



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

THIAGO JUNQUEIRA RIBEIRO DE REZENDE

NEUROIMAGEM NA ATAXIA DE FRIEDREICH: NOVAS ABORDAGENS E
APLICAÇÕES CLÍNICAS

NEUROIMAGING IN FRIEDREICH'S ATAXIA: NEW APPROACHES AND
CLINICAL APPLICATION

CAMPINAS

2017

THIAGO JUNQUEIRA RIBEIRO DE REZENDE

NEUROIMAGEM NA ATAXIA DE FRIEDREICH: NOVAS ABORDAGENS E
APLICAÇÕES CLÍNICAS

NEUROIMAGING IN FRIEDREICH'S ATAXIA: NEW APPROACHES AND
CLINICAL APPLICATION

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

*Thesis presented to the School of Medical Sciences of the
University of Campinas in partial fulfillment of the requirements
for the degree of Doctor of Science.*

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCONDES CAVALCANTE FRANÇA JUNIOR

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.

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2014/19786-7; FAPESP, 2015/09793-9

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

R339n Rezende, Thiago Junqueira Ribeiro de, 1988-
Neuroimagem na ataxia de Friedreich : novas abordagens e aplicações clínicas / Thiago Junqueira Ribeiro de Rezende. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientadores: Marcondes Cavalcante França Junior e Andreia Vasconcellos Faria.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

Em regime interinstitucional com: Johns Hopkins University.

1. Ataxia de Friedreich. 2. Imagem por ressonância magnética. 3. Ferro. I. França Junior, Marcondes Cavalcante. II. Faria, Andreia Vasconcellos. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. V. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Neuroimaging in Friedreich's ataxia : new approaches and clinical application

Palavras-chave em inglês:

Friedreich Ataxia

Magnetic resonance imaging

Iron

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Marcondes Cavalcante França Junior [Orientador]

Wilson Marques Junior

Rickson Coelho Mesquita

Letícia Rittner

Luis Eduardo Gomes Garcia Betting

Data de defesa: 27-11-2017

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

THIAGO JUNQUEIRA RIBEIRO DE REZENDE

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCONDES CAVALCANTE FRANÇA JUNIOR

MEMBROS:

1. PROF. DR. MARCONDES CAVALCANTE FRANÇA JUNIOR

2. PROF. DR. WILSON MARQUES JUNIOR

3. PROF. DR. RICKSON COELHO MESQUITA

4. PROFA. DRA. LETÍCIA RITTNER

5. PROF. DR. LUIZ EDUARDO GOMES GARCIA BETTING

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

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

Data: 27/11/2017

Dedicatória

À Deus por me guiar,
À minha futura esposa, Karin,
por sempre me apoiar e ser
meu maior incentivo,
À minha família, por me
apoiarem e acreditarem em mim
Aos meus pacientes.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a Deus por sempre me iluminar, guiar e me dar sabedoria.

A minha futura esposa, Karin, a quem eu devo tudo, por acreditar em mim, por me incentivar, pelo carinho, companheirismo e a dedicação que tem em cuidar de mim. Obrigado por ser minha grande inspiração.

A minha mãe e avós, por serem meus exemplos de vida, caráter e dedicação. Obrigado por tudo.

Ao meu orientador, prof. Dr. Marcondes, por ter acreditado em mim e ter me dado tantas oportunidades. Por ser meu exemplo profissional e pessoal, me fazendo ter orgulho de participar de seu grupo.

Ao meu grande amigo e exemplo de pessoa, Alberto, a quem me faltam palavras para expressar minha gratidão, eu deixo meu singelo obrigado! Pois, se um dia, eu tive êxito, foi graças a sua ajuda. Torço para que nossa parceria perdure durante muito tempo.

Ao meu grande amigo Felipe Paiva, pessoa por quem tenho extrema admiração, agradeço pela paciência e eficiência em todas as ajudas que me deu.

A minha amiga Camila, pela paciência em que me escutava e por todas as risadas que fizeram deste período mais alegres.

Ao pessoal da Comvest que me proporcionaram tantas oportunidades e experiências legais.

Aos colegas do Laboratório de Neuroimagem e Laboratório de Física Médica que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro cedido diretamente e por toda infraestrutura que patrocinou sob os processos números 2014/19786-7 e 2015/09793-9.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro cedido via bolsa de estudos.

Aos pacientes e seus familiares.

Resumo

A ataxia de Friedreich (FRDA) é a ataxia autossômica recessiva mais comum no mundo. Clinicamente, é caracterizada por início precoce, alterações sensoriais e ataxia de lenta progressão. Os estudos de imagem têm focado somente em estruturas infratentoriais, desconsiderando o envolvimento de estruturas supratentoriais, diferenças fenóticas e duração da doença, bem como a evolução do dano neurológico. Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar, por meio de imagens de ressonância magnética multimodal, pacientes com ataxia de Friedreich a fim de compreender a evolução do dano encefálico, identificar o padrão de dano encefálico entre os fenótipos da doença, os sítios de depósitos de ferro extra-cerebelares e as primeiras estruturas acometidas na doença.

A fim de atingir todos os objetivos, foram recrutados 25 pacientes adultos com a forma clássica da doença, 13 pacientes com início tardio e 12 pacientes pediátricos. Para quantificar a gravidade da doença foi utilizada a escala FARS. O dano estrutural de substância cinza e branca foi avaliado via imagens de ressonância magnética ponderadas em T1, T2 e DTI. Para análise de tais imagens foram utilizadas as ferramentas FreeSurfer, T1 MultiAtlas, DTI Multiatlas, SPM, SpineSeg e TBSS.

As comparações de grupos revelaram comprometimento microestrutural multifocal na substância branca encefálica na FRDA, com dano extenso nos pedúnculos cerebelares, corpo caloso e tratos piramidais. Encontramos também alterações na substância cinzenta no núcleo denteado do cerebelo, tronco e córtex motor. Nós não identificamos mudanças volumétricas longitudinais, porém análises prospectivas da substância branca identificaram anormalidades microestruturais progressivas no corpo caloso, tratos piramidais e pedúnculos cerebelares superiores após um ano de seguimento. A respeito do estudo comparando o tipo clássico e o tipo tardio (cFRDA vs. LOFA), nós mostramos que ambos os fenótipos possuem um padrão de anormalidades similares, mas não idênticas. Embora sutis, as diferenças estruturais encontradas ajudam a explicar a variabilidade fenotípica entre estas duas apresentações da doença. Por exemplo, o maior dano microestrutural no trato córtico-espinhal no grupo

LOFA ajuda a explicar os sinais piramidais mais exuberantes neste grupo. Não fomos capazes de identificar depósitos de ferro cerebrais nos pacientes com FRDA. Neste sentido, tais depósitos ficariam restritos somente ao núcleo dentado do cerebelo. Por fim, fomos capazes de observar que a manifestação inicial da doença, vista em pacientes pediátricos, se concentra na medula espinhal e no pedúnculo cerebelar inferior.

Palavras Chaves: Ataxia de Friedreich, Imagem por Ressonância Magnética, Ferro

Abstract

Friedreich's ataxia (FRDA) is the most common autosomal-recessive ataxia worldwide; it is characterized by early onset, sensory abnormalities and slowly progressive ataxia. Besides that, most of neuroimaging studies have been focused only in infratentorial structures of adult patients. Furthermore, studies comparing different phenotypes of disease does not exist. Therefore, the objective of this study is to assess, using multimodal magnetic (MRI) resonance imaging, patients with Friedreich ataxia to better comprehend the progression of brain damage, to identify the pattern of damage across disease phenotypes, to identify areas with abnormal iron deposits in the brain and to characterize the structures initially damaged in early disease stages.

To accomplish that, we enrolled 25 adult patients with classical FRDA, 13 patients with late-onset FRDA and 12 pediatric patients. The FARS scale was employed to quantify the disease severity. To assess the structural damage in gray and white matter, we acquired T1-weighted, T2-weighted and DTI images of the brain. To evaluate these images, we used the following tools: FreeSurfer, T1 MultiAtlas, SPM, DTI MultiAtlas, SpineSeg and TBSS.

After group comparisons, there was widespread microstructural damage in the cerebral white matter, including cerebellar peduncles, corpus callosum and pyramidal tracts of patients with FRDA. We also found gray matter volumetric reduction in the dentate nuclei of the cerebellum, brainstem and motor cortex. We did not find volumetric reduction over time, but there was progressive white matter microstructural damage in the corpus callosum, pyramidal tracts and superior cerebellar peduncles after 1 year of follow-up. Regarding the disease phenotypes, we found that both classical FRDA and LOFA have similar, but not identical neuroimaging signatures. Although subtle, the structural differences might help to explain the phenotypic differences seen in both conditions. The corticospinal tracts are damaged in both conditions, but more severely in the late-onset FRDA group, which may explain why pyramidal signs are more evident in the latter subgroup. We failed to identify iron deposits in brain regions other than the dentate nuclei of patients with FRDA. Finally, we found that the spinal cord

and inferior cerebellar peduncles are the structures compromised in pediatric patients with FRDA.

Key Words: Friedreich Ataxia, Magnetic Resonance Imaging, Iron

Lista de Ilustrações

Figura 1: Representação de um próton girando em torno de seu eixo, dando origem a seu momento magnético (μ).....	26
Figura 2: Comportamento dos spins nucleares de uma amostra na presença de um campo magnético intenso.....	27
Figura 3: Efeito da aplicação de um pulso de radiofrequência centrado na frequência ω_0 : a magnetização resultante da amostra (M_0) sofre uma alteração na sua direção após a absorção resultante do pulso pelos átomos da amostra.	28
Figura 4: imagem de difusão com codificação direcional de cor.	30
Figura 5: Esquemáticos das metodologias e análises feitas neste estudo.....	39
Figura 6: Estudo 1 - Figure 1: Cross-sectional results of voxel-wise analysis showing areas of gray matter (a) and white matter (b) volumetric reduction in patients with Friedreich's ataxia after comparison with age-and-sex matched controls. Results are shown on the MNI152 1-mm template. MNI z-axis coordinates are shown in mm above each image. The color coded bar represents the p-value. (c) Results of voxel-wise analysis showing areas of gray matter (left column) and white matter (right column) that presented significant negative correlation with FARS score (first lane) and FARS III subscore (second lane). Results are shown overlaid in the MNI152 1-mm template. MNI z-axis coordinates are shown in mm above each image. Statistical thresholds: $p < 0.05$ (FDR corrected) and cluster size greater than 30 voxels.	64
Figura 7: Estudo 1 - Figure 2: Results of tract based spatial statistics showing areas of reduced fractional anisotropy (FA) and axial diffusivity (AD), increased mean diffusivity (MD) and radial diffusivity (RD) in patients with Friedreich's ataxia after comparison with age-and-sex matched controls in transversal study (a) and longitudinal study (c). FA maps for correlation analysis with FARS and duration of the disease are shown in b. Results are shown on the MNI152 template. Statistical thresholds: $p < 0.05$ (TFCE corrected).	65
Figura 8: Estudo 1 - Figure S1: Longitudinal voxel-based morphometry – Results of voxel-wise analysis showing areas of gray matter volumetric reduction after one year (A and C), gray matter volumetric reduction after two years (B and D) and white matter volumetric reduction after two years (E) in patients with	

Friedreich's ataxia after comparison with age-and-sex matched controls. Results are shown on the MNI152 1-mm template. Statistical thresholds: $p < 0.001$ (uncorrected) and cluster size greater than 30 voxels.....	70
Figura 9: Estudo 1 - Figure S2: Cross-sectional FreeSurfer results for ROI-based analysis. The figure is basically illustrative, because the FreeSurfer ROI-based analysis and the output results are exclusively numeric values.....	71
Figura 10: Estudo 2 - Figure 1: Study design.	95
Figura 11: Estudo 2 - Figure 2: Results of ROI-based analyses using T1 multi-atlas approach to assess deep GM. The cFRDA and LOFA patients were compared to healthy controls. All results were corrected for multiple comparisons, using Dunn-Sidak test, and the measures were linearly regressed to age, gender and total intracranial volume.....	96
Figura 12: Estudo 2 - Figure 3: Results of DTI multi-atlas approach showing areas of reduced fractional anisotropy (FA), mean diffusivity (MD) and radial diffusivity (RD) in patients with cFRDA and LOFA after comparison with controls. Effects of age and gender were removed and all results were corrected for multiple comparisons using Dunn-Sidak test.	97
Figura 13: Estudo 2 -Figure 4: Structural differences between cFRDA and LOFA patients. The yellow-red scale shows structures more severely altered in the cFRDA group. All results were corrected for multiple comparisons using the Dunn-sidak test. The effects of age and gender were regressed in the model.	98
Figura 14: Estudo 2 - Figure 5: Structural differences between cFRDA and LOFA patients. The yellow-red scale shows structures more severely altered in the LOFA group. All results were corrected for multiple comparisons using the Dunn-sidak test. The effects of age and gender were regressed in the model.	99
Figura 15: Estudo 2 - Figure 6: PCA plot with features selected by the group comparisons, colored by diagnosis.	100
Figura 16: Estudo 3 - Figura 1: Curvas de decaimento do sinal de ressonância relacionadas à relaxação transversal com constantes de tempo T2 e T2* (Cohen-Adad et al, 2014)	109
Figura 17: Estudo 3 - Figura 2: Etapas realizadas no pré-processamento das imagens, segmentação e skull-stripping.	111
Figura 18: Estudo 3 - Figura 3: Algoritmo de normalização espacial dos mapas de T2/T2*	113

Figura 19: Estudo 3 - Figura 4: Algoritmo de extração dos tempos T2/T2* médios para as estruturas anatômicas.	115
Figura 20: Estudo 3 - Figura 5: Imagens obtidas com a sequência spin-eco e gradiente-eco. Notar que muitos artefatos na imagem obtida pela sequência spin-eco, principalmente nos 3 primeiros ecos. Fato este que não ocorre na sequência gradiente-eco.	118
Figura 21: Estudo 3 - Figura 6: Gráfico de cálculo do tempo de relaxação para a coordenada x, y e z (99,93,202) usando um a) ajuste linear e b) não linear. .	120
Figura 22: Estudo 3 - Figura 7: Imagem dos tempos de relaxação T2* para ajuste linear e não linear.	121
Figura 23: Estudo 4 - Figure 1: Example of T2-weighted and SWI-weighted images.	220
Figura 24: Estudo 4 - Figure 2: Example of a fitting to calculate the T2 time using the relaxometry technique. (a) Linear fitting; (b) Non-linear fitting.	221
Figura 25: Estudo 4 - Figure 3: Coronal T2 weighted MRI slices showing selected regions of interest amenable to calculation of RT2 values: (a) Dentate nuclei (red and yellow circles), (b) substantia nigra (dark blue and Orange circles), putamina (light blue and light pink circles) e caudate nuclei (light green and pink circles).	222
Figura 26: Estudo 5 - Figure 1: Results of ROI-based analyses using T1 multi-atlas approach to assess deep GM. The yFRDA and aFRDA patients were compared to their respective healthy controls. All results were corrected for multiple comparisons, using Bonferroni test.	161
Figura 27: Estudo 5 - Figure 2: Results of DTI multi-atlas approach showing areas of reduced fractional anisotropy (FA) and increased axial diffusivity (AD), mean diffusivity (MD) and radial diffusivity (RD) in patients with aFRDA after comparison with controls. Effects of age and gender were removed and all results were corrected for multiple comparison using Bonferroni test.	162
Figura 28: Estudo 5 - Figure 3: Results of DTI multi-atlas approach showing areas of increased radial diffusivity (RD) in patients with yFRDA after comparison with controls. Effects of age and gender were removed and all results were corrected for multiple comparison using Bonferroni test.	163
Figura 29: Estudo 5 - Figure 4: Visual spinal cord area for yFRDA and aFRDA patients with their matched healthy controls.	164

Figura 30: Estudo 5 - Figure 5: Linear regression of cervical spinal cord area and age for yFRDA patients and matched healthy controls. 165

Lista de Tabelas

Tabela 1: Estudo 1 - Table 1: Study design (a) and demographics data (b). ...	62
Tabela 2: Estudo 1 - Table 2: Results of FreeSurfer analyses showing subcortical structures with significant volumetric reduction and cortical regions with significant thickness reduction in patients with Friedreich's ataxia compared to healthy controls. ($p < 0.05$ with Dunn-Sidak correction).	63
Tabela 3: Estudo 1 - Table S1: Areas with volumetric reduction in patients with Friedreich's ataxia compared to healthy controls revealed by VBM. The results were FDR-corrected for multiple comparisons ($p < 0.05$) and only clusters with size greater than 30 voxels are shown.	66
Tabela 4: Estudo 1 - Table S2: Gray and white matter regions that presented significant correlation with clinical parameters in patients with Friedreich's ataxia revealed by VBM. The results were FWE-corrected for multiple comparisons ($p < 0.05$) and only clusters with size greater than 30 voxels are shown.....	67
Tabela 5: Estudo 1 - Table S3: Gray matter regions that presented significant volumetric reduction in patients with Friedreich's ataxia after one year of follow-up. All results have p-values smaller than 0.001 (uncorrected) and cluster size larger than 30 voxels.	68
Tabela 6: Estudo 1 - Table S4: Gray and white matter regions that presented significant volumetric reduction in patients with Friedreich's ataxia after two years of follow-up. All results have p-values smaller than 0.001 (uncorrected) and cluster size larger than 30 voxels.	69
Tabela 7: Estudo 2 -Table 1: Clinical, demographic and genetic data of patients	94
Tabela 8: Estudo 2 - Table 2: Results of FreeSurfer analyses showing significant cortical thinning in patients with cFRDA and LOFA when compared to healthy controls. Results corrected for multiple comparison (Dunn-Sidak) and linearly regressed to age and gender.	94
Tabela 9: Estudo 3 - Tabela 1: Dados Demográficos.....	117
Tabela 10: Estudo 3 - Tabela S1: Análise de grupo para regiões do córtex cerebelar definidas pelo CERES, relaxometria-T2.....	123
Tabela 11: Estudo 3 - Tabela S2: Análise de grupo para regiões do córtex cerebral esquerdo definidas pelo FreeSurfer, relaxometria-T2.	124

Tabela 12: Estudo 3 - Tabela S3: Análise de grupo para regiões do córtex cerebral direito definidas pelo FreeSurfer, relaxometria-T2.	126
Tabela 13: Estudo 3 - Tabela S4: Análise de grupo para regiões de substância cinzenta profunda definidas pelo FreeSurfer, relaxometria-T2.....	128
Tabela 14: Estudo 3 - Tabela S5: Análise de grupo para pacientes com menor duração da doença, regiões do córtex cerebelar definidas pelo CERES, relaxometria-T2.	129
Tabela 15: Estudo 3 - Tabela S6: Análise de grupo para pacientes com menor duração da doença, regiões do córtex cerebral esquerdo definidas pelo FreeSurfer, relaxometria-T2.	130
Tabela 16: Estudo 3 - Tabela S7: Análise de grupo para pacientes com menor duração da doença, regiões do córtex cerebral direito definidas pelo FreeSurfer, relaxometria-T2.	132
Tabela 17: Estudo 3 - Tabela S8: Análise de grupo para pacientes com menor duração da doença, regiões de substância cinzenta profunda definidas pelo FreeSurfer, relaxometria-T2.	134
Tabela 18: Estudo 1 - Tabela S9: Análise de grupo para pacientes com maior duração da doença, regiões do córtex cerebelar definidas pelo CERES, relaxometria-T2.	135
Tabela 19: Estudo 1 - Tabela S10: Análise de grupo para pacientes com maior duração da doença, regiões do córtex cerebral esquerdo definidas pelo FreeSurfer, relaxometria-T2.	136
Tabela 20: Estudo 1 - Tabela S11: Análise de grupo para pacientes com maior duração da doença, regiões do córtex cerebral direito definidas pelo FreeSurfer, relaxometria-T2.	138
Tabela 21: Estudo 3 - Tabela S12: Análise de grupo para pacientes com maior duração da doença, regiões de substância cinzenta profunda definidas pelo FreeSurfer, relaxometria-T2.	140
Tabela 22: Estudo 4 - Table 1 – Disease-specific brain regions with higher BID revealed by relaxometry studies.	217
Tabela 23: Estudo 4 - Table 2 – Area of Neurology and its respectable diseases.	218
Tabela 24: Estudo 4 - Table 3 – Neurological diseases and the potential clinical application of SWI and RT2 techniques correlation with diagnosis, detection of	

presymptomatic subjects (DPSS), follow up of the diseases severity (FDS), determination of differential diagnosis (DDD), therapy follow up (TF) and prognosis with the SWI and RT2 techniques. * Areas of neurology with recent evidences, not well-established..... 219

Tabela 25: Estudo 5 - Table 1: Clinical, demographic and genetic data of patients 159

Tabela 26: Estudo 5 - Table 2: Results of SpineSeg analyses showing significant cervical spinal cord area and ECC when compared to healthy controls..... 160

Lista de Abreviaturas

AD: do inglês, *axial diffusivity* ou difusividade axial

cFRDA: do inglês *classical Friedreich's Ataxia* ou Ataxia de Friedreich clássica

DTI: do inglês *diffusion tensor imaging*, imagem por tensores de difusão

ECC: excentricidade

FA: do inglês, *fractional anisotropy* ou anisotropia fracional

FARS: do inglês *Friedreich's ataxia rating score*

FOV: do inglês, *Field of View* ou campo de visão

FRDA: do inglês *Friedreich's Ataxia* ou Ataxia de Friedreich

FWHM: do inglês *full width at half maximum*

GAA: guanina-adenosina-adenosina

LDDMM: do inglês *Large Deformation Diffeomorphic Metric Mapping*

LOFA: do inglês *late-onset Friedreich's Ataxia* ou Ataxia de Friedreich de início tardio

MALF: do inglês *Multi-Atlas Labeling Fusion*

MD: do inglês, *mean diffusivity* ou difusividade média

MRI: do inglês, *magnetic resonance imaging* ou imagem por ressonância magnética

NDC: núcleo denteado do cerebelo

QSM: do inglês *quantitative susceptibility mapping*

RD: do inglês, *radial diffusivity* ou difusividade radial

RF: radiofrequência

ROI: do inglês, *region of interest* ou região de interesse

SARA: do inglês, *scale for the assessment and rating of ataxia*

SB: substância branca

SC: substância cinzenta

SENSE: do inglês, *sensitivity encoding*

SPM: do inglês *statistical parametric mapping*

SWI: do inglês *susceptibility-weighted Image*

TBSS: do inglês *tract based spatial statistics*

TE: tempo ao eco

TR: tempo de repetição

Unicamp: Universidade Estadual de Campinas

UNIFESP: Universidade Federal de São Paulo

VBM: do inglês *Voxel-Based Morphometry* ou morfometria baseada em voxel

Sumário

Introdução.....	21
Revisão da Literatura.....	23
Ataxia de Friedreich	23
Neuroimagem.....	24
Imagem Estrutural	24
Imagem Ponderada por Difusão	29
Neuroimagem na Ataxia de Friedreich.....	32
Objetivos	36
Objetivo Geral	36
Objetivos específicos	36
Métodos	37
Seleção dos Voluntários/Imagens	37
Estudo de Imagem	38
Aquisição	38
Métodos de Segmentação	38
VBM	39
FreeSurfer.....	39
T1 MultiAtlas.....	40
CERES	41
DTI MultiAtlas	41
TBSS	42
SpineSeg	42
Análise Estatística	43
Resultados.....	44
Discussão	166
Assinatura do Dado Estrutural na FRDA.....	166
Contribuição para Caracterização Fenotípica e Fisiopatologia da Doença	167
Biomarcadores de Imagem.....	171
Perspectivas Futuras	173
Conclusão.....	174
Referências	175
ANEXO I.....	182
ANEXO II	193
ANEXO III	197
ANEXO IV.....	199

Introdução

A ataxia de Friedreich (FRDA) é a ataxia autossômica recessiva mais comum no mundo, com prevalência de 1 a 3 pessoas para cada 100.000 (1). Ela é caracterizada por início precoce, ataxia de lenta progressão e anormalidades sensitivas exuberantes. A doença é causada por expansões no triplete de GAA do primeiro íntron do gene *FXN* (1). Esta mutação reduz o nível de expressão da proteína frataxina, levando a disfunção mitocondrial e neurodegeneração (2). A doença tipicamente começa no final da infância e início da adolescência (forma clássica), mas há um subgrupo da doença que manifesta os primeiros sintomas clínicos após os 25 anos de idade. Este último grupo é conhecido como ataxia de Friedreich de início tardio (LOFA). Tais pacientes são caracterizados por lenta progressão da doença, sintomas não-neurológicos leves, pequenas expansões de GAA, espasticidade e reflexos presentes (3).

