_done()
            q3_2.task_done()

def executa_todos_fase1(pasta):
    imgs = glob.glob(pasta + '/*.nii')
    imgs.sort()

    for i in imgs:
        q1.put(i)

```

```

for i in range(PROCESSADORES):
    t = Thread(target=executa_fase1)
    t.daemon = True
    t.start()

q1.join()

def executa_todos_fase2(pasta):
    imgs = glob.glob(pasta + '/ctl_frid*.nii.gz')
    imgs.sort()
    #print imgs

    for i in imgs:
        #print len(i)
        if len(i) < 38:

            q2.put(i)

    for i in range(PROCESSADORES):
        t = Thread(target=executa_fase2)
        t.daemon = True
        t.start()

    q2.join()

def executa_todos_fase3(pasta):
    imgs = glob.glob(pasta + '/ctl_frid*_nodif.nii.gz')
    imgs.sort()
    #print imgs

    for i in imgs:
        #print len(i)
        #if len(i) == 48:

            q4.put(i)

    for i in range(PROCESSADORES):
        t = Thread(target=executa_fase3)
        t.daemon = True
        t.start()

    q4.join()

def executa_todos_fase4(pasta1):
    imgs3_1 = glob.glob(pasta1 + '/ctl_frid*.nii.gz')
    imgs3_1.sort()
    imgs3_2 = glob.glob(pasta1 +
'/ctl_frid*_nodif_brain_mask.nii.gz')
    imgs3_2.sort()

```

```

#imgs4 = os.listdir(pasta2)
#imgs5 = os.listdir(pasta3)

for i in imgs3_1:
    print len(i)
    if len(i) < 38:

        q3_1.put(i)

for j in imgs3_2:
    q3_2.put(j)

#for k in imgs4:
    #q4.put(k)

#for l in imgs5:
    #q5.put(l)

for m in range(PROCESSADORES):
    t = Thread(target=executa_fase4)
    t.daemon = True
    t.start()

q3_1.join()
q3_2.join()
#q4.join()
#q5.join()

if __name__ == '__main__':
    executa_todos_fase1(PASTA)
    executa_todos_fase2(PASTA_DTI)
    executa_todos_fase3(PASTA_DTI)
    executa_todos_fase4(PASTA_DTI)

```

## Script 5 – Roda o Protocolo TBSS do FSL

##### UNIVERSITY OF CAMPINAS

##### DECEMBER 2013

##### Autores: THIAGO JUNQUEIRA R. DE REZENDE (thiago.jrezende@gmail.com)

##### RODOLFO RODRIGUES DE ARAUJO (rodolfo@rodriques@gmail.com)

##### This script performed TBSS fsl's process

##### It is need install the python lib in your PC

```
import os
```

```
import Queue
```

```
from threading import Thread
```

```
PROCESSADORES = 1
```

```
PASTA = '/home/nf04/mytbss/'
```

```
PASTA_TESTE = '/home/nf04/teste/'
```

```
q = Queue.Queue()
```

```
def executa():
```

```
    os.system('tbss_1_preproc *.nii.gz')
```

```
    os.system('tbss_2_reg -T')
```

```
    os.system('tbss_3_postreg -S')
```

```
    os.system('tbss_4_prestats 0.2')
```

```
    q.task_done()
```

```
def executa_todos(pasta):
```

```
    imgs = os.listdir(pasta)
```

```
for i in imgs:
    q.put(i)

for i in range(PROCESSADORES):
    t = Thread(target=executa)
    t.daemon = True
    t.start()

q.join()

if __name__ == '__main__':
    executa_todos(PASTA)
```