A neurodegeneração na FRDA se estende do sistema nervoso central até o periférico. Estudos prévios de ressonância magnética demonstraram comprometimento na substância branca e cinzenta de porções do cerebelo e tronco, bem como dano na substância branca profunda do tronco, cerebelo e pedúnculos cerebelares (4-8). Contudo, poucos estudos encontraram danos supratentoriais na FRDA (6), fato este que merece mais estudos uma vez que vêm sendo relatados distúrbios não motores (como disfunção cognitiva) que podem estar relacionados a lesões em áreas corticais (8-10). Além disso, há poucos estudos longitudinais na FRDA (11,12) e nenhum deles comparou os diferentes fenótipos ou avaliou especificamente pacientes no início da doença.

Desta forma, o objetivo deste trabalho é: 1) investigar a extensão do dano encefálico nos pacientes com FRDA e avaliar se esse dano progride com o tempo. 2) comparar o padrão de dano entre pacientes com a forma clássica da doença e com início tardio (cFRDA vs. LOFA). 3) identificar se há regiões cerebrais com depósitos anormais de ferro nos pacientes com FRDA. 4) identificar as estruturas que são acometidas no início 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 com

o fenótipo e a evolução das mesmas. Segundo, porque os achados podem contribuir para aprimorar a qualidade do acompanhamento clínico destes indivíduos ao disponibilizar potenciais biomarcadores de imagem.

A apresentação deste trabalho será dada 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 artigos. Uma discussão final será apresentada após a exposição dos artigos, seguida das conclusões do trabalho e referências bibliográficas.

Revisão da Literatura

Ataxia de Friedreich

A FRDA é a ataxia autossômica recessiva mais comum no mundo, com prevalência de 1 a 3 pessoas para cada 100.000 (1, 3, 13). A doença é de caráter genético, onde 96% dos pacientes apresentam uma expansão homozigótica de tripletos guanina-adenosina-adenosina (GAA) no primeiro íntron do gene *FXN* do cromossomo 9q13 (1). Porém, em 2% a 4% dos casos, os pacientes são heterozigotos e apresentam uma expansão GAA em um alelo e uma mutação de ponto ou deleção no outro (14).

A FRDA é caracterizada por início precoce, entre o final da infância e o começo da adolescência. O principal sintoma clínico é a ataxia de lenta progressão, marcada por piora progressiva da deambulação, instabilidade e alargamento de base e prejuízo da coordenação motora. Arreflexia, sinais piramidais, disartria, disfagia, tremores de extremidades, e anormalidade da sensibilidade profunda (propriocepção e sensibilidade vibratória) também são marcantes na doença. A presença de pés *cavus*, escoliose, cardiopatia hipertrófica e diabetes mellitus também são muito frequentes (2, 15). No entanto, existe um subgrupo desses pacientes que manifesta a doença após os 25 anos de idade, sendo conhecido por ataxia de Friedreich de início tardio (LOFA). Os pacientes LOFAs são caracterizados por lenta progressão da doença, sintomas não neurológicos leves, pequenas expansões de GAA, espasticidade e reflexos presentes (3).

A expansão no tripleto de GAA causa uma redução nos níveis da proteína frataxina (2), uma proteína da matriz mitocondrial. Embora todas as suas funções não estejam ainda totalmente esclarecidas, a Frataxina participa do metabolismo de ferro na cadeia respiratória mitocondrial e da biossíntese de clusters de sulfato ferroso (2). Esta proteína também parece interagir diretamente com enzimas de complexos da cadeia respiratória, agindo, principalmente, na manutenção do estresse oxidativo (16).

A deficiência de Frataxina atinge diversos tecidos, sobretudo coração, pâncreas e sistema nervoso, porém a vulnerabilidade de cada um deles ao baixo nível de Frataxina não é a mesma (14). Em especial no sistema nervoso, os

gânglios da raiz dorsal e seus prolongamentos são as estruturas mais acometidas. Os neurônios são encontrados com dimensões reduzidas e em menor quantidade, em concomitância ocorre a degeneração da coluna posterior da medula espinhal e dos tratos espinocerebelares (14, 17). Além disso, há uma redistribuição de alguns metais nos tecidos, tais como: ferro, zinco e cobre (18). Neste processo, os metais concentram-se de forma mais intracelular, levando a morte celular. Um dos principais sítios de concentração de metais no cérebro, na FRDA, é o núcleo denteado do cerebelo (NDC), levando a degeneração dos grandes neurônios deste núcleo. Embora a quantidade total de ferro não esteja aumentada no NDC, análises histopatológicas evidenciaram que o ferro está redistribuído no tecido, sendo relocado como ferritina nos astrócitos e micróglia (19).

No coração, observa-se cardiopatia hipertrófica, com aumento da espessura do miocárdio, especialmente do ventrículo esquerdo e de septo interventricular. Há variação anormal do tamanho das fibras cardíacas. Contudo, estudos voltados para quantificar ferro cardíaco demonstram que há poucas fibras com acúmulo de ferritina no interior da mitocôndria e os depósitos não são progressivos. No pâncreas, não se observa destruição tecidual e a fisiopatologia do diabetes mellitus na FRDA é em grande parte desconhecida (14).

A evolução da doença é lenta, mas progressiva. Embora não completamente, a gravidade da doença correlaciona-se com o tamanho da expansão de tripletos GAA, sobretudo no menor alelo (20, 21). A progressão dos sintomas motores e perda da independência nas atividades de vida diária também está relacionada à idade de início, idade do diagnóstico e a presença de acometimento sistêmico, especialmente a cardiomiopatia e escoliose (21). Tratamentos efetivos ainda não existem, de modo que a conduta atual se baseia em fisioterapia motora e/ou respiratória, tratamento da cardiopatia hipertrófica, distúrbios pulmonares, escoliose e diabetes mellitus.

Neuroimagem

Imagem Estrutural

A Imagem de ressonância magnética (MRI) é uma importante modalidade de imagem para avaliar, *in vivo*, o sistema nervoso central. Com esta técnica é

possível obter imagens anatômicas e funcionais tridimensionais, quantitativas e de forma não-invasiva sem exposição à radiação ionizante. Neste sentido, a MRI tem sido usada largamente para identificar estruturas cerebrais envolvidas em várias doenças neurológicas e, até mesmo, em estudos do desenvolvimento cerebral e no envelhecimento.

A grosso modo, as MRIs são baseadas em fenômenos magnéticos, os quais são gerados através da interação de intensos campos magnéticos com a matéria em conjunto com ondas de rádio. De forma mais específica, as MRIs representam mapas de densidade de prótons que interagiram com o campo magnético externo aplicado à amostra. Mas como se dá essa interação e qual o processo físico envolvido? Para responder essa pergunta, é preciso olhar o núcleo dos átomos e para facilitar o raciocínio, iremos olhar o átomo mais simples que existe na natureza, o hidrogênio, cujo núcleo é composto somente por um próton. Ao observar tal núcleo, percebe-se que, assim como os planetas, o próton está realizando um movimento de rotação em torno de seu eixo e, a este movimento, daremos o nome de *spin*. De modo geral, toma-se o *spin* como uma propriedade que indica que corpos estão girando em torno de algum eixo. Neste sentido, o vetor de *spin* indicaria o sentido do giro, por exemplo um vetor vertical para cima indicaria uma rotação anti-horária e um vertical para baixo, indicaria uma rotação no sentido horário. Todavia, em condições normais, a direção deste vetor é aleatória e, portanto, a soma dos *spins* dos **núcleos** (*spins* de prótons e nêutrons) fornece uma resultante nula. Porém, não são os *spins* que interagem com o campo magnético. Devemos lembrar que os núcleos dos átomos possuem carga, logo essa combinação de *spin* mais carga gera um pequeno campo magnético intrínseco, ao qual nomeamos de **momento magnético (μ)** (Figura 1).

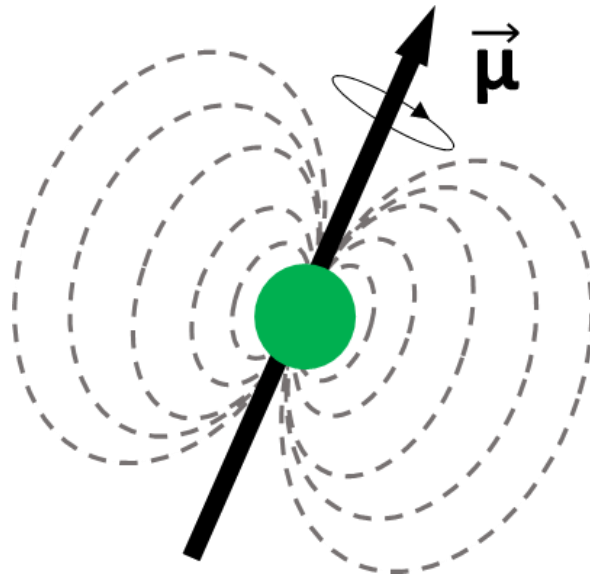


Figura 1: Representação de um próton girando em torno de seu eixo, dando origem a seu momento magnético (μ).

Ao submetermos uma amostra de moléculas de hidrogênio a um campo magnético (B_0), notamos que os spins se alinham com a direção deste campo e começam a precessionar em torno de B_0 com uma frequência específica conhecida como frequência de Larmor (ω_0), dada pela seguinte equação:

$$\omega_0 = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 \text{ (Eq. 1)}$$

onde γ é uma constante, a razão giromagnética, que depende de propriedades do tipo de núcleo em análise. Num campo de 3T, ω_0 do hidrogênio é aproximadamente 127,8 MHz, o que faz inclusive deste elemento o átomo alvo para as imagens de ressonância. Além disso, a interação do *spin* com B_0 gera, para o caso do hidrogênio, dois estados possíveis de precessão: um paralelo a B_0 (menor energia) e outro antiparalelo a B_0 (maior energia) (Figura 2). Tal fenômeno é consequência do efeito Zeeman que consiste no acoplamento das grandezas ω_0 e B_0 da equação 1 e leva a quebra da degenerescência de um determinado estado de energia. Devido a essa diferença de energia, que cresce com a magnitude de B_0 , há mais prótons no estado paralelo do que no estado antiparalelo.

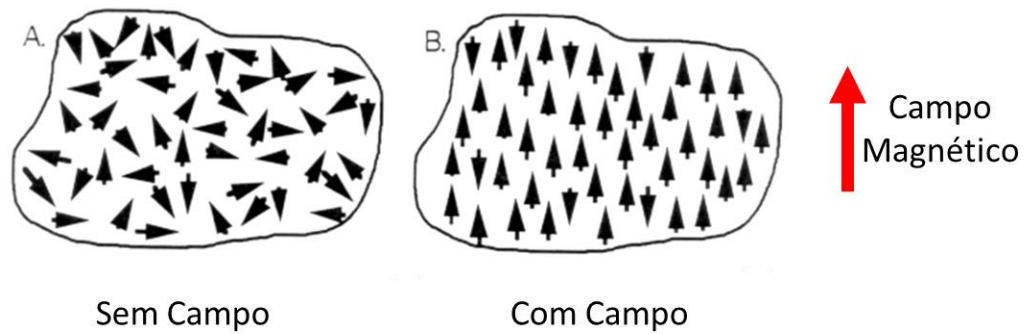


Figura 2: Comportamento dos spins nucleares de uma amostra na presença de um campo magnético intenso.

A diferença entre as populações, *spins* paralelos e antiparalelos, é bem pequena da ordem de um átomo a mais no estado de baixa energia, para cada milhão de átomos em baixa energia. Mas, como as amostras utilizadas para a MRI são macroscópicas, contendo da ordem de Avogadro de átomos, surge uma magnetização de equilíbrio resultante (M_0) nas mesmas direção e sentido de B_0 que é dada por:

$$\vec{M}_0 = \chi \cdot \vec{B}_0 \text{ (Eq. 2)}$$

onde χ é a susceptibilidade magnética nuclear e M_0 é a magnetização resultante da amostra e aponta na mesma direção do campo magnético aplicado pelo equipamento, a ela damos o nome de magnetização longitudinal.

O sinal que dá origem as MRI é obtido, então, através da excitação do sistema de spins da amostra. Esse processo é feito através da aplicação de pulsos de radiofrequência (RF) de curta duração que, por sua vez, são emitidos na mesma frequência de pressão (ω_0) dos *spins* nucleares. Nesta condição, o pulso de RF é absorvido pelos prótons (condição de ressonância), fazendo com que os *spins* atinjam um estado de energia mais alto (excitação). Quando isto ocorre, o ângulo de pressão da magnetização aumenta em relação ao campo B_0 , a este processo damos o nome de tombamento da magnetização longitudinal (Figura 3). O sinal da ressonância é, então, obtido medindo-se a recuperação da magnetização longitudinal depois que está foi tombada por um ângulo de 90° por exemplo. Neste sentido, o hidrogênio torna-se um bom candidato a elemento alvo para formação da MRI, pois ele o é elemento mais abundante no corpo humano e possui grande razão giromagnética, podendo, então, ser facilmente

excitado usando ondas de rádio. Logo, as MRI nada mais são que mapas de concentração de hidrogênio ao longo da amostra.

A interação da RF com os spins em precessão dá origem ao fenômeno de ressonância magnética, pois, a frequência do pulso de radiofrequência é a mesma da frequência de precessão do spin em questão (Frequência de Larmor). O pulso faz com que os spins atinjam um estado mais alto de energia (excitação), aumentando o ângulo com que precessionam em relação ao campo B_0 .

Efeito da Aplicação de um Pulso de RF em uma Amostra

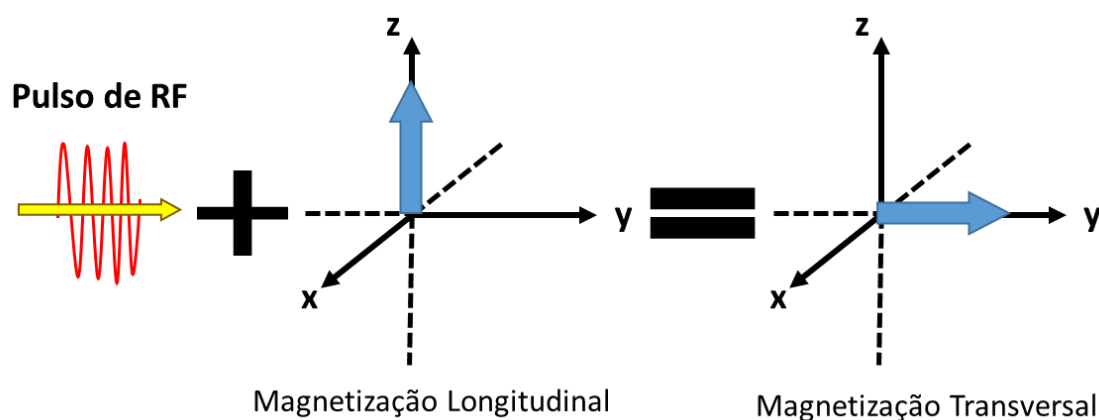


Figura 3: Efeito da aplicação de um pulso de radiofrequência centrado na frequência ω_0 : a magnetização resultante da amostra (M_0) sofre uma alteração na sua direção após a absorção resultante do pulso pelos átomos da amostra.

Após o casamento do pulso de RF, os *spins* irão retornar ao estado de menor energia e, deste modo, o vetor magnetização também irá retornar à sua posição de equilíbrio descrevendo um movimento helicoidal, reemitindo a energia absorvida no processo (fenômeno de relaxação). Existem dois processos pelos quais a magnetização retorna ao equilíbrio:

1. Por perda de energia para o meio (interação spin-rede): a energia depositada na excitação é perdida para o meio em forma de calor e o vetor M_0 tende a voltar para posição de equilíbrio. Esse processo de recuperação pela perda de energia para o meio é conhecido por relaxação longitudinal. A constante de tempo que descreve quão rápida é a

recuperação para o estado de equilíbrio é representada por T1, e indica o tempo necessário para que 63% da intensidade de M_0 seja recuperada.

2. Por defasagem dos spins (interação spin-spin): Os spins, que compõem a magnetização, sentem campos locais diferentes, pois cada próton possui uma vizinhança diferente que modifica o campo magnético sentido por cada próton. Tais variações do campo magnético local implicam em frequências de precessão locais diferentes, logo os spins desses núcleos precessionam cada vez mais fora de fase, o que causa uma perda da coerência no plano transversal, e a conseqüente extinção da magnetização neste plano. Este processo é chamado de relaxação transversal. A constante de tempo que descreve este fenômeno é T2 e indica que após um tempo igual a T2, 63% do sinal no plano transversal já terá sido perdido.

A captação do sinal é feita, por sua vez, usando um conjunto de bobinas de recepção posicionadas próximas à amostra. Tais bobinas irão captar as variações do fluxo magnético gerados pelo processo de relaxação e, por meio da lei de Faraday, irão induzir uma voltagem correspondente a essa variação da magnetização no eixo transversal nas bobinas receptoras. Essa voltagem é o sinal medido para a formação da imagem. Para diferenciar a origem espacial do sinal cada posição da amostra é codificada com um valor de frequência e de fase, que é posteriormente decodificado por uma transformada de Fourier.

Curiosamente, cada tecido do corpo tem, em geral diferentes valores de T1 ou T2, sendo, desta forma então, possível estabelecer um contraste entre esses valores e gerar imagens ponderadas por tais parâmetros, T1 ou T2. Devendo-se salientar que existem outros tipos de ponderação, como por exemplo SWI (*Susceptibility-weighted Image*), densidade de prótons e T2*.

Imagem Ponderada por Difusão

As imagens ponderadas por difusão (DTI) são aquisições de MRI com o propósito de avaliar a integridade da SB (substância branca) pela difusividade das moléculas de água no cérebro (Figura 4). O equipamento de ressonância magnética supõe que o deslocamento da água no cérebro possui resultante nula, ou seja, para cada pulso de gradiente do equipamento, os prótons dos átomos de hidrogênio da água permanecem imóveis. Se houver algum deslocamento

nesse tempo da molécula de água, o sinal da ressonância no local do deslocamento será atenuado. Logo, esta “falha” medida é proporcional à difusão local e é usada como medida quantitativa da difusão da água (22). Mas qual a importância de se estudar a difusividade da água no cérebro? Fisicamente, a difusão das moléculas de água é guiada por movimentos brownianos, ou seja, randômicos, logo a molécula não possui uma direção preferencial e, neste caso, dizemos que seu movimento é isotrópico. Este padrão de difusão é similar ao de moléculas de água dentro de um copo e longe das bordas do copo ou, como por exemplo, dentro do corpo neuronal. Em contrapartida, quando essa difusão é feita em finos capilares de vidro ou dentro dos axônios, essa difusão passa a ter orientação e aí dizemos que a difusão é anisotrópica.

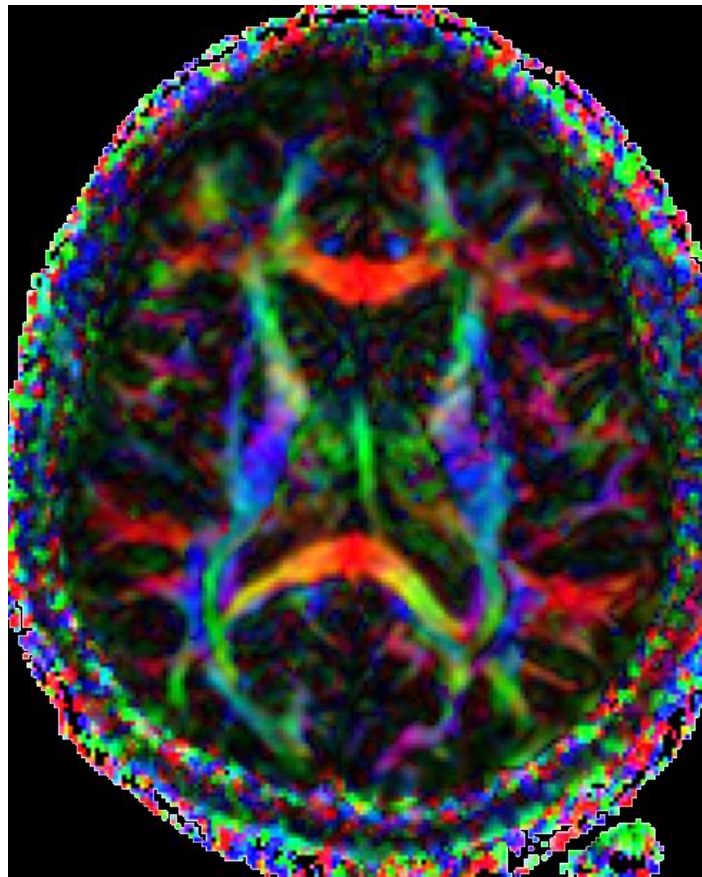


Figura 4: imagem de difusão com codificação direcional de cor.

Os parâmetros de difusão que avaliam, deste modo, a integridade dos tratos de substância são quatro: Anisotropia Fracionada (FA, do inglês *fractional anisotropy*), Difusividade Média (MD, do inglês *mean diffusivity*), Difusividade

Axial (AD, do inglês *axial diffusivity*) e Difusividade Radial (RD, do inglês *radial diffusivity*).

1. FA: é uma medida indireta da direcionalidade do movimento das moléculas de água e é calculado seguindo a equação 3, onde os λ representam os autovalores ($\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$) dos autovetores ($\vec{e}_1, \vec{e}_2, \vec{e}_3$) que descrevem a direção do movimento preferencial das moléculas. A FA pode assumir valores adimensionais entre 0 e 1. Quanto mais próximo de 1 mais direcional é o movimento. Segundo Alexander et al. (2011), o valor de FA é bastante sensível a alterações microestruturais, entretanto este parâmetro não indica o tipo de mudança ocorrida;

$$FA = \sqrt{\frac{1}{2}} \left(\frac{\sqrt{(\lambda_1 - \lambda_2)^2 + (\lambda_1 - \lambda_3)^2 + (\lambda_2 - \lambda_3)^2}}{\sqrt{\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2}} \right) \quad (\text{Eq. 3})$$

2. MD: é a média dos autovalores (Equação 4). Biologicamente, MD seria uma medida inversamente proporcional à densidade da membrana e a viscosidade do fluido, estando relacionada com celularidade, edema e necrose (23);

$$MD = \frac{\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3}{3} \quad (\text{Eq. 4})$$

3. AD: é o próprio valor λ_1 e estaria relacionado com a difusão da água na direção dos tratos, ao longo deles. Não possui um significado biológico muito específico podendo ser afetado com diferentes tipos de alterações de SB (23);
4. RD: é a média dos autovalores λ_2 e λ_3 , que poderia ser vista grosseiramente como o movimento da água no plano perpendicular aos tratos. Neste sentido, o aumento da RD está relacionado a problemas na mielinização dos tratos (23).

$$RD = \frac{\lambda_2 + \lambda_3}{2} \quad (\text{Eq. 5})$$

A técnica de DTI tem sido utilizada largamente no campo da neuroimagem para avaliar a integridade da SB cerebral, possibilitando identificar lesões sutis nestes tratos.

Neuroimagem na Ataxia de Friedreich

Os estudos de neuroimagem têm sido cada vez mais usados como ferramentas para investigação e acompanhamento de doenças neurológicas, incluindo as ataxias. Na FRDA, os primeiros estudos se restringiram a análises visuais que evidenciaram a redução volumétrica do diâmetro anteroposterior da medula espinhal (24, 25). Por outro lado, Chevis et al. (2013) realizaram a primeira análise quantitativa da medula cervical. Neste estudo, a atrofia de medula cervical foi sugerida como marcador de prognóstico da ataxia. Através de segmentação de imagens volumétricas, a área da medula cervical foi estimada; observou-se redução significativa deste parâmetro em relação aos controles, a qual se correlacionou com a gravidade da doença (26).

O acúmulo de ferro na FRDA foi também investigado através de técnicas de neuroimagem. As principais técnicas que identificam e quantificam o acúmulo de ferro no cérebro são a relaxometria, dada pela quantificação dos mapas de T2 e T2*, e a técnica de QSM (*Quantitative Susceptibility Mapping*), que é feita através da quantificação de mapas de susceptibilidade magnética. As imagens ponderadas em T2 e T2* possuem uma boa sensibilidade na detecção de depósitos de ferro com alta resolução espacial e podem abarcar todo o córtex. Contudo, tais imagens são muito susceptíveis a artefatos provenientes do campo estático B0 (27). As técnicas baseadas em susceptibilidade magnética possuem maior sensibilidade aos depósitos de ferro quando comparadas às técnicas de relaxometria e são menos influenciadas pelo ambiente microscópico que envolve a região de acúmulo de ferro (28). Porém, a grande limitação da técnica de QSM está associada à limitação física de aplicação da técnica, uma vez que está só pode ser realizada na região de gânglios da base. O motivo pelo qual isso acontece está associado ao aparecimento de artefatos gerados pela alta diferença de susceptibilidade magnética nas outras regiões (ex. interface ar-tecido). Portanto, avaliando por este aspecto, a técnica de QSM apresenta uma limitação significativa e, assim, um aperfeiçoamento da quantificação de depósitos de ferro por relaxometria T2 ou T2* talvez seja a melhor abordagem

para estudo dos depósitos de ferro. No entanto, ambas ainda são técnicas manuais que necessitam de muito tempo para execução e são dependentes da habilidade e experiência do usuário em diversas etapas do processamento. Neste sentido, Bonilha da Silva et al. (2014) descreveram alterações progressivas na relaxometria T2 do NDC usando uma abordagem manual.

A partir da análise de VBM (Morfometria Baseada em Voxel), com apenas 13 pacientes de FRDA, foram encontradas pequenas regiões atrofiadas na substância branca (SB) profunda do cerebelo (5). Em outro estudo, França et al. (2009) encontraram regiões atróficas na SB do giro do cíngulo posterior, lóbulos paracentrais e giro frontal médio. Além disso, por meio de análise baseada em regiões de interesse (ROI) foi encontrada redução volumétrica de substância cinzenta (SC) na porção ínfero-posterior dos hemisférios cerebelares e tronco cerebral dorsal (6). Estes dados estão em concordância com os resultados encontrados por Della Nave et al. (2011), os quais evidenciaram perda de SC no vérmis e hemisférios cerebelares com atrofia de SB profunda (4). As alterações descritas do volume cerebelar apresentaram correlação com a gravidade da ataxia (4, 6) e com duração da doença (4). Akhlanghi et al. (2011) encontraram que as áreas dos pedúnculos cerebelares estavam reduzidas em relação a controles saudáveis. Além disso, foi encontrada correlação da redução volumétrica dos pedúnculos com a gravidade, duração e início da doença. Neste sentido, os autores sugeriram que a atrofia do pedúnculo cerebelar superior é um potencial marcador de evolução da doença (7).

Uma outra forma de avaliar danos microestruturais de SB é usar imagens adquiridas com a técnica de DTI (*Diffusion Tensor Imaging*). O primeiro estudo que empregou essas imagens utilizou a técnica *tract based spatial statistics* (TBSS) para avaliar tais imagens (5). Os autores observaram a redução de anisotropia fracionada (FA) em pedúnculos cerebelares superiores e inferiores, tratos córtico-espinhais, tratos cerebelares, trato occipito-frontal e fascículo longitudinal inferior. Além disso, foi encontrado o aumento da difusividade média nos pedúnculos cerebelares superiores, SB cerebelar profunda bilateral e na SB próxima ao sulco central esquerdo (5). Outros estudos, posteriores, confirmaram os achados descritos anteriormente. Della Nave et al., (2011) identificaram FA reduzido, e difusividade radial e axial aumentados no pedúnculo cerebelar

superior. Em um segundo estudo, foi descrito que a difusividade radial do pedúnculo cerebelar inferior e superior se correlacionou com a gravidade da doença (4, 29).

No geral, os estudos com imagem focaram na avaliação de estruturas infratentoriais e somente poucos estudos investigaram estruturas supratentoriais (6). Estas estruturas certamente merecem uma melhor avaliação, pois alguns estudos identificaram manifestações não-atáxicas nos pacientes com FRDA, tais como: distúrbios comportamentais, coreia e disfunções cognitivas. Tais manifestações sugerem que o processo neurodegenerativo pode se estender para outras áreas além da região infratentorial (6, 8-10, 30). Além disso, há poucos estudos longitudinais de neuroimagem (11; 12). Bonilha da Silva et al. (2014) demonstrou alterações progressivas na relaxometria T2 do NDC, mas este estudo não investigou outros parâmetros de imagens e foi restrito a poucas regiões. Por outro lado, Santner et al. (2014) realizaram um estudo longitudinal em uma coorte de pacientes tomando eritropoietina usando uma ressonância de 1,5 T. Este estudo encontrou aumento de volume do córtex pulvinar e parietal superior. Embora interessantes, estes resultados não devem ser considerados como história natural da doença, pois ouve um possível fator modificador da doença (12). Portanto, ainda não está claro quais regiões possuem rápida degeneração e se a taxa de deterioração se correlaciona com a piora clínica da doença.

Os estudos de deposição de ferro no cérebro acabaram restritos à região de gânglios da base, com pouca exploração de regiões corticais e cerebelares devido a limitações nas técnicas empregadas. Atualmente existem fortes evidências de que algumas patologias, tais como a ataxia de Friedreich e a Esclerose Múltipla, possuem depósitos de ferro no núcleo denteado no cerebelo e no córtex motor, respectivamente, (31, 32). Desta forma, consideramos que o desenvolvimento de uma metodologia de imagem com uma abordagem “volumétrica” (*whole-brain*) e automática seria bastante oportuna a fim de aumentar a reprodutibilidade e acurácia das medidas, bem como diminuir o tempo de cálculo dos parâmetros. Estas são vantagens importantes, sobretudo considerando a possibilidade de uso da quantificação do ferro como um biomarcador para estudos longitudinais (11).

Por fim, a caracterização de diferentes fenótipos de uma doença, por exemplo FRDA, é potencialmente útil no entendimento da patologia e, a longo prazo, pode ser importante para a predição do prognóstico do paciente e confecção de ensaios clínicos. Nenhum dos estudos de neuroimagem comparou LOFA contra controles saudáveis ou contra pacientes com a forma clássica de FRDA. Portanto, não está claro se os dois tipos de fenótipos de FRDA, clássico e início tardio, apresentam o mesmo padrão de dano estrutural. Da mesma forma, estudos avaliando pacientes no início da doença, na faixa etária pediátrica, também não existem. Tais estudos são de extrema importância porque possibilitam entender a história natural da doença, endereçando as regiões que são acometidas inicialmente e o padrão de evolução da doença.

Desta forma, consideramos que a realização de uma investigação de imagem multimodal que avalie de forma transversal e prospectiva danos encefálicos em pacientes com FRDA seria oportuna. Além disso, a avaliação do padrão de dano estrutural entre os diferentes fenótipos (clássico e início tardio) da FRDA traria importantes informações a respeito da fisiopatologia da doença. Neste sentido, avaliar a existência de acúmulo de ferro em regiões extra-cerebelares seria também importante para a compreensão da fisiopatologia da FRDA. Por último, identificar, por meio de imagens de ressonância multimodais, as estruturas que são acometidas no início da doença seria de extrema importância para entender a evolução do dano neurológico da FRDA.

Objetivos

Objetivo Geral

Caracterizar *in vivo* o dano encefálico em pacientes com FRDA usando uma abordagem multimodal com imagens de ressonância magnética (MRI).

Objetivos específicos

1. Identificar as áreas de atrofia de substância branca e cinzenta no sistema nervoso central nos pacientes com FRDA e quantificá-las através de técnicas de ressonância magnética encefálica;
2. Identificar e quantificar as áreas de alterações microestruturais de substância branca em pacientes com FRDA através de análise de tensor de difusão;
3. Avaliar o comportamento evolutivo das alterações de neuroimagem nos pacientes com FRDA e sua correlação com parâmetros clínicos e de gravidade da FRDA;
4. Identificar o padrão de dano encefálico dos pacientes LOFA;
5. Identificar o padrão de acúmulo de ferro no cérebro de pacientes com FRDA;
6. Identificar as regiões encefálicas que são acometidas no início da FRDA.

Métodos

As descrições dos métodos abaixo são referentes aos estudos 1, 2 e 4 da sessão dos resultados. O estudo 3 terá seu próprio método, pois neste estudo nós propomos o desenvolvimento de uma ferramenta que quantifique os tempos de relaxação T2 de forma automática para todo cérebro.

Seleção dos Voluntários/Imagens

Para este estudo, foram selecionados pacientes com diagnóstico confirmado por teste molecular de ataxia de Friedreich e que são acompanhados no ambulatório de Neurogenética e Neurologia do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Além disso, foram selecionados voluntários de todas as faixas etárias a partir dos 10 anos de idade que sejam saudáveis, sem enfermidades neurológicas ou antecedentes de ataxia, para realização de exames de RM. Os pacientes com FRDA tiveram a gravidade da doença quantificada por meio da escala FARS (*Friedreich's Ataxia Rating Score*) (33). Dados clínicos como início da doença, idade atual, duração da doença e quantificação dos tripletos de GAA, longo e curto, também foram obtidos.

Foram excluídos indivíduos com quaisquer contraindicações para a realização do exame de MRI, aqueles cujas imagens apresentem artefatos significativos de movimento, e/ou que venham fazendo uso de medicamentos que interfiram com o metabolismo do ferro (sulfato ferroso, quelantes).

Este projeto foi realizado após a análise e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (parecer nº 131/2011). Cada participante assinou Termo de Consentimento Livre e Esclarecido antes da realização dos procedimentos experimentais.

Estudo de Imagem

Aquisição

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

- Sequência T1 volumétrica (3D) do crânio: espessura entre os cortes de 1 mm, TE=3.2ms, TR=7.1ms, ângulo de excitação (flip angle) 8°, voxels isotrópicos de 1 x 1 x 1 mm e FOV = 240x240.
- Sequência spin eco DTI: voxels adquiridos com tamanho 2x2x2 mm³ e interpolados para 1x1x2 mm³, matriz de reconstrução 256x256, 70 fatias, TE/TR 61/8500 ms, ângulo de flip 90°, 32 direções de gradiente e sem médias, b-factor máximo = 1000 s/mm²; 6 minutos de tempo total de scan.

Métodos de Segmentação

As imagens adquiridas (T1 e DTI) foram processadas usando os seguintes *softwares*: FreeSurfer e T1 MultiAtlas para avaliar SC; DTI MultiAtlas, TBSS para avaliar a SB; SpineSeg para avaliar a medula cervical; CERES para avaliar a SC do cerebelo.

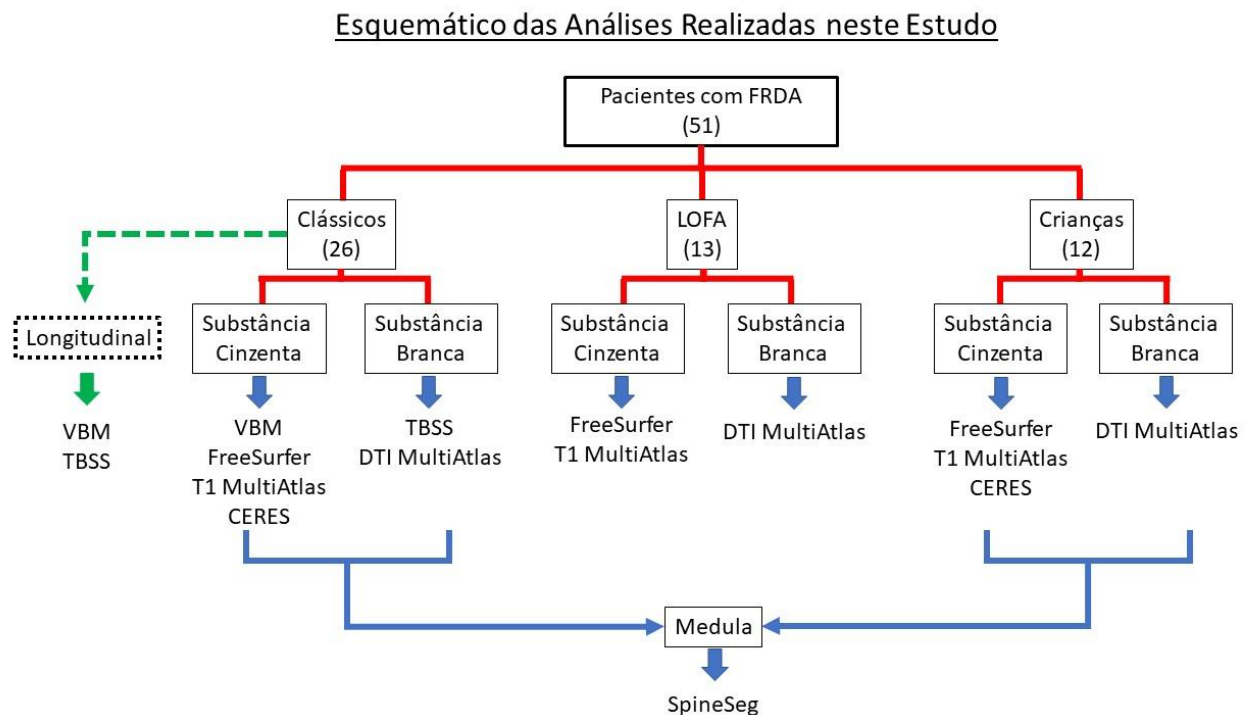


Figura 5: Fluxograma das análises de imagem feitas neste estudo.

VBM

Para realizar a análise de VBM nós utilizamos o *software* SPM 12 (<http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/software/spm12/>) que realiza várias etapas do processamento de forma totalmente automatizada. Primeiramente, as imagens são alinhadas e orientadas na comissura anterior. As imagens são então normalizadas usando o algoritmo DARTEL ao *template* MNI 152 (34), segmentadas em SB, SC e liquor, moduladas para correção de distorções métricas do processo de normalização e suavizadas com um filtro gaussiano de *kernel* de 10mm para homogeneização dos grupos. A normalização espacial foi realizada com o algoritmo DARTEL.

FreeSurfer

As medidas de espessura foram obtidas através do *software* FreeSurfer (versão 6.0) conforme protocolos propostos por *Fischl e Dale, 2000*. Resumidamente, as imagens são corrigidas para inomogeneidades do campo magnético, alinhadas ao atlas de Talairach e Tournoux (35) e é feita a remoção de tecido não cerebral (*skull-strip*). Em seguida, há a segmentação dos voxels em SC, SB e liquor, os quais são identificados baseados na sua localização, na sua intensidade e na intensidade dos voxels vizinhos. Uma rede de faces de

triângulos é construída em torno da superfície de SB, onde cada voxel é caracterizado por 2 triângulos. A rede, por sua vez, é suavizada usando um algoritmo que leva em consideração a intensidade local na imagem original (36), para uma resolução subvoxel, usando interpolação trilinear. A fim de garantir que a superfície possui as mesmas propriedades topológicas de uma esfera, os defeitos topológicos (buracos na superfície) são corrigidos (37). Neste sentido, uma representação mais realística da interface entre SC e SB é necessária. Portanto, uma segunda interação de suavização é aplicada produzindo, assim, uma superfície chamada *White Surface*. Neste contexto, a superfície cortical externa, a qual compreende a *pia mater*, é produzida empurrando (*nudging outwards*) a *White Surface* rumo a *pia mater* em um ponto onde o contraste do tecido é máximo (38). Esta superfície recebe o nome de *pial surface*.

Essa superfície é, então, segmentada em pequenas regiões neuroanatômicas, segundo *Desikan et al. 2006*, usando um processo automatizado proposto por *Fischl et al., 2004*. Para isto, a *pial surface* é mapeada homeomorficamente (*homeomorphically mapping*) em um sistema de coordenadas esféricas (41), ou seja, a *pial surface* é inflada na forma de uma esfera, e os padrões de dobramento são colocados em correspondência a um atlas de probabilidades. Com isso, por meio de um processo de segmentação Bayesiano, é atribuída para cada vértice uma marcação neuroanatômica que, por sua vez, possui seus rótulos confrontados com relação à atribuição de seus vizinhos utilizando, para isto, um algoritmo de Campos Aleatórios de Markov (40, 42). A espessura cortical é calculada, então, como a menor distância entre a *pial* e *white surface* para cada vértice através do manto cortical. Para todas as análises, os mapas foram suavizados usando um filtro de *kernel* Gaussiano através da superfície com um FWHM de 10 mm e com uma média entre os sujeitos.

T1 MultiAtlas

As imagens foram processadas usando o “MRICloud” (MRICloud.org), uma plataforma *web* pública para segmentar e quantificar imagens multi-contrastes. O processamento da imagem envolve a correção da orientação (sagital para axial), para corresponder a orientação do atlas de segmentação, correção para homogeneidade usando o algoritmo N4 (43) e dois níveis de

segmentação: primeiro, *skull-stripping* (44) e depois a segmentação de todo cérebro. Nesta ferramenta são usados alinhamentos lineares e não-lineares, além do algoritmo LDDMM (*Large Deformation Diffeomorphic Metric Mapping*) (45) para co-registrar a imagem do voluntário com o atlas de segmentação. Para identificar as regiões cerebrais será usado o algoritmo MALF (*Multi-Atlas Labeling Fusion*) (44), seguido por uma última etapa de ajuste da segmentação, a qual é realizada pelo algoritmo PICSL (46). Vinte e seis atlas (atlas JHU versão V9B) foram usados para gerar 283 estruturas em uma relação hierárquica de 5 níveis ontológicos (47, 48). Todas as análises foram realizadas no espaço nativo e o processamento foi feito no *cluster* Gordon do XSEDE (49).

CERES

O CERES (<http://volbrain.upv.es/index.php>) é uma ferramenta dedicada a segmentação automatizada do cerebelo em regiões anatômicas (50). Resumidamente, o pré-processamento é feito com a redução do ruído da imagem, correção para inomogeneidades de campo no espaço nativo, alinhamento das imagens com o MNI via registro *affine*, correção para inomogeneidades de campo no espaço do MNI, redução da dimensionalidade da imagem para a área do cerebelo, registro não-linear com um atlas de cerebelo para melhorar o alinhamento da imagem com os atlas de segmentação, normalização da intensidade de cinza, alinhamento não-linear com os atlas de segmentação e, por fim, a identificação das estruturas anatômicas (50). A identificação das estruturas é feita por um algoritmo que combina a segmentação de referência dos atlas para formar a segmentação correta (50, 51). O *software* fornece o volume e a espessura de cada estrutura no espaço nativo.

DTI MultiAtlas

As imagens brutas de DTI são primeiramente co-registradas e corrigidas para *eddy currents* (52) e movimento usando uma transformação *affine* de 12 graus de liberdade. Os parâmetros de difusão foram calculados usando um ajuste multivariado e *skull-stripping* usando a imagem de não difusão ($b = 0$) por limiar de intensidade (Li, X.; Jiang, H.; Yue, Li.; e Mori, S.; Johns Hopkins University, www.MriStudio.org ou www.kennedykrieger.org). Este processamento foi realizado usando o DTIStudio (H. Jiang e S. Mori, Johns Hopkins University, Kennedy Krieger Institute) (53). Em seguida, um registro não-

linear usando o algoritmo LDDMM (54) foi feito, e para o parcelamento foi empregado o algoritmo DLFA (54). Oito atlas (atlas adulto JHU versão V1) foram usados para gerar 168 estruturas. Todas as análises foram realizadas no espaço nativo. Os cálculos foram realizados no *cluster* Gordon do XSEDE (49).

TBSS

A partir do *software* FSL 5.0.4 (<https://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslwiki/>), nós obtivemos os mapas de anisotropia fracionada (FA), difusividade média (MD), difusividade axial (AD) e difusividade radial (RD, criada pela média dos autovalores L2 e L3) (55). O TBSS envolve várias etapas de pré-processamento antes da análise final (56). Todas as imagens de FA são primeiramente alinhadas ao espaço padrão usando um registro não linear. A próxima etapa envolve a criação de um *template* de FA médio, o qual permite a criação do esqueleto de FA médio. Depois disso, o mapa de FA de cada indivíduo é projetado sobre este esqueleto a fim de minimizar efeitos de variabilidade entre os sujeitos. Para avaliar os mapas de MD, AD e RD, os mapas são aplicados sobre o esqueleto de FA médio.

O protocolo do TBSS longitudinal implementado neste trabalho segue as etapas propostas por Menke et al. (2014). Os mapas de FA para cada paciente (imagem base e de seguimento), no espaço nativo, foram linearmente registradas no espaço *halfway* e uma média foi feita com os seus respectivos pares (58). A imagem média é então multiplicada pelas imagens originais (imagem base e de seguimento) para evidenciar qualquer diferença que exista entre elas. Este método também foi aplicado aos mapas de AD, MD e RD. Após este pré-processamento, o protocolo padrão do TBSS é realizado normalmente.

SpineSeg

O *software* SpineSeg foi desenvolvido para estimar, semi-automaticamente, a área da medula espinhal cervical e a sua excentricidade (ECC) (59). Primeiramente o programa re-amostra as imagens de ressonância a fim de corrigir variações na angulação da imagem e posição do pescoço. Na sequência, áreas transversais da medula espinhal são segmentadas, usando um algoritmo de *tree pruning* automático (60), e é ajustada uma elipse na área desejada por meio de um protocolo semiautomático. Estas medidas foram

realizadas na altura dos discos intervertebrais C2 e C3 usando uma aquisição de imagem de ressonância padrão para cérebro (61). Nós escolhemos este nível porque ele inclui a intumescência cervical, tornando mais fácil detectar redução volumétrica local. As medidas representam uma média de três níveis consecutivos de medição para a seção média de um disco intervertebral entre C2 e C3 de cada sujeito (61). Todas as medidas foram realizadas por um único investigador.

Análise Estatística

As análises estatísticas foram individualizadas para cada estudo, pois cada um deles exigiu um nível de complexidade diferente. Além disso, a abordagem usada é diferente em 3 dos 4 estudos. Logo, a descrição completa da análise estatística deve ser feita na leitura dos artigos que se encontram na sessão “Resultados”.

Resultados

Estudo 1: Análise longitudinal de ressonância magnética multimodal do cérebro de pacientes com FRDA



Research Article

Longitudinal magnetic resonance imaging study shows progressive pyramidal and callosal damage in Friedreich's ataxia

Thiago J.R. Rezende Msc, Cynthia B. Silva MD, PhD, Clarissa L. Yassuda MD, PhD, Brunno M. Campos Msc, Anelyssa D'Abreu MD, PhD, Fernando Cendes MD, PhD, Iscia Lopes-Cendes MD PhD, Marcondes C. França Jr. MD, PhD [✉](#)

First published: 21 December 2015 [Full publication history](#)

DOI: 10.1002/mds.26436 [View/save citation](#)

Cited by (CrossRef): 2 articles [Check for updates](#) | [Citation tools](#) ▼



[View issue TOC](#)
Volume 31, Issue 1
January 2016
Pages 70-78

Longitudinal MRI study shows progressive pyramidal and callosal damage in Friedreich's ataxia

T.J.R. Rezende^{1*}, Msc, C.B. Silva^{1*}, MD PhD, C.L. Yassuda¹, MD PhD, B.M. Campos¹, Msc, A. D'Abreu¹, MD PhD, F. Cendes¹, MD PhD, I. Lopes-Cendes², MD PhD, M.C. França Jr¹, MD PhD

*These authors contributed equally to this work.

Department of Neurology and Neuroimaging Laboratory¹ and Medical Genetics², School of Medical Sciences, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, BRAZIL

Word count: Title 93 characters, Abstract 250, Total count Manuscript 3169, References 42

Figures: 3 **Tables:** 2

Supplemental Data: 4

Running title: VBM, DTI and Freesurfer analysis in Friedreich's ataxia

Keywords: Friedreich's ataxia, MRI, VBM, DTI, Freesurfer

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) (Grant #13/01766-7 and #2014/19786-7) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Address correspondence to:

Marcondes C. 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 3521 7933

E-mail: mcfraja@uol.com.br

ABSTRACT

Background: Spinal cord and peripheral nerves are classically known to be damaged in Friedreich's ataxia, but the extent of cerebral involvement in the disease and its progression over time are not yet characterized.

Objective: to evaluate longitudinally cerebral damage in Friedreich's ataxia

Methods: We enrolled 31 patients and 40 controls, which were evaluated at baseline, after one and 2 years. To assess gray matter, we employed voxel-based morphometry and cortical thickness measurements. White matter was evaluated using diffusion tensor imaging. Statistical analyses were both cross-sectional and longitudinal (corrected for multiple-comparisons).

Results: Group comparison between patients and controls revealed widespread macrostructural differences at baseline: gray-matter atrophy in the dentate nuclei, brainstem and precentral gyri; and white-matter atrophy in the cerebellum and superior cerebellar peduncles, brainstem and periventricular areas. We did not identify any longitudinal volumetric change over the time. There were extensive microstructural alterations including superior cerebellar peduncles, corpus callosum and pyramidal tracts. Longitudinal analyses identified progressive microstructural abnormalities at the corpus callosum, pyramidal tracts and superior cerebellar peduncles after one year of follow-up.

Conclusion: Patients with Friedreich's ataxia present more widespread gray and white matter damage than previously reported, including not only infratentorial areas, but also supratentorial structures. Furthermore, patients with Friedreich's ataxia have progressive microstructural abnormalities amenable to detection in a short-term follow-up.

INTRODUCTION

Friedreich's Ataxia (FRDA) is the most common autosomal recessive ataxia, characterized by early onset, slowly progressive ataxia and deep sensory abnormalities (1). FRDA is caused by homozygous GAA expansions in the first intron of the *FXN* gene (2), which reduces the expression of the protein Frataxin leading to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration (1).

Neurodegeneration extends to the central and peripheral nervous system in FRDA, but the exact distribution of damage, particularly in the brain, is not yet clear. Previous MRI-based studies indeed showed gray matter (GM) and white matter (WM) atrophy in portions of the cerebellum and brainstem, as well as deep WM damage in the brainstem, cerebellum and cerebellar peduncles (3-9). However, few studies addressed supratentorial damage in FRDA (5). This point certainly deserves further studies because some recent reports identified additional manifestations in subjects with FRDA, such as mood disorders, chorea and cognitive dysfunction, which suggest that neurodegeneration might extend to other regions (5, 10-13).

There are also few neuroimaging studies that addressed structural abnormalities in a prospective manner (14, 15). Bonilha et al. (2014) showed progressive alterations in the T2 relaxometry of dentate nuclei, but this study did not investigate other MRI parameters and was restricted to few subcortical areas. On the other hand, Santner et al. (2014) performed a longitudinal study in a cohort of patients taking erythropoietin using a 1.5T scanner and an automatic tool for volumetry. These authors found increased volumes at the pulvinar and posterior parietal cortex at the end of the trial. Although interesting, these results should not be considered the natural history of the disease, because there was a possible disease-modifying intervention (15). Therefore, it is still not clear which regions degenerate faster as disease progress, and whether the rate of such atrophy is associated to clinical deterioration.

In this setting, we designed a longitudinal study to investigate brain damage in patients with FRDA using a multimodal MRI-based evaluation. We also investigated whether MRI-based parameters might prove useful as neuroimaging markers in FRDA and more sensitive to detect changes over time than clinical parameters alone. We attempted to perform a comprehensive study

including techniques able to evaluate both gray and white matter in an unbiased and whole-brain approach.

MATERIALS AND METHODS

Subjects' Selection

We selected a group of patients with FRDA that were regularly followed at the neurogenetics outpatient clinic at UNICAMP hospital between 2009 and 2014. All patients underwent genetic testing and found to be homozygous for the GAA expansions at the first intron of the *FXN* gene (16). Individuals with concomitant neurological disorders or unable to perform MRI scans were excluded. Clinical (gender, age at disease onset, duration of disease, clinical subtype) and genetic data (length of expanded repeat in both shorter, GAA1 and longer, GAA2 alleles) were recorded. Severity of ataxia was quantified using the Friedreich's ataxia rating scale (FARS) (17). FARS total score was defined as the sum of functional staging for ataxia, activities of daily living and neurological examination. FARS III subscore refers only to the neurological examination.

This protocol was approved by research ethics committee of our institution and a written informed consent was obtained from all participants prior to enrollment.

Study design

We enrolled 31 adults with FRDA (29 with classical disease and 2 with late-onset FRDA) and 40 age-and-gender matched healthy controls to participate in this study. Patients received symptomatic treatments, but none of them received iron-chelating drugs, erythropoietin or other experimental drugs during the study. All subjects were evaluated clinically and underwent MRI scans at the same day. Therefore, patients underwent MRI scans that included both T1 volumetric and DTI images at baseline, after one and after 2 years (Table 1). The number of patients with 2 or 3 structural images was smaller, because some of them were lost to follow-up (n=4), some refused to repeat the scans (n=2) and some presented significant motion artifacts (n=2). DTI sequences began to be acquired after volumetric T1 weighted sequences, so that we were not able to collect enough images for 2 year longitudinal analyses (n=4).

Image acquisition

All patients and controls underwent high resolution MRI on a 3T Achieva-Intera PHILLIPS Scanner. Routine T2 weighted sequences were performed for all subjects to exclude unrelated abnormalities (e.g. white matter disease, minor stroke). These images were carefully reviewed by a board-certified and experienced neuroradiologist (FC).

For Freesurfer and VBM analyses, we used volumetric T1 images of the brain acquired using a standard 8 channel head coil: sagittal orientation, voxel matrix 240x240x180, voxel size 1x1x1mm³, TR/TE 7/ 3.201ms, flip angle 8°.

For DTI analyses, we used a Spin echo DTI sequence: 2x2x2 mm³ acquiring voxel size, interpolated to 1x1x2 mm³; reconstructed matrix 256x256; 70 slices; TE/TR 61/8500 ms; flip angle 90°; 32 gradient directions; no averages; max b-factor = 1000 s/mm²; six minutes scan.

Voxel-based morphometry (VBM) protocol and analysis

Volumetric images were converted into a NIfTI file and then used for VBM analysis. We used the SPM 8 software (Wellcome Department of Imaging Neuroscience, London, England, www.fil.ion.ucl.ac.uk) and VBM 8 (<http://dbm.neuro.uni-jena.de/vbm8/>) running on MATLAB 8.0 to perform several fully automated pre-processing steps (spatial normalization, segmentation, modulation and smoothing). Spatial normalization was accomplished with the DARTEL algorithm (18). Processed images were compared using a voxel-wise statistical analysis (19). We used two sample T-test from SPM to search for differences in WM and GM volumes between FRDA patients and controls. In the cross-sectional study, the results were corrected for multiple comparisons using false discovery rate (FDR) ($p < 0.05$) and cluster size greater than 30 voxels. In order to display the results and precise their anatomical location we used an SPM extension, XJVIEW (<http://www.alivelearn.net/xjview/>). We also performed regression analyses with SPM to investigate the correlation between GM and WM volumes and clinical data (disease duration, GAA repeat lengths in both alleles, FARS total score and FARS III subscore). All analyses were corrected for multiple comparisons using Family-Wise Error (FWE, $p < 0.05$) and cluster size greater than 30 voxels. On longitudinal study, voxel-wise grey and white matter

differences were examined using a flexible factorial design assessing time (baseline and follow-up) x group interaction effects. For all longitudinal analyses, we employed FWE (p-value < 0.05) to correct the results for multiple comparisons and cluster sizes greater than 30 voxels (20-23). We also employed a GLM regression to assess correlations between longitudinal GM changes, i.e. image for 1 year of follow-up minus baseline image (Delta Imaging, areas of volumetric reduction that appeared after one year of follow-up) and clinical deterioration (Delta FARSIII and Delta FARS TOTAL, clinical impairment) in the same period. All regressions were corrected for multiple comparison using FWE (p<0.05) and considered significant with cluster sizes greater than 30 voxels.

FreeSurfer analysis

Cortical thickness and subcortical volumes were determined using the FreeSurfer software (V.5.3) according to the protocol suggested by Fischl and Dale (24). The images were corrected for inhomogeneity from magnetic field, ranged to Talairach and Tournoux atlas (25) and skull-stripped. Voxels were labeled as WM, GM and CSF. Using triangle meshes, two surfaces are created: the white and the pial surface (24). Cortical thickness was calculated as the shortest distance between the pial and white surface at each vertex across the cortical mantle. We used a Gaussian filter with 10 mm FWHM for smoothing. We estimated total intracranial volume (eTIV) (26) and the volume for subcortical regions (27) were calculated. Regional cortical thickness variations between the patient and control groups were assessed using a General Linear Model (GLM) with age, gender and eTIV as regressors. We considered cortical regions defined by parcellation according to the anatomical atlas of Desikan (28). For all comparisons, we set the p-value at 0.05 corrected for multiple comparisons using the Dunn-Sidak adjustment. We then performed GLM to assess the correlation between significant areas with cortical thickness data or subcortical volumes with clinical parameters (disease duration, GAA repeat lengths in both alleles, FARS total score and FARS III subscore), employing age, eTIV and gender as covariates. All analyses were corrected for multiple comparisons using FDR, and p-values < 0.05 were considered significant.

Tract-based spatial statistics (TBSS)

We obtained maps of fractional anisotropy (FA), mean diffusivity (MD), radial diffusivity (RD, which was created by averaging the eigenvectors L2 and L3), and axial diffusivity (AD) using the FMRIB diffusion toolbox (FSL software version 4.1.4) (29). Comparison of groups was then carried out using TBSS on the FSL software version 4.1.4 (30). All FA images are first aligned to a standard space using the nonlinear registration. The next step involves the creation of a mean FA template followed by the mean FA skeleton. Each patient aligned FA map is then projected over this skeleton, to remove the effect of cross-subject spatial variability. To visualize the statistical maps of MD, AD and RD, these parameters were applied over the mean FA skeleton.

The statistical analysis was done using a two-sample t-test to look for differences between patients and controls regarding FA, MD, AD and RD parameters. We used a Threshold-Free Cluster Enhancement (TFCE) to correct the statistical maps for multiple comparisons ($p\text{-value} < 0.05$). We used the Johns Hopkins white matter DTI based atlas to identify the impaired white matter fiber tracts. We also employed a general linear model to investigate the correlation of FA, MD, AD and RD results with clinical parameters (disease duration, GAA repeat lengths in both alleles, FARS total score and FARS III subscore).

The longitudinal TBSS pipeline implemented in this study follows the steps proposed by Menke et al. (31). The FA maps of each patient, in native space, were linearly registered into halfway space and averaged. To accomplish that, both images were linearly registered to each other, and then, the transformation matrix into halfway space was calculated (32) and this transformation was applied in both images, baseline and follow-up. After that, we obtained an average image as the mean of these two transformed images and this average image was multiplied by the original images (baseline and follow-up) to highlight any difference between them. This method was also applied to mean diffusivity, axial and radial diffusivity maps in native space for both times points. Afterwards, we ran the standard TBSS protocol and the statistical analysis was performed using a paired two-sample t-test, with correction for multiple comparisons, using TFCE approach with $\alpha = 0.05$ (33). The same pipeline was applied to the control group in order to eliminate possible changes over the time associated to GM loss of natural aging. Regression analyses were performed between images with 1

year of follow-up minus baseline images (delta imaging) and clinical deterioration (Delta FARSIII and Delta FARS TOTAL). All regressions were corrected using TFCE approach ($\alpha = 0.05$).

RESULTS

1A. Cross-sectional VBM

In FRDA, VBM showed GM atrophy in the posterior and anterior lobes of both cerebellar hemispheres, brainstem and occipital lobes, but also bilateral precentral gyri, right postcentral gyrus, bilateral inferior frontal gyri and left middle temporal gyrus (Figure 1A, Table S1). WM atrophy was particularly severe at the posterior lobes of the cerebellum, SCP and brainstem, as well as in periventricular areas, including bilateral frontal lobes, cingulate gyri, corpus callosum, precentral and postcentral gyrus (Figure 1B).

1B. Clinical Correlation with VBM

Regression analyses, from transversal study, showed that FARS and FARS III scores correlated inversely with GM and WM volumes at both cerebellar hemispheres, SCP and upper brainstem (Figure 1C, Table S2). The GAA repeat length at either allele did not correlate with volumetric data.

1C. Longitudinal VBM

Considering FWE or FDR-correction for multiple comparisons, there was no significant between-group difference. However, the uncorrected p-values (set at 0.001) showed some trends which could be useful for future studies (see supplemental data, Figure S1).

2A. Cross-Sectional FreeSurfer

Patients with FRDA showed significantly reduced cerebral cortical thickness compared to controls in the left calcarine sulcus, at both precentral gyri and left superior temporal cortex. Volumetric analyses of subcortical structures identified volumetric reduction at brainstem, corpus callosum, bilateral cerebellar cortex, both putamen, thalami and ventral diencephali (Table 2 and Figure S2).

2B. Clinical Correlations with FreeSurfer

In the multiple regression model, FARS score correlated with volume of brainstem ($r^2=0.632$, $p=0.002$), left and right cerebellar cortex ($r^2=0.587$, $p=0.018$ and $r^2=0.599$, $p=0.006$, respectively), right thalamus ($r^2=0.699$, $p=0.001$) and both ventral diencephali (left: $r^2=0.62$, $p=0.002$ and right: $r^2=0.699$, $p=0.001$). FARS III sub-score correlated with brainstem ($r^2=0.659$, $p=0.001$), right cerebellar cortex ($r^2=0.583$, $p=0.01$), left and right ventral diencephali ($r^2=0.656$, $p=0.001$ and $r^2=0.714$, $p<0.001$, respectively) and right thalamus ($r^2=0.717$, $p=0.001$). Brainstem volumes correlated with duration of the disease ($r^2=0.671$, $p=0.001$) and age at onset ($r^2=0.664$, $p=0.002$).

3A. Cross-sectional TBSS

TBSS identified extensive WM damage when patients with FRDA were compared with controls. We identified widespread reduction of FA, including bilateral SCP, corpus callosum and pyramidal tracts. The same areas presented increased MD and RD, with AD decreased (Figure 2A).

3B. Clinical Correlations with TBSS

FA at CC correlated with FARS score and disease duration (Figure 2B).

3C. Longitudinal TBSS

TBSS identified progressive microstructural WM abnormalities after one year. We identified reduced FA mostly in the distal portions of bilateral SCP, corpus callosum and pyramidal tracts. We also found increased AD over the same WM tracts (Figure 2C). We did not find any significant correlation with parameters of clinical deterioration.

DISCUSSION

Pathological studies in FRDA identified prominent neuronal loss in the dorsal root ganglia and damage to the gracile and cuneate fasciculi in the dorsal columns of the spinal cord (34). In addition, the lower brainstem, the DN and the efferent projections of the cerebellum are heavily compromised in the disease. Our transversal results are in line with these previous post-mortem reports and some neuroimaging studies (3-5, 8). We found significant GM and WM reduction in the deep cerebellar nuclei (DN and peridentate regions) and brainstem. However, we also observed GM atrophy affecting supratentorial areas, including

both precentral gyri. This finding was emphasized in occasional necropsy studies, but not previously reported in MRI-based studies. WM atrophy was much more widespread than previously reported (3-5, 8), including periventricular areas, especially the corpus callosum (CC). We also found atrophy in several infratentorial WM tracts, including the SCP, which is the major efferent pathway of the cerebellum (6, 9).

The WM abnormalities revealed by DTI were also prominent. We confirmed that SCP were significantly affected (6, 13, 35, 36). WM fibers from pyramidal tracts and CC were also compromised. These results are novel observations that highlight involvement of supratentorial structures in FRDA. Previous studies probably failed to identify such abnormalities because of smaller sample sizes. In addition, there were some limitations in these studies, such as the use of a ROI-based analysis (7) and a 1.5T MRI scanner (3, 6-8). The involvement of CC might be associated with cognitive dysfunction in patients with FRDA. Corticospinal tract damage might be responsible for the pyramidal signs and are in line with reduction of giant Betz cells in the layer V of primary motor cortex seen in pathological reports (37). DTI revealed increased RD and decreased AD, which are suggested as markers for oligodendrocyte dysfunction and axonal loss. This suggests that not only axons but also myelin of these CNS tracts are abnormal in FRDA (38-40). Interestingly, a similar pattern of mixed axonal and myelinic damage has been reported in sural nerve biopsies of patients with FRDA (37).

We did not find an association between GAA repeat length and volumetric parameters. Disease severity correlated with GM and WM loss in the cerebellum and its connections, as well as with DN volumes. This supports the concept that degeneration of DN plays an important role in the pathophysiology of the disease (37). In addition, CC microstructural abnormalities also correlated with motor handicap in our patients. CC is the larger WM commissure in the brain and found to be important in the execution of complex bimanual motor tasks, possibly due to the transfer of sensory input between hemispheres (41). These data indicate that DTI of the CC might also be a useful biomarker in FRDA. This possibility is further supported by our prospective TBSS results that identified progressive

abnormalities at the CC, pyramidal tracts and SCP in a short-term follow-up of one year.

In contrast to WM microstructural analyses, volumetric techniques did not find progression of atrophy after one or two years. This is in line with the slow progression of FRDA. Furthermore, a similar finding – the “apparent lack of progression” – was reported by our group in a closely related disorder (SCA3) after 1 year of follow-up using a longitudinal VBM pipeline (42). Perhaps, one needs a longer interval between exams to detect significant changes. As an alternative, a study that enrolls predominantly children and teenagers with FRDA might prove more successful to identify such progression.

A lack of a control group to assess longitudinal changes in TBSS is a limitation of the approach originally proposed by Menke et al (31). However, we tried to overcome this limitation by applying the same approach to a control group and, then, compared both maps in the same space. This simple analysis emphasizes that longitudinal changes are not age-related or even related to scanner performance when the acquisition was done, but actually due to disease-related progression.

CONCLUSION

In conclusion, we have shown that patients with FRDA present more widespread GM and WM involvement than previously reported, including not only infratentorial areas, but also supratentorial structures. We have shown that the CC, DN, SCP, precentral gyri and pyramidal tracts are major sites of lesion in FRDA. Some of these structures present progressive abnormalities, amenable to detection through MRI-based analyses, in a short-term follow-up. This reinforces the important role of these structural changes in the pathophysiology of FRDA and suggests that neuroimaging markers, particularly using DTI, are sensitive to monitor disease progression.

Funding: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, São Paulo, Brazil. Drs. MCFJ, AD, IL-C and FC are supported by FAPESP and CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa-BRAZIL). TJRR receives a PhD scholarship from FAPESP. The funding agencies did not interfere with the design of the study, collection of data or drafting of the manuscript.

Disclosures:

Dr Rezende receives a PhD scholarship from FAPESP

Dr Silva reports no disclosures

Dr Yasuda reports no disclosures

Dr Campos reports no disclosures

Dr D'Abreu received research support from CNPq and FAPESP

Dr Cendes serves as an editorial board member of *Neurology* and received research support from CNPq and FAPESP

Dr Lopes-Cendes received research support from CNPq and FAPESP

Dr França Jr received research support from CNPq and FAPESP

Contribution of the authors:

1. Research project: A. Conception, B. Organization, C. Execution;
2. Statistical Analysis: A. Design, B. Execution, C. Review and Critique;
3. Manuscript: A. Writing of the first draft, B. Review and Critique;

Authors' roles

Thiago Rezende: 1, 2A, 2B, 3A

Cynthia Bonilha da Silva: 1, 2A, 2B, 3A

Clarissa L Yasuda: 1A, 1B, 2C, 3B

Brunno Campos: 1C, 2B, 3B

Anelyssa D'Abreu: 1A, 1B, 2C, 3B

Fernando Cendes: 1A, 1B, 2C, 3B

Iscia Lopes-Cendes: 1A, 1B, 2C, 3B

Marcondes Cavalcante França Junior: 1, 2A, 2B, 3B

Full Financial Disclosures of all Authors for the Past Year:

Thiago Rezende: None

Cynthia Bonilha da Silva: None

Clarissa L Yasuda: None

Brunno Campos: None

Anelyssa D'Abreu: None

Fernando Cendes: None

Iscia Lopes-Cendes: None

Marcondes Cavalcante França Junior: None

REFERENCES

1. Pandolfo M. Friedreich ataxia. *Arch Neurol* 2008; 65: 1296-303.
2. Campuzano V, Montermini L, Moltò MD, et al. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by anintrinsic GAA triplet repeat expansion. *Science* 1996; 271: 1423-7.
3. Della Nave R, Ginestroni A, Tessa C, et al. Brain white matter tracts degeneration in Friedreich ataxia. An in vivo MRI study using tract-based spatial statistics and voxel-based morphometry. *NeuroImage* 2008; 40:19-25.
4. Della Nave R, Ginestroni A, Tessa C, et al. Brain structural damage in Friedreich's ataxia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; 79: 82-5.
5. França Jr MC, D'Abreu A, Yassuda CL, et al. A combined voxel-based morphometry and 1H-MRS study in patients with Friedreich's ataxia. *J Neurol* 2009; 256: 1114-20.
6. Della Nave R, Ginestroni A, Diciotti S, et al. Axial diffusivity is increased in the degenerating superior cerebellar peduncles of Friedreich's ataxia. *Neuroradiology* 2011; 53: 367-72.

7. Rizzo G, Tonon C, Valentino ML, et al. Brain diffusion-weighted imaging in Friedreich's ataxia. *Mov Disord* 2011; 26: 705-12.
8. Pagani E, Ginestroni A, Della Nave R, et al. Assessment of brain white matter bundle atrophy in patients with Friedreich ataxia. *Radiology* 2010; 255: 882-7.
9. Akhlaghi H, Corben L, Georgiou-Karistianis N, et al. Superior cerebellar peduncle atrophy in Friedreich's ataxia correlates with disease symptoms. *Cerebellum* 2011; 10: 81-7.
10. Silva CB, Yasuda CL, D'Abreu A, et al. Neuroanatomical correlates of depression in Friedreich's ataxia: a voxel-based morphometry study. *Cerebellum* 2012; 12: 429-36.
11. Hanna MG, Davis MB, Sweeney MG, et al. Generalized chorea in two patients harboring the Friedreich's ataxia gene trinucleotide repeat expansion. *Mov Disord* 1998; 13: 339-40.
12. Mantovan MC, Martinuzzi A, Squarzanti F, et al. Exploring mental status in Friedreich's ataxia: a combined neuropsychological, behavioral and neuroimaging study. *Euro J Neurol* 2006; 13: 827-35.
13. Akhlaghi H, Yu J, Corben L, Georgiou-Karistianis N, et al. Cognitive deficits in Friedreich ataxia correlate with micro-structural changes in dentatorubral tract. *Cerebellum* 2014; 13: 187-98.
14. Bonilha da Silva C, Bergo FPG, D'Abreu A, et al. Dentate nuclei T2 relaxometry is a reliable neuroimaging marker in Friedreich's ataxia. *Euro J Neurol* 2014; doi: 10.1111/ene.12448. [Epub ahead of print]
15. Santner W, Schoke M, Boesch S, et al. A longitudinal VBM study monitoring treatment with erythropoietin in patients with Friedreich ataxia. *Acta Radiol* 2014; 3: 1-6.
16. Filla A, De Michele G, Cavalcanti F, et al. The relationship between trinucleotide (GAA) repeat length and clinical features in Friedreich ataxia. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 554-60.

17. Subramony SH, May W, Lynch DR, et al. Measuring Friedreich ataxia: Interrater reliability of a neurologic rating scale. *Neurology* 2005; 64: 1261-2.
18. Ashburner JA. A fast diffeomorphic image registration algorithm. *Neuroimage* 2007; 38: 95-113.
19. Ashburner J, Friston KJ. Voxel-based morphometry – the methods. *Neuroimage* 2000; 11: 805-21.
20. Gläscher J, Gitelman D. Contrast weights in flexible factorial design with multiple groups of subjects. <https://www.jiscmail.ac.uk/cgi-bin/webadmin?A2=ind0803&L=SPM&P=R16629>, 2008.
21. Jason S, Menekka KS, Winston GP, et al. Working memory network plasticity after anterior temporal lobe resection: a longitudinal functional magnetic resonance imaging study. *Brain* 2014; 137: 1439-53.
22. Reetz K, Costa As, Mirzazade S, et al. Genotype-specific patterns of atrophy progression are more sensitive than clinical decline in SCA1, SCA3 and SCA6. *Brain*. 2013; 136:905-17.
23. França Jr MC, D'Abreu A, Maurer-Morelli CV, et al. Prospective neuroimaging study in hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum. *Mov Disord* 2007;22:1556-62.
24. Fischl B, Dale AM. Measuring the thickness of the human cerebral cortex from magnetic resonance images. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 11050-5.
25. Talairach J, Tournoux P. Co-planar Stereotaxic Atlas of the Human Brain, Thieme, NY. 1988.
26. Buckner RL, Head D, Parker J, 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.

27. Fischl B, Salat DH, Busa E, et al. Whole brain segmentation: automated labeling of neuroanatomical structures in the human brain. *Neuron* 2002; 33: 341-55.
28. Desikan RS, Segonne F, Fischl B, 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.
29. Smith SM, Jenkinson M, Woolrich MW, et al. Advances in functional and structural MR image analysis and implementation as FSL. *Neuroimage* 2004; 23: S208-19.
30. Smith SM, Jenkinson M, Johansen-Berg H, et al. Tract-based spatial statistics: voxelwise analysis of multi-subject diffusion data. *Neuroimage* 2006; 31: 1487-505.
31. Menke RA, Körner S, Filippini N, et al. Widespread grey matter pathology dominates the longitudinal cerebral MRI and clinical landscape of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2014; 137: 2546-55.
32. Reuter M, Rosas HD, Fischl B. Highly accurate inverse consistent registration: a robust approach. *Neuroimage*. 2010; 53: 1181-96.
33. Smith SM, Nichols TE. Threshold-free cluster enhancement: addressing problems of smoothing, threshold dependence and localisation in cluster inference. *Neuroimage* 2009; 44: 83–98.
34. Koeppen AH. Friedreich's ataxia: pathology, pathogenesis and molecular genetics. *J Neurol Sci* 2011; 303: 1-12.
35. Hohenberg CC, Schoke MF, Wigand MC, et al. Radial diffusivity in cerebellar peduncles correlates with clonical severity in Friedreich ataxia. *Neurol Sci* 2013; 34: 1459-62.
36. Zalesky A, Akhlaghi H, Corben LA, et al. Cerebello-cerebral connectivity deficits in Friedreich ataxia. *Brain Struct Funct* 2014; 219: 969-81.

37. Koeppen AH, Mazurkiewicz JE. Friedreich ataxia: neuropathology revised. *J Neuropathol Exp Neurol* 2013; 72: 78-90.
38. Concha L, Livy DJ, Beaulieu C, et al. In vivo diffusion tensor imaging and histopathology of the fimbria-fornix in temporal lobe epilepsy. *J Neurosci*. 2010 20:996-1002.
39. Klawiter EC, Schmidt RE, Trinkaus K, et al. Radial diffusivity predicts demyelination in ex vivo multiple sclerosis spinal cords. *Neuroimage*. 2011 15:1454-60.
40. Burzynska AZ, Preuschhof C, Bäckman L, et al. Age-related differences in white matter microstructure: region specific patterns of diffusivity. *Neuroimage* 2010 1: 2104-12.
41. Bonzano L, Tacchino A, Roccatagliata L, et al. Callosal contributions to simultaneous bimanual finger movements. *J Neurosci* 2008; 28: 3227-33.
42. D'Abreu A, França MC Jr, Yasuda CL, et al. Neocortical atrophy in Machado-Joseph disease: a longitudinal neuroimaging study. *J Neuroimaging*. 2012; 22:285-91.

Tabela 1: Estudo 1 - Table 1: Study design (a) and demographics data (b).

a) Patients with Friedreich's ataxia enrolled in the study (n=31)									
Transversal			Longitudinal Analysis						
Gray Matter		White Matter		One year Interval			Two years Interval		
				Gray Matter			White Matter		
1. VBM (n=31)		1. VBM (n=31)		1. VBM (n=24)			1. VBM (n=24)		
2. FreeSurfer (n=31)		2. TBSS (n=26)					2. TBSS (n=15)		
				1. VBM (n=16)			1. VBM (n=16)		

b)		Age (years)	Gender (M:F)	GAA₁	GAA₂	Onset (years)	Duration (years)	FARS
Cross-sectional Data								
Volumetric Study (n=40/31)	Controls	26.5±7.1	16:24	-	-	-	-	-
	Patients	27.3±10.5	11:20	1013±265	853±199	14.3±5.0	12.9±9.0	81.5±28.6
DTI Study (n=26/26)	Controls	27.0±9.6	9:17	-	-	-	-	-
	Patients	26.8±10.4	9:17	1011±291	843±212	14.0±5.3	12.4±8.6	78.5±27.1
Longitudinal Data								
1 year of follow-up (mean interval controls/patients: 13.7/14.5 months)								
Volumetric Study (n=26/24)	Controls	27.4±4.9	10:16	-	-	-	-	-
	Patients	26.4±10.2	9:15	1062±281	876±212	14.5±5.3	11.9±8.3	72.4±24.9 (81.2±24.7)*
DTI Study (n=24/15)	Controls	27.6±9.7	8:16	-	-	-	-	-
	Patients	27.5±10.6	3:12	838±234	705±141	16.5±6.7	11.0±8.4	66±23.7 (73.0±21.8)*
2 year of follow-up (mean interval controls/patients: 22.2/24.1 months)								
Volumetric Study (n=16/16)	Controls	28.1±5.5	6:10	-	-	-	-	-
	Patients	27.2±8.9	6:10	1113±288	920±211	15.3±4.2	11.8±8.3	74.8±25.7 (87.9±26.5)*

*refers to FARS scores at the second time point.

Tabela 2: Estudo 1 - **Table 2:** Results of FreeSurfer analyses showing subcortical structures with significant volumetric reduction and cortical regions with significant thickness reduction in patients with Friedreich's ataxia compared to healthy controls. ($p < 0.05$ with Dunn-Sidak correction).

Subcortical Volumetric Analysis		
Structure	Patients (mm³)	Controls (mm³)
Brainstem	16915±2712	21172±2261
Middle-posterior corpus callosum	353±103	455±83
Posterior corpus callosum	751±116	972±123
Left Cerebellum cortex	42181±6600	46981±6153
Left Putamen	5831±897	6581±753
Left Thalamus	6658±1200	7922±963
Left Ventral diencephalon	3203±490	3904±276
Right Cerebellar cortex	42553±6257	47297±5852
Right Pallidum	1488±198	1689±214
Right Putamen	5837±898	6587±704
Right Thalamus	5838±845	7111±677
Right Ventral diencephalon	3374±552	4080±368
Cortex Thickness Analysis		
Structure	Patients (mm)	Controls (mm)
Left Calcarine gyrus	2.0±0.2	2.2±0.1
Left Precentral gyrus	2.8±0.2	3.1±0.1
Left Superior temporal cortex	3.2±0.2	3.4±0.2
Right Precentral gyrus	2.9±0.2	3.1±0.1

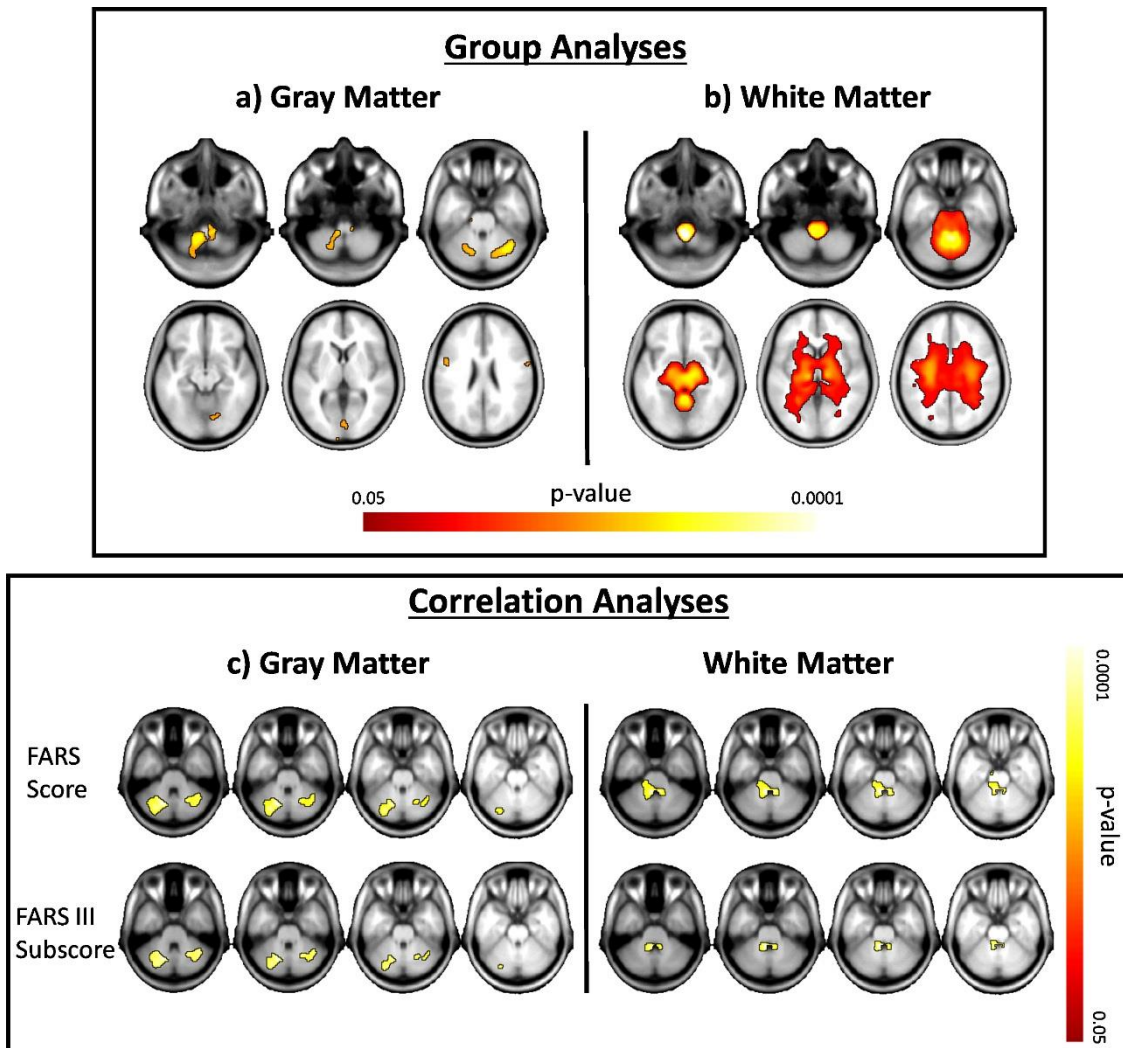


Figura 6: Estudo 1 - Figure 1: Cross-sectional results of voxel-wise analysis showing areas of gray matter (a) and white matter (b) volumetric reduction in patients with Friedreich's ataxia after comparison with age-and-sex matched controls. Results are shown on the MNI152 1-mm template. MNI z-axis coordinates are shown in mm above each image. The color coded bar represents the p-value. (c) Results of voxel-wise analysis showing areas of gray matter (left column) and white matter (right column) that presented significant negative correlation with FARS score (first lane) and FARS III subscore (second lane). Results are shown overlaid in the MNI152 1-mm template. MNI z-axis coordinates are shown in mm above each image. Statistical thresholds: $p < 0.05$ (FDR corrected) and cluster size greater than 30 voxels.

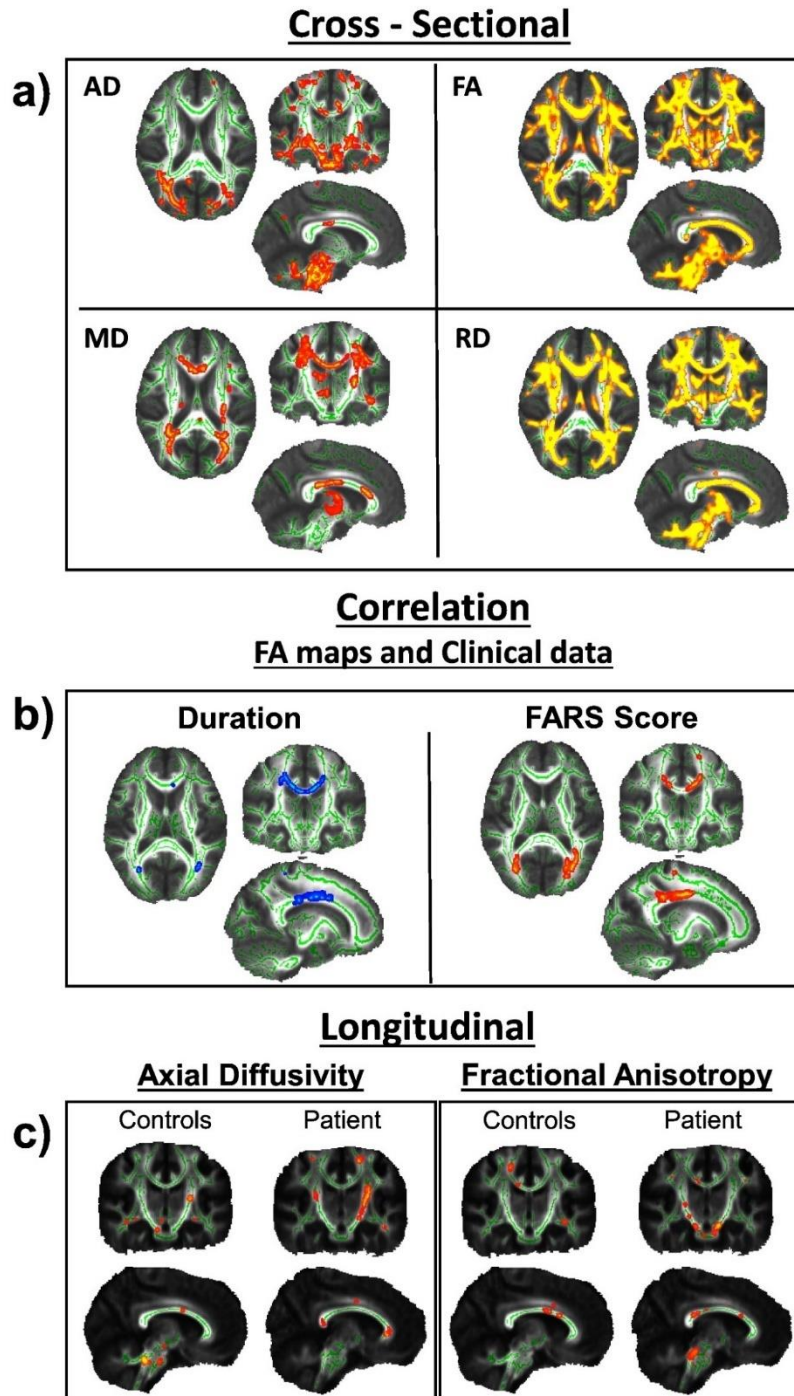


Figura 7: Estudo 1 - Figure 2: Results of tract based spatial statistics showing areas of reduced fractional anisotropy (FA) and axial diffusivity (AD), increased mean diffusivity (MD) and radial diffusivity (RD) in patients with Friedreich's ataxia after comparison with age-and-sex matched controls in transversal study (a) and longitudinal study (c). FA maps for correlation analysis with FARS and duration of the disease are shown in b. Results are shown on the MNI152 template. Statistical thresholds: $p < 0.05$ (TFCE corrected).

Tabela 3: Estudo 1 - **Table S1:** Areas with volumetric reduction in patients with Friedreich's ataxia compared to healthy controls revealed by VBM. The results were FDR-corrected for multiple comparisons ($p < 0.05$) and only clusters with size greater than 30 voxels are shown.

Group Analysis				
Gray Matter				
MNI Peak Coordinates			Cluster size (Voxels)	Areas
x	y	z		
-15.0	-51.0	-58.5	1921	Left Cerebellum 9
19.5	-24.0	-34.5	257	Right Brainstem
-18.0	-24.0	-33.0	180	Pons
36.0	-64.5	-27.0	970	Right Cerebellum 6
-15.0	-66.0	-30.0	248	Left Cerebellum 6
9.0	-76.5	-13.5	75	Right Cerebellum 6
-7.5	-10.5	1.5	35	Left Occipital Lobe
1.5	-84.0	7.5	220	Left Calcarine
61.5	-1.5	21.0	44	Right Precentral Gyrus
-51.0	0	24.0	72	Left Precentral

Tabela 4: Estudo 1 - **Table S2:** Gray and white matter regions that presented significant correlation with clinical parameters in patients with Friedreich's ataxia revealed by VBM. The results were FWE-corrected for multiple comparisons ($p < 0.05$) and only clusters with size greater than 30 voxels are shown.

Correlation Analysis					
Gray Matter					
Clinical Data	MNI Peak Coordinates			Cluster size (Voxels)	Areas
	x	y	z		
FARS	-16.5	-64.5	-31.5	1406	Left Cerebellum
	34.5	-55.5	-37.5	793	Right Cerebellum
	10.5	-63.0	-9.0	58	Culmen
FARS III	-16.5	-66.0	-30.0	1135	Left Cerebellum
	34.5	-54	-37.5	726	Right Cerebellum
	10.5	-63.0	-9.0	34	Culmen
White Matter					
Clinical Data	MNI Peak Coordinates			Cluster size (Voxels)	Areas
	x	y	z		
FARS	-4.5	-31.5	-51.0	84	Brainstem
	-6.0	-43.5	-28.5	3236	Left Cerebellum
	-10.5	-13.5	-24.0	30	Left Brainstem
FARS III	-6.0	-43.5	-28.5	494	Left Cerebellum
	0.0	-28.5	-18.0	47	Left Brainstem
	-9.0	-21.0	-4.5	181	Left Brainstem
	7.5	-19.5	-3.0	102	Right Brainstem

Tabela 5: Estudo 1 - **Table S3:** Gray matter regions that presented significant volumetric reduction in patients with Friedreich's ataxia after one year of follow-up. All results have p-values smaller than 0.001 (uncorrected) and cluster size larger than 30 voxels.

Longitudinal Study – 1 year of follow-up				
Gray Matter				
MNI Peak Coordinates			Cluster size (Voxels)	Areas
x	y	z		
-27.0	-3.0	-45.0	78	Fusiform
55.5	-4.5	-33.0	241	Right Temporal Lobe
-48.0	6.0	-33.0	126	Left Temporal Lobe
64.5	-25.5	-18.0	74	Right Middle Temporal Gyrus
-51.0	7.5	24.0	42	Left Inferior Frontal Gyrus
-43.5	0.0	49.5	53	Left Precentral

Tabela 6: Estudo 1 - **Table S4:** Gray and white matter regions that presented significant volumetric reduction in patients with Friedreich's ataxia after two years of follow-up. All results have p-values smaller than 0.001 (uncorrected) and cluster size larger than 30 voxels.

Longitudinal Study – 2 years of follow-up				
Gray Matter				
MNI Peak Coordinates			Cluster size (Voxels)	Areas
x	y	z		
36.0	-52.5	-54.0	31	Right Cerebellum 8
52.5	-6.0	-33.0	94	Right Inferior Temporal Gyrus
-49.5	-25.5	-33.0	50	Left Temporal Lobe
-64.5	-52.5	-1.5	34	Left Middle Temporal Gyrus
54.0	34.5	9.0	46	Right Inferior Frontal Gyrus
-58.5	-51.0	43.5	62	Left Parietal Lobe

White Matter				
MNI Peak Coordinates			Cluster size (Voxels)	Areas
x	y	z		
-10.5	6.0	-13.5	228	Left Caudate
-6.0	-1.5	-3.0	57	Left Sub-Lobar
-6.0	-1.5	-33.0	243	Left Cingulate Gyrus
-6.0	31.5	49.5	39	Left Frontal Lobe

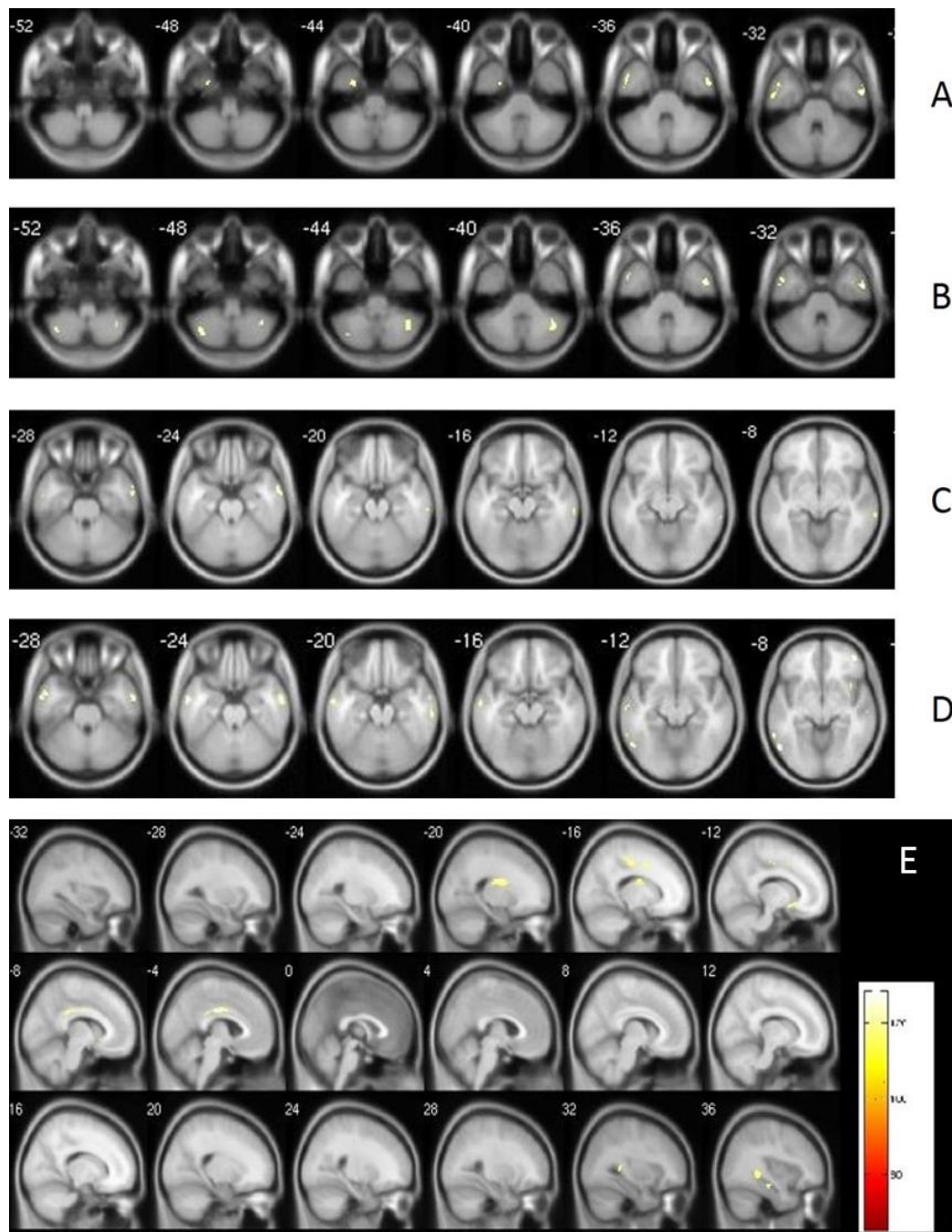


Figure 8: Estudo 1 - Figure S1: Longitudinal voxel-based morphometry – Results of voxel-wise analysis showing areas of gray matter volumetric reduction after one year (A and C), gray matter volumetric reduction after two years (B and D) and white matter volumetric reduction after two years (E) in patients with Friedreich's ataxia after comparison with age-and-sex matched controls. Results are shown on the MNI152 1-mm template. Statistical thresholds: $p < 0.001$ (uncorrected) and cluster size greater than 30 voxels.

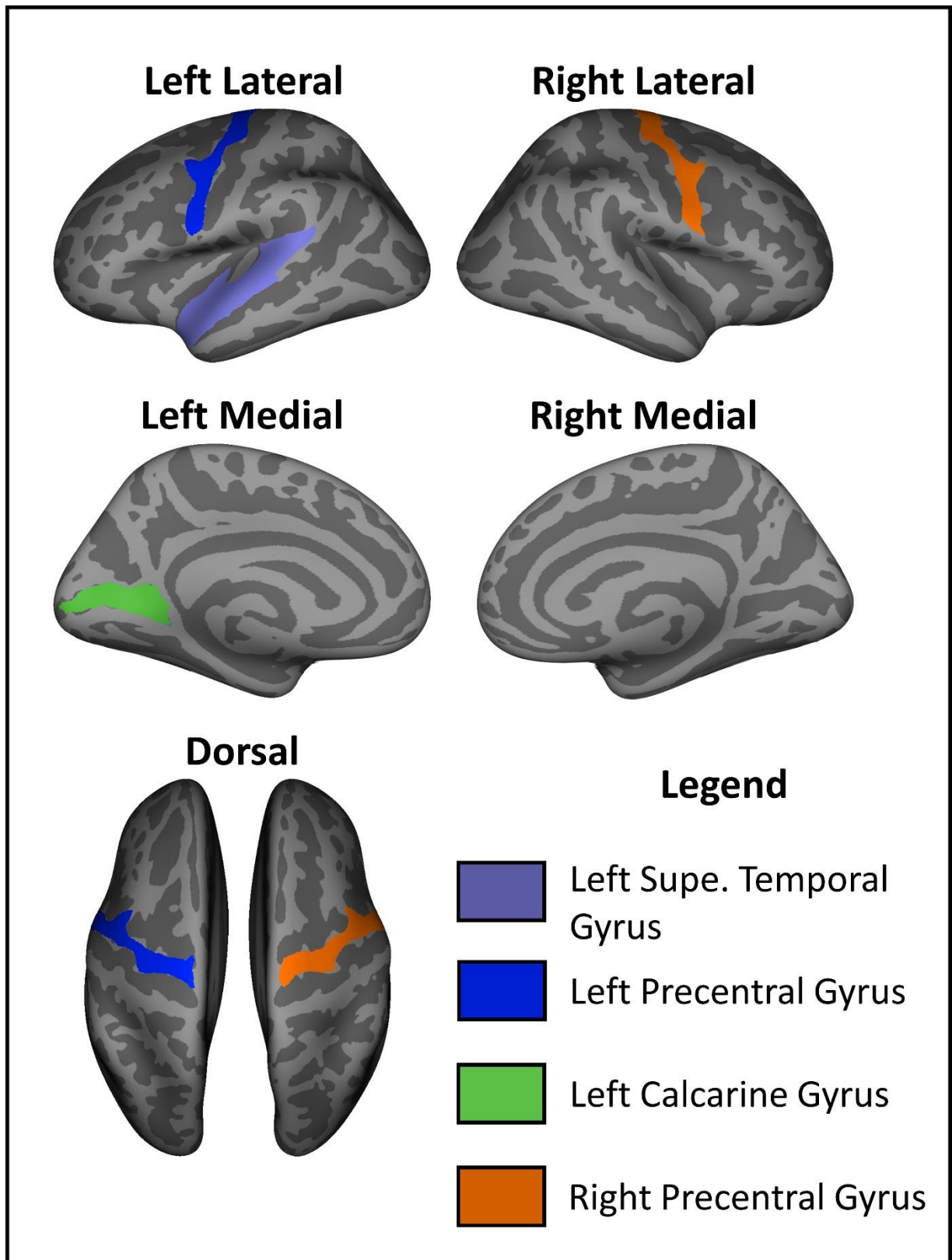


Figura 9: Estudo 1 - **Figure S2:** Cross-sectional FreeSurfer results for ROI-based analysis. The figure is basically illustrative, because the FreeSurfer ROI-based analysis and the output results are exclusively numeric values.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Cross-sectional results of voxel-wise analysis showing areas of gray matter (a) and white matter (b) volumetric reduction in patients with Friedreich's ataxia after comparison with age-and-sex matched controls. Results are shown on the MNI152 1-mm template. MNI z-axis coordinates are shown in mm above each image. The color coded bar represents the p-value. (c) Results of voxel-wise analysis showing areas of gray matter (left column) and white matter (right column) that presented significant negative correlation with FARS score (first lane) and FARS III subscore (second lane). Results are shown overlaid in the MNI152 1-mm template. MNI z-axis coordinates are shown in mm above each image. Statistical thresholds: $p < 0.05$ (FDR corrected) and cluster size greater than 30 voxels.

Figure 2: Results of tract based spatial statistics showing areas of reduced fractional anisotropy (FA) and axial diffusivity (AD), increased mean diffusivity (MD) and radial diffusivity (RD) in patients with Friedreich's ataxia after comparison with age-and-sex matched controls in transversal study (a) and longitudinal study (c). FA maps for correlation analysis with FARS and duration of the disease are shown in b. Results are shown on the MNI152 template. Statistical thresholds: $p < 0.05$ (TFCE corrected).

TABLES

Table 1: Study design (a) and demographics data (b).

Table 2: Results of FreeSurfer analyses showing subcortical structures with significant volumetric reduction and cortical regions with significant thickness reduction in patients with Friedreich's ataxia compared to healthy controls. ($p < 0.05$ with Dunn-Sidak correction).

SUPPLEMENTAL DATA

Figure S1: Longitudinal voxel-based morphometry – Results of voxel-wise analysis showing areas of gray matter volumetric reduction after one year (A and C), gray matter volumetric reduction after two years (B and D) and white matter volumetric reduction after two years (E) in patients with Friedreich’s ataxia after comparison with age-and-sex matched controls. Results are shown on the MNI152 1-mm template. Statistical thresholds: $p < 0.001$ (uncorrected) and cluster size greater than 30 voxels.

Figure S2: Cross-sectional FreeSurfer results for ROI-based analysis. The figure is basically illustrative, because the FreeSurfer ROI-based analysis and the output results are exclusively numeric values.

Table S1: Areas with volumetric reduction in patients with Friedreich’s ataxia compared to healthy controls revealed by VBM. The results were FDR-corrected for multiple comparisons ($p < 0.05$) and only clusters with size greater than 30 voxels are shown.

Table S2: Gray and white matter regions that presented significant correlation with clinical parameters in patients with Friedreich’s ataxia revealed by VBM. The results were FWE-corrected for multiple comparisons ($p < 0.05$) and only clusters with size greater than 30 voxels are shown.

Table S3: Gray matter regions that presented significant volumetric reduction in patients with Friedreich’s ataxia after one year of follow-up. All results have p-values smaller than 0.001 (uncorrected) and cluster size larger than 30 voxels.

Table S4: Gray and white matter regions that presented significant volumetric reduction in patients with Friedreich’s ataxia after two years of follow-up. All results have p-values smaller than 0.001 (uncorrected) and cluster size larger than 30 voxels.

Estudo 2: Comparação entre os fenótipos da FRDA: cFRDA vs. LOFA

HUMAN BRAIN MAPPING

[Explore this journal >](#)

Research Article

Structural signature of classical versus late-onset friedreich's ataxia by Multimodality brain MRI

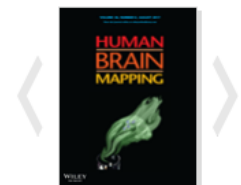
Thiago Junqueira R. Rezende, Alberto Rolim M. Martinez, Ingrid Faber, Karen Giroto, José Luiz Pedroso, Orlando G. Barsottini, Iscia Lopes-Cendes, Fernando Cendes, Andreia V. Faria, Marcondes C. França [✉](#)

First published: 23 May 2017 [Full publication history](#)

DOI: 10.1002/hbm.23655 [View/save citation](#)

Cited by (CrossRef): 0 articles [Check for updates](#) [Citation tools](#) ▼

Am score 1



[View issue TOC](#)
Volume 38, Issue 8
August 2017
Pages 4157-4168

Structural signature of classical vs late-onset Friedreich's ataxia by multimodality brain MRI

Thiago Junqueira R. Rezende¹, Msc, Alberto Rolim M. Martinez¹, MD, Ingrid Faber¹, MD, Karen Giroto¹, MD Msc, José Luiz Pedroso², MD PhD, Orlando G. Barsottini², MD PhD, Iscia Lopes-Cendes³, MD PhD, Fernando Cendes¹, MD PhD, Andreia V. Faria⁴, MD PhD, Marcondes C. França Jr¹, MD PhD.

¹ Department of Neurology and Neuroimaging Laboratory, School of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas SP, Brazil

² Division of General Neurology and Ataxia Unit, Federal University of São Paulo, São Paulo SP, Brazil

³ Department of Medical Genetics, School of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas SP, Brazil

⁴ Department of Radiology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore MD, USA

Word Count: Title 94 characters, Abstract 246 words, Manuscript 3186 words, References 38,

Figures: 05 **Table:** 02

Supplemental Data: 0

Short title: Neuroimaging findings in cFRDA and LOFA.

KeyWords: Friedreich's Ataxia, LOFA, MRI, Cortical thickness, Multi-atlas Approach

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) (Grant #13/01766-7 and #2014/19786-7) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

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: mcfraancjr@uol.com.br

Abstract

Introduction: Friedreich's ataxia (FRDA) is the most common autosomal-recessive ataxia worldwide; it is characterized by early onset, sensory abnormalities and slowly progressive ataxia. However, some individuals manifest the disease after the age of 25 years and are classified as late-onset FRDA (LOFA). Therefore, we propose a transversal multimodal MRI-based study to investigate which anatomical substrates are involved in classical (cFRDA) and LOFA.

Methods: We enrolled 36 patients (13 with LOFA) and 29 healthy controls. All subjects underwent magnetic resonance imaging in a 3T device; three-dimensional high resolution T1-weighted images and diffusion tensor images were used to assess gray and white matter, respectively. We used T1 multi-atlas approach to assess deep gray matter and cortical thickness measures to evaluate cerebral cortex and DTI multi-atlas approach to assess white matter. All analyses were corrected for multiple comparisons.

Results: Group comparison showed that both groups presented gray matter atrophy mostly in the motor cortex. Regarding white matter, we found abnormalities in the cerebellar peduncles, pyramidal tracts, midbrain, pons and medulla oblongata for both groups, but the microstructural abnormalities in the cFRDA group were more widespread. In addition, we found that the corticospinal tract presented more severe microstructural damage in the LOFA group. Finally, the midbrain volume of the cFRDA, but not of the LOFA group, correlated with disease duration ($R=-0.552$, $p=0.012$) and severity ($R=-0.783$, $p<0.001$).

Conclusion: The cFRDA and LOFA groups have similar, but not identical neuroimaging damage pattern. These structural differences might help to explain the phenotypic variability observed in FRDA.

Introduction

Friedreich's ataxia (FRDA) is the most common autosomal-recessive ataxia worldwide, with prevalence ranging from 1 to 3 for each 100,000 people (Campuzano et al., 1996; Bhidayasiri et al., 2005; Abrahão et al., 2005). It is characterized by early onset, slowly progressive ataxia, and deep sensory abnormalities. In 1996, the genetic basis of FRDA was described: homozygous GAA expansions in the first intron of the *FXN* gene (Campuzano et al., 1996). This mutation reduces the expression of the protein Frataxin, leading to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration (Pandolfo, 2008). The disease typically begins in late childhood or adolescence (classical FRDA – cFRDA), but there is a sub-group of patients with FRDA that manifest the disease symptoms after the age of 25 years. The latter group is known as late-onset Friedreich's Ataxia (LOFA) (de Michele et al., 1994). LOFA patients are characterized by slower disease progression, milder nonneurological symptoms, smaller GAA expansions, spasticity and sustained reflexes (Bhidayasiri et al., 2005).

Neurodegeneration in FRDA extends to the central and peripheral nervous system. Previous MRI-based studies showed gray matter (GM) and white matter (WM) atrophy in portions of the cerebellum, brainstem and cerebellar peduncles (Della Nave et al., 2011; Pagani et al., 2010). Gray matter supratentorial damage has been described in some studies as well, mainly in the precentral gyri (Rezende et al., 2016; França et al., 2009). Furthermore, Bonilha et al. (2014) described progressive alterations in the T2 relaxometry of dentate nuclei and Rezende et al. (2016) showed progressive abnormalities at the corpus callosum, pyramidal tracts and superior cerebellar peduncles in a short follow-up of 1 year. Despite that, none of these studies compared specifically classical FRDA (cFRDA) with LOFA patients or, in general, compared LOFA patients with healthy controls. Therefore, it is not clear whether these conditions have different patterns of structural damage; or how the CNS damage correlates with clinical parameters in LOFA.

The characterization of different phenotypes of a given disease (FRDA) is potentially helpful on revealing underpinning pathology, and, in the long term, may be of practical importance for prognosis prediction and design of treatments. In this study,

we investigated which anatomical substrates are selectively involved in cFRDA and LOFA, and possible associations of these features with clinical parameters. By using multimodal MRI, whole brain segmentation, and techniques able to evaluate both GM and WM, we performed a comprehensive, holistic, and unbiased study of the brain anatomy in FRDA using atlas-based analysis (ABA) (Faria et al., 2010). This is a technique used to automatically segment the entire brain into anatomical structures, allowing multimodal analyses within the same anatomical framework. For instance, for a given anatomical structure, it gives measures from T1- and T2-weighted images, Diffusion Tensor Imaging, and Susceptibility Weighted Images (Lin et al., 2013; Miller et al., 2013; Djamanakova et al., 2014; Faria et al., 2015). Still, anatomical heterogeneity can insert errors into the registration between each patient brain and the atlas. These errors may be ameliorated by using highly accurate image mapping, such as Large Deformation Diffeomorphic Metric Mapping (LDDMM), and multiple atlases with heterogeneous features, so some of the atlases are anatomically closer to the patient (Tang et al., 2014), providing accurate and reliable measures.

Materials

Study Design

Figure 1 is a flowchart that describes the sequential experimental steps performed in this study.

Participants

This study was approved by our institution research ethics committee and a written informed consent was obtained from all participants. Thirty-two patients with molecular confirmation of FRDA (23 cFRDA and 13 LOFAs) and 29 healthy controls (mean age = 27.1 ± 10.3 years; 10 males) were enrolled to this study. All patients are regularly followed at the neurogenetics outpatient clinics at the University of Campinas (UNICAMP) and the Federal University of São Paulo (UNIFESP) hospitals between 2009 and 2016. Clinical (age at disease onset, duration of disease, and clinical subtype) and genetic data (length of expanded repeat in both shorter, GAA1, and longer, GAA2 alleles) were recorded (Table 1). Severity of ataxia was quantified using the Friedreich's Ataxia

Rating Scale (FARS) (Subramony et al., 2005) (Table 1). Patients with concomitant neurological disorders, unable to perform MRI scans and those with significant motion artifacts on images were excluded.

Image Acquisition

All subjects were submitted to a high resolution MRI on a 3T Phillips Achieva Scanner. Routine T2 weighted sequences were performed for all subjects to exclude unrelated abnormalities (e.g. white matter disease, minor stroke). A board-certified neuroradiologist (FC) carefully reviewed the images that were all acquired using a standard 8-channel head coil.

For FreeSurfer and T1 Multi-Atlas analyses, we used high resolution T1 volumetric images of the brain with sagittal orientation, voxel matrix 240x240x180, voxel size 1x1x1mm³, TR/TE 7/3.201ms and flip angle 8°.

For DTI Multi-Atlas analyses, we used a spin echo DTI sequence: 2x2x2 mm³ acquiring voxel size, interpolated to 1x1x2 mm³; reconstructed matrix 256x256; 70 slices; TE/TR 61/8500 ms; flip angle 90°; 32 gradient directions; no averages; max b-factor = 1000 s/mm²; six minutes scan.

Image Processing

Gray Matter Analysis

T1 Multi-Atlas

The images were processed using “MRICloud” (MRICloud.org), a public web-based service for multi-contrast imaging segmentation and quantification. The image processing involves orientation correction (sagittal to axial), to match the atlas orientation, homogeneity correction by the N4 algorithm (Tustison et al., 2010), and two-level brain segmentation: first, skull-stripping (Tang et al., 2015), then whole brain segmentation. In addition to linear and non-linear algorithms for brain co-registration, the LDDMM algorithm (Miller et al., 2005) is also used. To identify the brain regions, a multi-atlas labeling fusion (MALF) algorithm was employed (Tang et al., 2015), followed by a last step of labeling adjusting with PICSL

(https://masi.vuse.vanderbilt.edu/workshop2013/images/1/1b/SATA_2013_Proceedings.pdf). Forty-five atlases (JHU adult atlas version 7A) were used to generate 289 structural definitions in a five-level ontological hierarchical relationship (Djamanakova et al., 2014; Wu et al., 2016). We chose to use the third level segmentation, which basically defines the lobes, because it showed the highest correlation with human evaluation in previous studies (Faria et al., 2015). All analyses were performed in native space. The computations were done on the Gordon cluster of XSEDE (Towns et al., 2014).

Cortical Thickness

Cortical thickness was determined using FreeSurfer software v.5.3. The choice of this measure for assessing cortical damage was due to the fact that this parameter is more sensitive to cortical variations than area and volume (Hutton et al., 2009). Measurements were performed according to the protocol suggested by Fischl and Dale (Fischl et al., 2000).

Images were corrected for magnetic field inhomogeneity, aligned to the Talairach and Tournoux atlas (Talairach and Tournoux, 1988), 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 (Fischl et al., 2000). 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) (Buckner et al., 2004) and the volume for subcortical regions (Fischl et al., 2002) were calculated.

White Matter Analysis

DTI Multi-Atlas

Raw DTI-weighted images were co-registered and corrected for eddy currents (Zhuang et al., 2006) and subject motion using a 12-parameter affine transform (Woods et al., 1998). The DTI-parameters were calculated using a multivariate linear fitting and skull-stripped using the b=0 image, by intensity threshold, a tool of RoiEditor software

(Li, X.; Jiang, H.; Yue, Li.; and Mori, S.; Johns Hopkins University, www.MriStudio.org or www.kennedykrieger.org). This preprocessing was performed using DTIStudio software (H. Jiang and S. Mori, Johns Hopkins University, Kennedy Krieger Institute) (Jiang et al., 2006). After that, a non-linear registration using a multi-contrast LDDMM (Tang et al., 2014) was performed and, then, the parcellation, which employs a DLFA algorithm (Tang et al., 2014). Eight atlases (JHU adult atlas version 1) were used to generate 168 structures. All analyses are performed in native space. The computations were processed on the Gordon cluster of XSEDE (Towns et al., 2014).

Statistical Analysis

We removed age, gender and eTIV effects using a linear regression and, then, the Kruskal-Wallis test was initially employed to assess group differences. This test was chosen because most MRI-derived parameters of the cFRDA and LOFA groups did not follow a normal distribution according to the Kolmogorov-Smirnov test. In order to correct for multiple comparisons, we employed the Dunn-Sidak test with level of significance adjusted to 0.05. We then used a post-hoc Mann-Whitney test for each pairwise group combination (control vs. FRDA, control vs. LOFA, FRDA vs. LOFA) to identify where these group differences are. For these post-hoc analyses, we also employed the Dunn-Sidak correction for multiple comparisons. After we identified these differences, we performed the principal component analysis (PCA) to evaluate qualitatively the separation between patients and controls. To accomplish that, we employed a z-score transformation to put all measures into the same scale and evaluated all parameters together (just those with group differences) (Figure 1).

PCA is an exploratory method to analyze, mainly, a large pool of data, reducing its dimensionality (Jolliffe, 1986). It means that there is some level of redundancy among the variables. In this sense, some variables might be correlated with one another, possibly because they are measuring the same thing. Then, PCA reduces the number of observed variables into a smaller number of uncorrelated principal components that will account for most of the variance in the observed variables. However, one of the most important uses of PCA is to find relationships

between objects, i.e., finding classes or, more specifically, clinical subtypes of a disease (Faria et al., 2015).

The general linear model was performed to assess possible correlations between imaging measures and clinical data (disease duration and disease severity). In all regressions we used age and gender as covariates. In order to adjust for multiple comparisons, we employed the FDR correction (level of significance $\alpha = 0.05$).

Results

Gray Matter Analysis

T1 Multi-Atlas

T1 Multi-Atlas showed volumetric reduction at the midbrain (including the red nuclei and substantia nigra), medulla oblongata (Mann-Whitney $p < 0.001$), pons ($p < 0.001$) and thalami (Right: $p < 0.001$; Left: $p < 0.001$) in patients with cFRDA when compared to controls (Figure 2). The LOFA patients, in comparison with healthy controls, showed volumetric reductions on the same structures found in the cFRDA group, except by the pons that did not show significant difference when compared to controls (Figure 2). Finally, LOFA patients did not present any significant difference when compared to cFRDA patients.

Cortical Thickness

We observed cortical thinning in the motor cortex, particularly in the left precentral gyrus and left subcentral gyrus and sulcus, for cFRDA and LOFA groups when compared to controls (Table 2). Furthermore, we did not find any significant difference between cFRDA and LOFA groups (Table 2).

White Matter Analysis

DTI Multi-Atlas

Axial Diffusivity

We only found WM abnormalities in the insular cortex ($p < 0.001$) to the cFRDA group when compared to control group. However, to make clear the interpretation of this result, we are just considering the WM beneath the GM in the insular cortex.

Fractional Anisotropy

In the cFRDA group, when compared to the control group, we identified widespread FA decrease in several brain regions, particularly those related to motor control. These abnormalities include damage in afferent areas of cerebellum, mostly at superior and inferior cerebellar peduncles in both hemispheres (both $p < 0.001$), medulla ($p < 0.001$), midbrain ($p < 0.001$) and pyramidal tracts ($p < 0.001$). We also found decreased FA in bilateral splenium and body of corpus callosum (both $p < 0.001$) and the ramifications of the thalamus ($p < 0.001$) (Figure 3).

In the LOFA group, we found FA decrease, when compared with control group, at similar structures to those found altered in cFRDA group. However, we did not observe WM abnormalities in bilateral splenium and body of corpus callosum, cerebral peduncles and corticospinal tract (Figure 3). In addition, we found significantly decreased FA in the cFRDA group when compared to the LOFA group at the left corticospinal tract ($p = 0.004$), bilateral splenium of corpus callosum (Right: $p = 0.002$; Left: $p = 0.007$), cerebral peduncles (Right: $p = 0.004$, Left: $p = 0.004$), right inferior cerebellar peduncle ($p = 0.011$), left posterior thalamic radiation ($p = 0.015$) and the WM beneath postcentral ($p = 0.002$) and precentral gyri ($p < 0.001$) (Figure 4).

Mean Diffusivity

In the cFRDA group, when compared to the control group, the mean diffusivity (MD) was increased at superior (Right: $p < 0.001$; Left: $p < 0.001$) and inferior (Right: $p < 0.001$; Left: $p < 0.001$) cerebellar peduncles, left middle cerebellar peduncle (p -value < 0.001), cerebral peduncles (Right: $p < 0.001$; Left: $p < 0.001$), medial lemnisci (Right: $p < 0.001$; Left: $p < 0.001$), left corticospinal tract ($p < 0.001$), midbrain ($p < 0.001$) and medulla ($p < 0.001$). The cFRDA patients also presented with increased MD in the right splenium of corpus callosum ($p < 0.001$) and bilateral hippocampi (Right: $p < 0.001$; Left: $p = 0.001$) (Figure 3). In contrast, the LOFA group showed increased MD only at superior

cerebellar peduncles (Right: $p < 0.001$; Left: $p < 0.001$), left inferior cerebellar peduncle ($p = 0.001$) and right medial lemniscus when compared to healthy controls (Figure 3).

Now, comparing cFRDA and LOFA groups, we found significant between-group MD differences at midbrain ($p = 0.005$), hippocampi (Right: $p < 0.001$; Left: $p < 0.001$), medulla oblongata ($p = 0.001$), left medial lemniscus ($p = 0.004$), left superior ($p = 0.008$) and middle ($p < 0.001$) cerebellar peduncle, cerebral peduncles (Right: $p < 0.001$; Left: $p < 0.001$), right splenium of corpus callosum ($p < 0.001$) and left corticospinal tract ($p = 0.001$) (Figure 4). In addition, evaluating the median MD for each one of these structures, we found that values were all higher in the cFRDA group. The only remarkable exception was the left corticospinal tract that presented higher MD value in the LOFA group (Figure 5).

Radial Diffusivity

By comparing cFRDA group with control group, we found widespread increased RD in regions associated with motor control, such as pyramidal tracts (Right: $p < 0.001$; Left: $p < 0.001$), inferior ($p < 0.001$) and superior (Right: $p < 0.001$; Left: $p < 0.001$) cerebellar peduncle, medial lemnisci (Right: $p < 0.001$; Left: $p < 0.001$) and ramifications, medulla ($p < 0.001$) and midbrain ($p < 0.001$) (Figure 3). We also found increased RD in hippocampi ($p < 0.001$), splenium of corpus callosum (Right: $p < 0.001$; Left: $p < 0.001$) and cerebellum ($p < 0.001$). The LOFA group showed increased RD at left inferior cerebellar peduncle ($p < 0.001$), the superior cerebellar peduncles (Right: $p < 0.001$; Left: $p < 0.001$), left hippocampus ($p = 0.012$), left medial lemniscus ($p = 0.007$), medulla oblongata (p -value 0.001) and right fornix ($p = 0.001$) in contrast to matched controls (Figure 3).

We also found increased RD, in cFRDA group, at the left inferior cerebellar peduncle ($p = 0.017$), left middle cerebellar peduncle ($p < 0.001$), cerebral peduncles (Right: $p < 0.001$; Left: $p < 0.001$), both hippocampi (Right: $p < 0.001$; Left: $p < 0.001$), medulla oblongata ($p = 0.002$), bilateral fornix (Right: $p = 0.012$; Left: $p < 0.001$) and bilateral splenium of corpus callosum (Right: $p < 0.001$; Left: $p < 0.001$) when compared to LOFA group (Figure 4). In contrast, the LOFA group showed higher RD values at the

bilateral corticospinal tract (Right: $p = 0.001$; Left: $p < 0.001$) compared to the cFRDA group (Figure 5).

Multimodality Analysis

Merging information from all approaches employed in this study (T1 multi-atlas, DTI multi-atlas and cortical thickness), we found a clear tendency of segregation between cFRDA and healthy controls (Figure 6). In contrast, the LOFA group is placed in a region between cFRDA patients and the control group with a smooth tendency to remain close (Figure 6).

Correlation Analyses

In the cFRDA group, volumetric reduction at midbrain and pons correlated with disease duration (midbrain: $R = -0.553$, $p = 0.016$; pons: $R = -0.569$, $p = 0.016$) and disease severity (midbrain: $R = -0.784$, $p < 0.001$; pons: $R = -0.683$, $p < 0.001$) respectively. In addition, disease duration also correlated with volumetric reduction at thalami (Left: $R = -0.603$, $p = 0.003$; Right: $R = -0.548$, $p = 0.007$) and medulla oblongata ($R = -0.693$, $p < 0.001$). In contrast, we did not find any significant correlation for the LOFA group. We did not find significant correlation between clinical and DTI parameters. All results were corrected for multiple comparisons using FDR test.

Discussion

This study is devoted to investigate cerebral damage in patients with cFRDA and LOFA using a multimodal MRI-based analysis. We found GM atrophy in both groups at the left precentral gyrus, left subcentral gyrus and sulcus as well as the thalami. White matter damage in cFRDA group was much more widespread than in the LOFA group, but the superior and inferior cerebellar peduncles, pyramidal tracts, midbrain, pons and medulla oblongata were compromised in both groups. These results are in line with previous pathological reports that showed the reduction of giant Betz cells in the layer V of primary motor cortex, degeneration of cerebellar peduncles, and the reduction of spinal cord area in FRDA (Klawiter et al., 2011; Koeppen et al., 2011).

Our results for cFRDA corroborate previous MRI reports (Della Nave et al., 2011; Pagani et al., 2010; Rezende et al., 2016; França et al., 2009; Silva et al., 2012; Bonilha

da Silva et al., 2014; Akhlaghi et al., 2014; Zalesky et al., 2014). Major targets of neurodegeneration were the corticospinal tracts and cerebellar connections, structures that help to explain the cardinal motor features of the disease (ataxia + pyramidal signs). In addition, the white matter abnormalities in the corpus callosum, hippocampi, fornix, pathways linking the cerebellum to thalamus and the prefrontal cortices may also explain the subtle, but increasingly recognized cognitive deficits in the disease, such as impairment of visuospatial and executive domains (Nieto et al., 2013). We were also able to show that limbic connections are involved as well, areas that are tightly related to mood disorders.

Overall, the pattern of damage in the LOFA group was similar to the cFRDA group. The key targets of neurodegeneration were the cerebellar peduncles, fornix, thalami, pyramidal tracts and motor cortex in LOFA. Interestingly, these results might help to explain the mild cognitive impairment (executive dysfunction) described by Nieto et al. (2013) in these patients. We have indeed found abnormal imaging results in regions known to be associated to specific cognitive functions, such as the posterior part of the corpus callosum and parieto-occipital association areas, which is in line with the results described by Nieto et al (2013). The milder signs of neurological damage in LOFA patients are also in line with their genetic background, since shorter GAA repeats result in less severe under expression of functional frataxin (Koeppen et al., 2011).

Corticospinal tracts were found to be altered in both groups. However, diffusivity parameters (MD and RD) pointed to more severe microstructural damage in the LOFA group. A clinical correlate of this MRI feature are the pyramidal signs (spasticity, hyperreflexia and Babinski sign), which were much more frequent and severe in our LOFA group as described by Martinez et al. (2017). In terms of disease pathophysiology, this result looks counterintuitive at first, but we believe that it sheds some light in the basis of Frataxin-related neuronal loss. It seems that low frataxin levels determine a selective neuronal damage depending on both the magnitude of deficiency and the duration of such deficiency. Patients with FRDA are under the effects of low frataxin expression since their conception. So, the exposure to the low levels of frataxin is longer in the LOFA group, since they are older than the cFRDA group. In this sense, we hypothesize that corticospinal tracts are more resistant to the deleterious effects of

frataxin loss in the short term, and therefore damage would only appear late in the disease course, what characterize a survivor effect since the LOFA patients experiment, on average, longer life span than cFRDA patients (Koeppen et al, 2011; Martinez et al., 2017). An alternative explanation would be that small and large (GAA) expansions lead to neurodegeneration through distinct biochemical mechanisms. Some specific tracts, such as the corticospinal tracts might be preferentially affected in a scenario of small (GAA) expansions, which are typical for LOFA. Previous reports indeed indicate that neuropathological signature at the cellular level in cFRDA and LOFA is slightly different (Koeppen et al, 2011). Further experimental studies are needed to address this question.

We did not find any correlation between clinical data and DTI parameters or cortical thickness data. This lack of correlation with cortical thickness measures was also observed in a previous study from our group (Rezende et al., 2016). At least two possibilities might help to explain this finding. There was reduced cortical thickness in FRDA only around primary motor cortices, but the clinical severity scale employed – FARS – is actually a measure of ataxia and some pyramidal signs, but not spasticity that is an important pyramidal sign found in our group of LOFA patients. Perhaps, if we look at clinical scales that truly quantify upper motor neuron damage or specifically spasticity per se, then such correlations might appear. Another hypothesis is a possible floor effect, because mean disease duration was around 13 years for each group. Regarding DTI data, we believe that ROI-based analysis might have been an important factor for not finding clinical correlations. The computed DTI measures were indeed a mean value for each label (structures), and this might have diluted effects that were found only in part of the label (Rezende et al, 2016).

There was no significant correlation between clinical and neuroimaging parameters (of those regions found atrophic) for the LOFA group. This is in striking contrast to the cFRDA group, where we found significant correlations, such as the midbrain volume with both disease duration and severity. One must take into account, however, that we enrolled a small cohort of LOFA subjects and therefore, the lack of correlation might be simply due to reduced statistical power. Another possible reason is that clinical-neuroimaging correlation truly behaves in different ways for LOFA and cFRDA. This is an important finding if we consider that neuroimaging markers are

emerging as potential surrogate outcome measures for drug tests. For hereditary degenerative diseases, our results indicate that any potential MRI-based metric must be validated across the whole phenotypic spectrum, before attempting to use it in clinical trials. Again, longitudinal studies with long follow-up periods would be extremely helpful.

In conclusion, cFRDA and LOFA have similar, but not identical neuroimaging signatures. Although subtle, the structural differences might help to explain the phenotypic variability seen in both conditions. The corticospinal tracts are damaged in both conditions, but more severely in the LOFA group. These results provide meaningful insights into disease biology and also add relevant information on the use of neuroimaging metrics as biomarkers for FRDA. The Multi-atlas approach proved to be a useful tool to identify biomarkers in FRDA, which might help upcoming clinical trials.

Funding: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, São Paulo, Brazil. Drs. MCFJ, JLP, IL-C, FC, JLP, OGB and ILC are supported by FAPESP and CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa-BRAZIL). Dr. AVF is supported by NIH (National Institute of Health). TJRB and ARMM receive a PhD scholarship from FAPESP (Grant #2014/19786-7 and 2013/26410-0), IF receives a PhD scholarship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de nível superior-BRAZIL). The funding agencies did not interfere with the design of the study, collection of data or drafting of the manuscript.

Disclosures:

Dr Rezende receives a PhD scholarship from FAPESP

Dr Martinez receives a PhD scholarship from FAPESP

Dr Faber receives a PhD scholarship from CAPES

Dr Giroto reports no disclosures

Dr Pedroso received research support from CNPq and FAPESP

Dr Barsottini received research support from CNPq and FAPESP

Dr Lopes-Cendes received research support from CNPq and FAPESP

Dr Cendes serves as an editorial board member of *Neurology* and received research support from CNPq and FAPESP

Dr Faria received research support from NIH

Dr França Jr received research support from CNPq and FAPESP

Contribution of the authors:

1. Research project: A. Conception, B. Organization, C. Execution;
2. Statistical Analysis: A. Design, B. Execution, C. Review and Critique;
3. Manuscript: A. Writing of the first draft, B. Review and Critique;

Thiago Junqueira R. Rezende: 1, 2A, 2B, 3A

Alberto R. Muro Martinez: 1C, 2B, 3A

Ingrid Faber: 1C, 2B, 3B

Karen Giroto: 1C, 2B, 3B

José Luiz Pedroso: 1A, 1B, 2C, 3B

Orlando G. Barsottini: 1A, 1B, 2C, 3B

Iscia Lopes-Cendes: 1A, 1B, 2C, 3B

Fernando Cendes: 1A, 1B, 2C, 3B

Andreia V. Faria: 1A, 1B, 2C, 3B

Marcondes C. França Jr: 1, 2A, 2B,3B

Full Financial Disclosures of all Authors for the Past Year:

Thiago Junqueira R. Rezende: none

Alberto R. Muro Martinez: none

Ingrid Faber: none

Karen Giroto: none

José Luiz Pedroso: none

Orlando G. Barsottini: none

Iscia Lopes-Cendes: none

Fernando Cendes: none

Andreia V. Faria: none

Marcondes C. França Jr: none

References

Abrahão A, Pedroso JL, Braga-Neto P, et al. (2015): Milestones in Friedreich ataxia: more than a century and still learning. *Neurogenetics* 16:151 – 60.

Akhlaghi H, Yu J, Corben L, et al. (2014): Cognitive deficits in Friedreich ataxia correlate with microstructural changes in dentatorubral tract. *Cerebellum* 13:187-198.

Bhidayasiri R, Perlman SL, Pulst SM, et al. (2005): Late-onset Friedreich ataxia: phenotypic analysis, magnetic resonance imaging findings, and review of the literature. *Arch Neurol* 629:1865 – 9.

Bonilha da Silva C, Bergo FP, D'Abreu A, et al. (2014): Dentate nuclei T2 relaxometry is a reliable neuroimaging marker in Friedreich's ataxia. *Euro J Neurol* 21:1131-1136.

Buckner RL, Head D, Parker J, et al. (2004): 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* 23:724-38.

Campuzano V, Montermini L, Molto MD, et al. (1996): Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by anintrinsic GAA triplet repeat expansion. *Science* 271:1423 – 7.

de Michele G, Filla A, Cavalcanti F, et al. (1994): Late onset Friedreich's disease: clinical features and mapping of mutation to the FRDA locus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 57:977 – 9.

Della Nave R, Ginestroni A, Diciotti S, et al. (2011): Axial diffusivity is increased in the degenerating superior cerebellar peduncles of Friedreich's ataxia. *Neuroradiology* 53:367-372.

Djamanakova A, Tang X, Li X, et al. (2014): Tools for multiple granularity analysis of brain MRI data for individualized image analysis. *Neuroimage* 101:168-76.

Faria AV, Kenichi O, Shoko Y, et al. (2015): Content-based image retrieval for brain MRI: An image-searching engine and population-based analysis to utilize past clinical data for future diagnosis. *Neuroimage Clin* 15:367-76.

Faria AV, Zhang J, Oishi K, et al. (2010): Atlas-based analysis of neurodevelopment from infancy to adulthood using diffusion tensor imaging and applications for automated abnormality detection. *Neuroimage* 15:415-28.

Fischl B, Dale AM (2000): Measuring the thickness of the human cerebral cortex from magnetic resonance images. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:11050-5.

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

França MC, Jr., D'Abreu A, Yassuda CL, et al. (2009): A combined voxel-based morphometry and 1H MRS study in patients with Friedreich's ataxia. *J Neurol* 256:1114-1120.

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

Jiang H, van Zijl PC, Kim J, et al. (2006): DtiStudio: resource program for diffusion tensor computation and fiber bundle tracking. *Comput. Methods Prog. Biomed* 81:106–116.

Jolliffe IT. 1986. *Principal Component Analysis*, Springer-Verlag, New York.

Klawiter EC, Schmidt RE, Trinkaus K, et al. (2011): Radial diffusivity predicts demyelination in ex vivo multiple sclerosis spinal cords. *Neuroimage* 15:1454-1460.

Koeppen AH, Morral JA, McComb RD, et al. (2011): The neuropathology of late-onset Friedreich's ataxia. *Cerebellum* 10:96-103.

Lim IA, Faria AV, Li X, et al. (2013): Human brain atlas for automated region of interest selection in quantitative susceptibility mapping: application to determine iron content in deep gray matter structures. *Neuroimage* 15:449-69.

Martinez AR, Moro A, Abrahao A, et al. (2017): Nonneurological Involvement in Late-Onset Friedreich Ataxia (LOFA): Exploring the Phenotypes. *Cerebellum* 16:253-256.

Miller MI, Beg MF, Ceritoglu C, et al. (2005): Increasing the power of functional maps of the medial temporal lobe by using large deformation diffeomorphic metric mapping. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:9685–9690.

Miller MI, Faria AV, Oishi K, et al. (2013): High-throughput neuroimaging informatics. *Front Neuroinform* 17:7-31.

Nieto A, Correia R, de Nóbrega E, et al. (2013): Cognition in late-onset Friedreich ataxia. *Cerebellum* 12:504-12.

Pagani E, Ginestroni A, Della Nave R, et al. (2010): Assessment of brain white matter bundle atrophy in patients with Friedreich ataxia. *Radiology* 255:882-887.

Pandolfo M. (2008): Friedreich ataxia. *Arch Neurol* 65:1296-1303.

Rezende TJ, Silva CB, Yassuda CL, et al. (2016): Longitudinal magnetic resonance imaging study shows progressive pyramidal and callosal damage in Friedreich's ataxia. *Mov Disord.* 31:70-8.

Silva CB, Yasuda CL, D'Abreu A, et al. (2012): Neuroanatomical correlates of depression in Friedreich's ataxia: a voxel-based morphometry study. *Cerebellum* 12:429-436.

Subramony SH, May W, Lynch DR, et al. (2005): Measuring Friedreich ataxia: Interrater reliability of a neurologic rating scale. *Neurology* 64:1261-1262.

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

Tang X, Crocetti D, Kutten K, et al. (2015): Segmentation of brain magnetic resonance images based on multi-atlas likelihood fusion: testing using data with a broad range of anatomical and photometric profiles. *Front Neurosci* 3:61.

Tang X, Shoko Y, Hsu John, et al. (2014): Multi-contrast multi-atlas parcellation of diffusion tensor imaging of the human brain. Plos One 9:e96985.

Towns J, Cockerill T, Dahan M, et al. (2014): XSEDE: accelerating scientific discovery. Comput Sci Eng 16:62-72.

Tustison NJ, Avants BB, Cook PA, et al. (2010): N4ITK: improved N3 bias correction. IEEE Trans Med Imaging 29:1310 – 1320.

Woods RP, Grafton ST, Holmes CJ, et al. (1998): Automated image registration: I. general methods and intrasubject, intramodality validation. J Comput Assist Tomogr 22:139–152.

Wu D, Ma T, Ceritoglu C et al. (2016): Resource atlases for multi-atlas brain segmentations with multiple ontology levels based on T1-weighted MRI. Neuroimage 125:120-30.

Zalesky A, Akhlaghi H, Corben LA, et al. (2014): Cerebello-cerebral connectivity deficits in Friedreich ataxia. Brain Struct Funct 219:969-981.

Zhuang J, Hrabe J, Kangarlu A, et al. (2006): Correction of eddy-current distortions in diffusion tensor images using the knowndirections and strengths of diffusion gradients. J. Magn. Reson. Imaging 24:1188–1193.

Tabela 7: Estudo 2 -Table 1: Clinical, demographic and genetic data of patients

	cFRDA (n=23)	LOFA (n=13)	p-value
Age (median±IQR, years)	23.0 ± 9.0	40.0 ± 10.0	<0.001**
Gender (M/F)	8/15	8/5	0.169*
Onset (median±IQR, years)	12.0 ± 8.0	27.0 ± 6.0	<0.001**
Duration (median±IQR, years)	10.0 ± 5.0	14.0 ± 15.5	0.626**
GAA₁	1063 ± 287	750 ± 310	0.471**
GAA₂	899 ± 194	593 ± 161	0.013**
FARS III subscore (median±IQR)	59.0 ± 30.0	40.0 ± 33.5	0.021**

*Chi-square test with Yates correction

**Mann-Whitney Test

Tabela 8: Estudo 2 - Table 2: Results of FreeSurfer analyses showing significant cortical thinning in patients with cFRDA and LOFA when compared to healthy controls. Results corrected for multiple comparison (Dunn-Sidak) and linearly regressed to age and gender.

Cortical Thickness Analysis			
Structure	Controls	cFRDA	LOFA
Left Subcentral Gyrus and Sulcus	2.67 ± 0.20	2.53 ± 0.15	2.44 ± 0.13
Left Precentral Gyrus	2.69 ± 0.13	2.48 ± 0.21	2.49 ± 0.20
p-values from Group Analyses			
Structure	Controls vs cFRDA	Controls vs LOFA	cFRDA vs LOFA
Left Subcentral Gyrus and Sulcus	<0.001	<0.001	0.542
Left Precentral Gyrus	<0.001	0.010	0.084

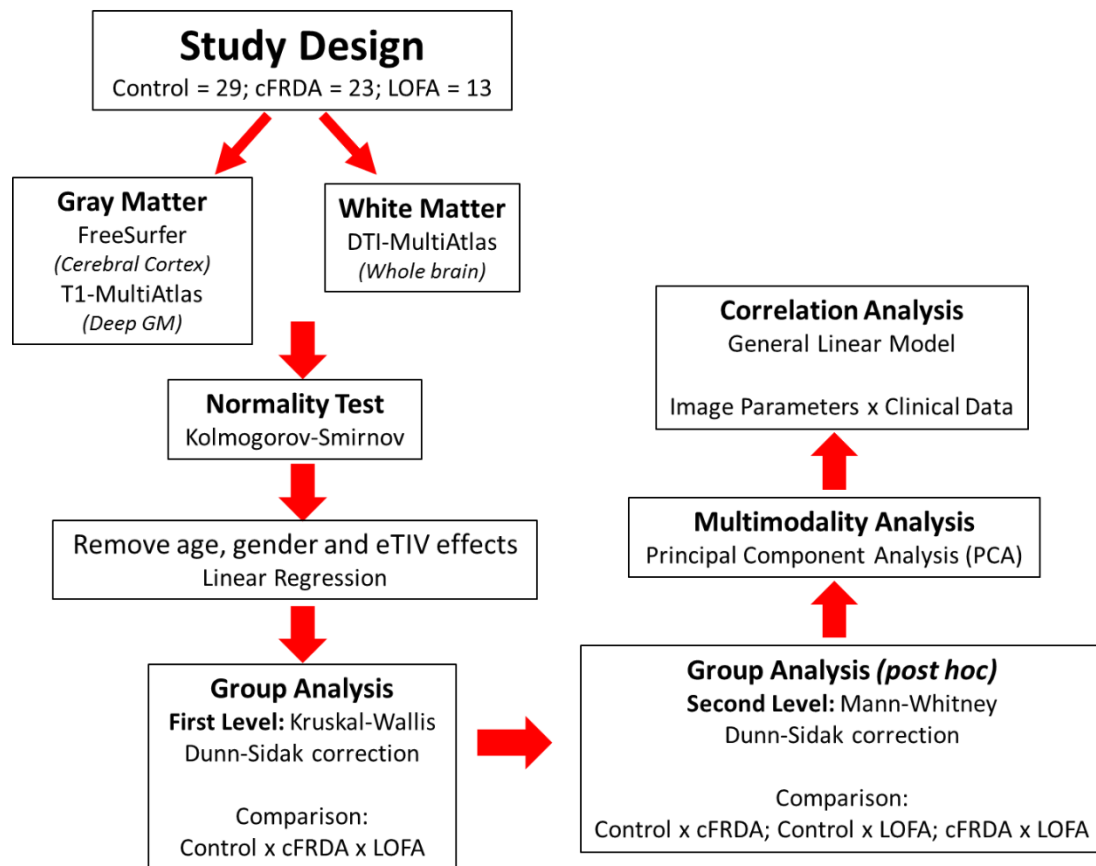


Figura 10: Estudo 2 - Figure 1: Study design.

**T1 Multi-Atlas
Patients vs Controls**

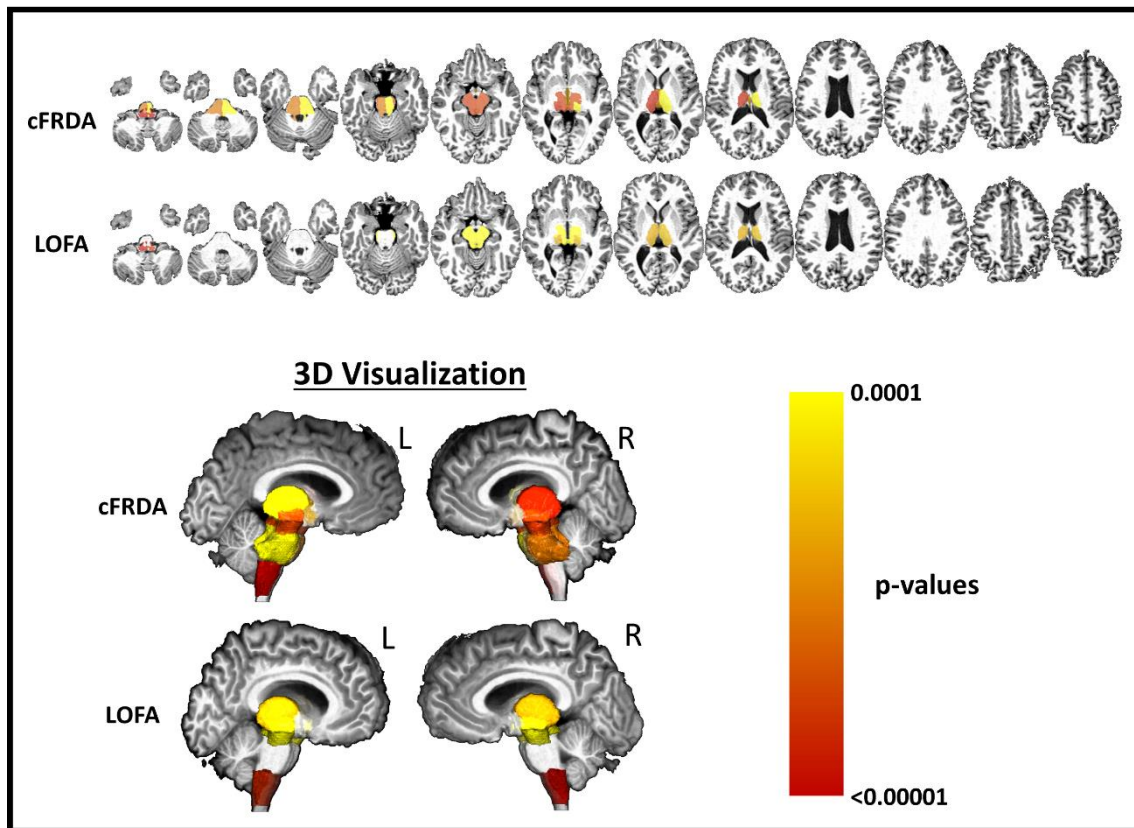


Figura 11: Estudo 2 - Figure 2: Results of ROI-based analyses using T1 multi-atlas approach to assess deep GM. The cFRDA and LOFA patients were compared to healthy controls. All results were corrected for multiple comparisons, using Dunn-Sidak test, and the measures were linearly regressed to age, gender and total intracranial volume.

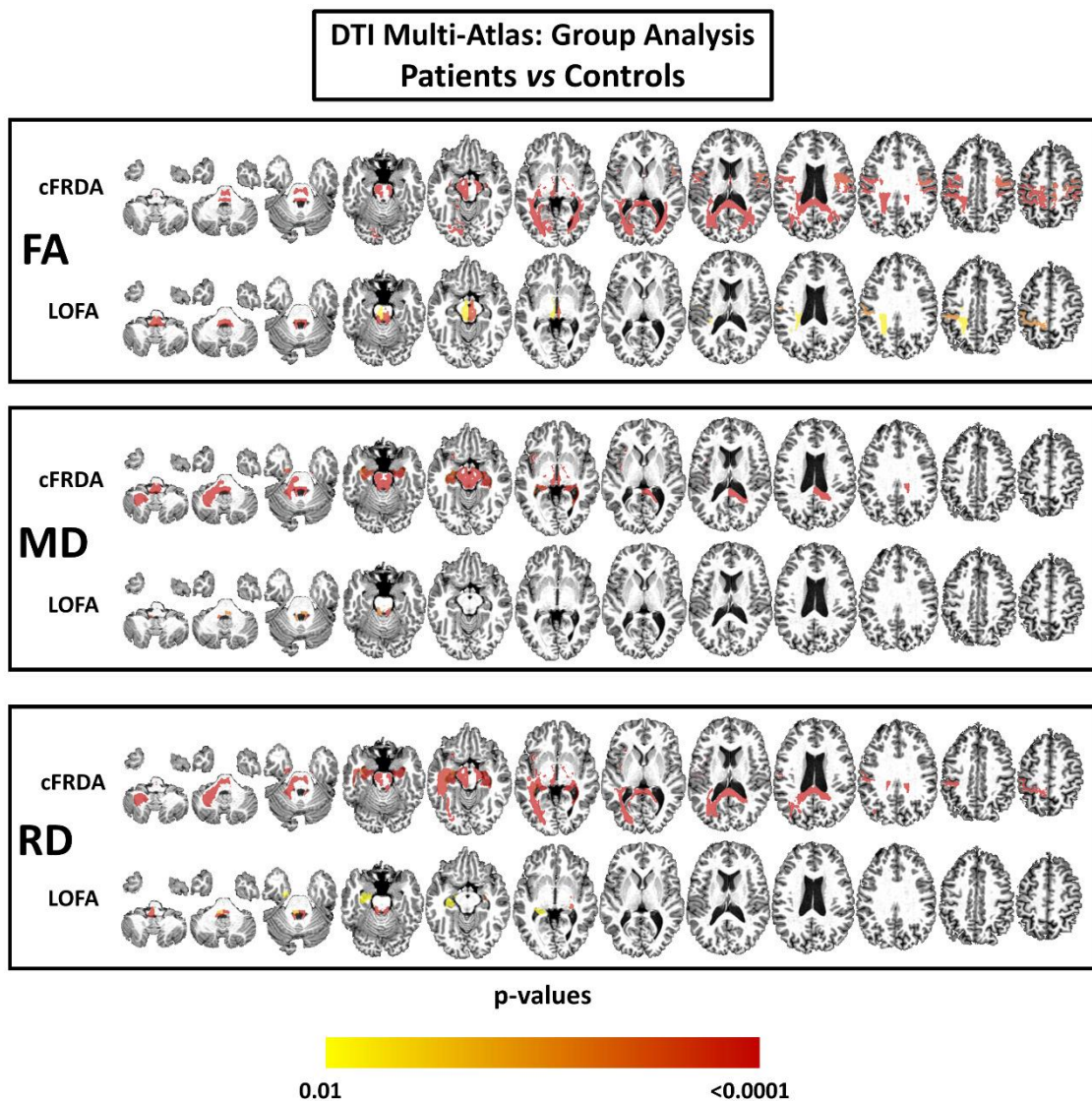


Figura 12: Estudo 2 - Figure 3: Results of DTI multi-atlas approach showing areas of reduced fractional anisotropy (FA), mean diffusivity (MD) and radial diffusivity (RD) in patients with cFRDA and LOFA after comparison with controls. Effects of age and gender were removed and all results were corrected for multiple comparisons using Dunn-Sidak test.

Differences Between cFRDA and LOFA

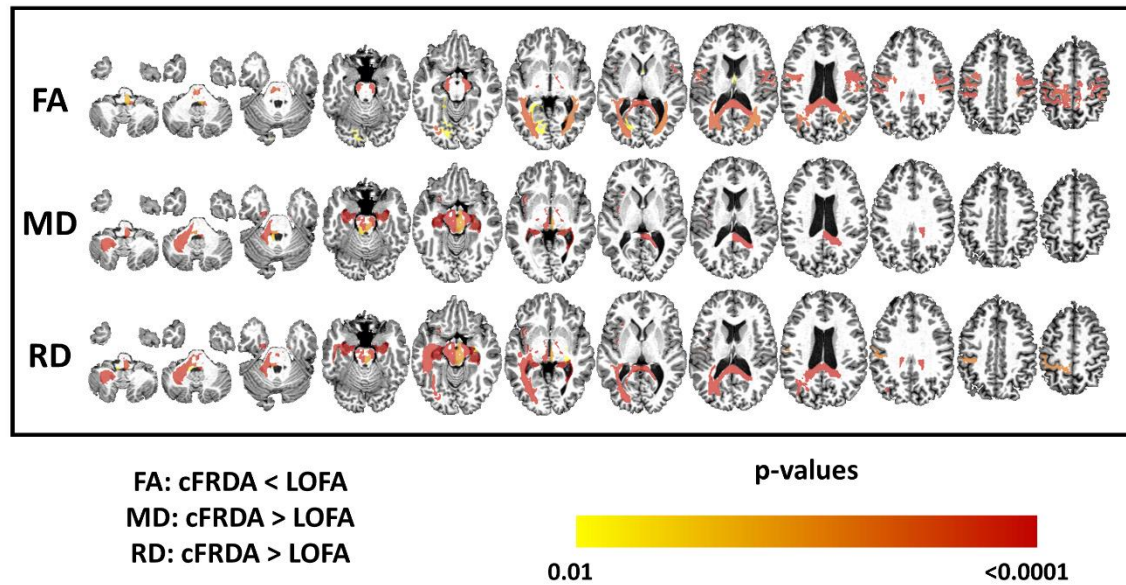


Figura 13: Estudo 2 -Figure 4: Structural differences between cFRDA and LOFA patients. The yellow-red scale shows structures more severely altered in the cFRDA group. All results were corrected for multiple comparisons using the Dunn-sidak test. The effects of age and gender were regressed in the model.

Differences Between cFRDA and LOFA

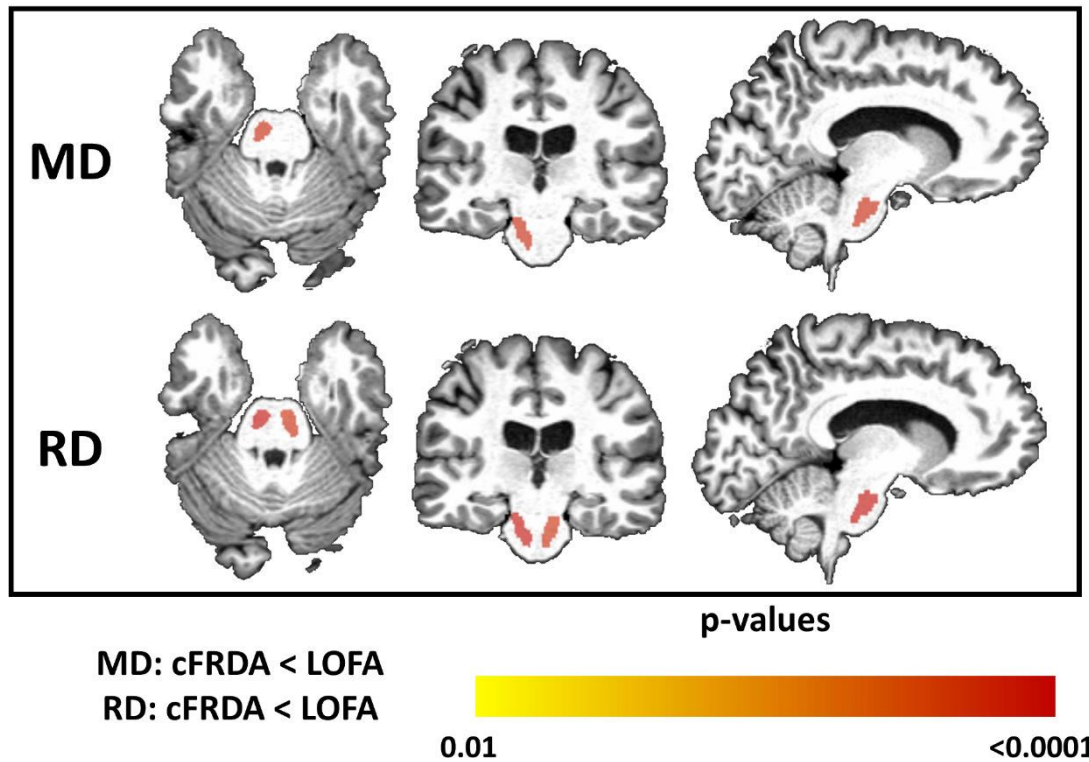


Figura 14: Estudo 2 - **Figure 5:** Structural differences between cFRDA and LOFA patients. The yellow-red scale shows structures more severely altered in the LOFA group. All results were corrected for multiple comparisons using the Dunn-sidak test. The effects of age and gender were regressed in the model.

PCA – Combined Information of All Approaches

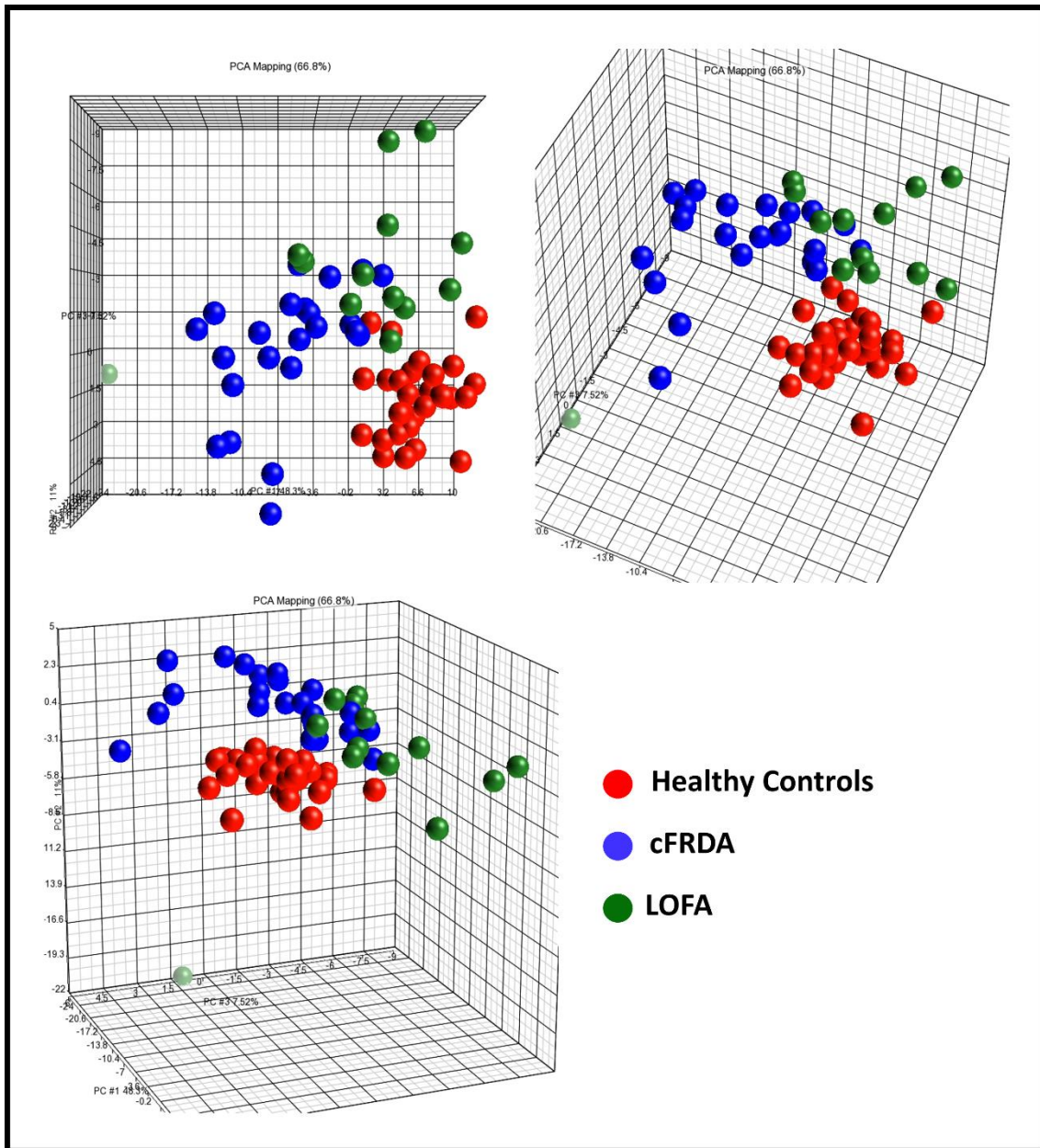


Figura 15: Estudio 2 - Figure 6: PCA plot with features selected by the group comparisons, colored by diagnosis.

Tables Legends

Table 1: Clinical, demographic and genetic data of patients

Table 2: Results of FreeSurfer analyses showing significant cortical thinning in patients with cFRDA and LOFA when compared to healthy controls. Results are corrected for multiple comparisons (Dunn-Sidak) and linearly regressed for age and gender.

Figure Legends

Figure 1: Study design.

Figure 2: Results of ROI-based analyses using T1 multi-atlas approach to assess deep GM. The cFRDA and LOFA patients were compared to healthy controls. All results were corrected for multiple comparisons, using Dunn-Sidak test, and the measures were linearly regressed to age, gender and total intracranial volume.

Figure 3: Results of DTI multi-atlas approach showing areas of reduced fractional anisotropy (FA), mean diffusivity (MD) and radial diffusivity (RD) in patients with cFRDA and LOFA after comparison with controls. Effects of age and gender were removed and all results were corrected for multiple comparisons using Dunn-Sidak test.

Figure 4: Structural differences between cFRDA and LOFA patients. The yellow-red scale shows structures more severely altered in the cFRDA group. All results were corrected for multiple comparisons using the Dunn-sidak test. The effects of age and gender were regressed in the model.

Figure 5: Structural differences between cFRDA and LOFA patients. The yellow-red scale shows structures more severely altered in the LOFA group. All results were corrected for multiple comparisons using the Dunn-sidak test. The effects of age and gender were regressed in the model.

Figure 6: PCA plot with features selected by the group comparisons, colored by diagnosis.

Estudo 3: Investigação do acúmulo de ferro cerebral em pacientes com FRDA

Cálculo Automatizado dos Tempos de Relaxação Transversal: Identificação de Depósitos de Ferro no Cérebro

Thiago Junqueira R. Rezende, Alberto Rolim M. Martinez, Ingrid Faber, Karen Girotto, José Luiz Pedroso, Orlando G. Barsottini, Iscia Lopes-Cendes, Fernando Cendes, Marcondes C. França Jr.

RESUMO

O acúmulo de ferro em regiões cerebrais possui um papel fundamental na fisiopatologia de muitas doenças neurodegenerativas; pode-se citar como exemplo a ataxia de Friedreich, doença de Parkinson e Esclerose Múltipla. Desta forma, a identificação e a quantificação de áreas com depósito de ferro torna-se necessária. Dentre as metodologias usadas para isso, a relaxometria T2 ou T2* assume um importante papel nesta tarefa. O problema com estas técnicas é o fato de não serem automatizadas. O presente estudo possui como objetivo principal desenvolver uma metodologia automática para o cálculo dos tempos de relaxação transversal de modo a identificar depósitos de ferro cerebral na ataxia de Friedreich.

Palavras Chaves: MRI, Relaxometria, Depósito de Ferro, Ataxia de Friedreich

INTRODUÇÃO

As imagens de ressonância magnética (MRI), sobretudo as imagens ponderadas em T2 ou T2* (tempo de relaxação transversal) e T1 (tempo de relaxação longitudinal), são importantes ferramentas de investigação de doenças e, também, de investigação do funcionamento do cérebro humano. Particularmente, as imagens ponderadas em T2 ou T2* podem revelar alterações relacionadas à deposição de ferro em doenças neurodegenerativas (Haacke et al., 2005).

O ferro é armazenado no sistema nervoso central, em grande parte, na forma de ferritina, e assim supre a necessidade dos oligodendrócitos na formação e sustentação da bainha de mielina (Todorich et al., 2009). Dado que

o ferro não-heme é paramagnético (Schenck, 1992), ele produz uma forte diferença de susceptibilidade local que leva à uma diminuição do T2 ou T2* (Fukunaga et al., 2010). Estudos prévios têm demonstrado uma relação linear entre as medidas de T2* e a concentração de ferro depositado sobre uma área (Langkammer et al., 2010). Alguns exemplos de doenças que vêm sendo relacionadas ao acúmulo de ferro são: Parkinson (Mittal et al., 2009), Esclerose Múltipla (Haacke et al., 2009a), Alzheimer (Stankiewicz et al., 2007) e ataxia de Friedreich (Pandolfo, 2003).

Na ataxia de Friedreich, a expansão da repetição de GAA no primeiro intron do gene *FXN* (Pandolfo, 2003) resulta em uma expressão reduzida de uma proteína mitocondrial envolvida na montagem do aglomerado de proteínas ferro-enxofre (ISPs, *iron-sulphur cluster proteins*) e na proteção da mitocôndria do dano oxidativo mediado por ferro (Gakh et al. 2006). A formação do ISP defeituoso leva à deficiência da cadeia respiratória resultando em acúmulo mitocondrial de ferro instável (Rotig et al. 1997; Delatycki et al. 1999), e em seguida leva a um dano oxidativo em células no cérebro, coração e glândulas endócrinas. Contudo, o papel patofisiológico do acúmulo de ferro mitocondrial no dano oxidativo encontrado em pacientes com ataxia de Friedreich é desconhecido (Pandolfo, 2003; Delatycki et al. 1999; Bonilha da Silva et al., 2014).

As principais técnicas de neuroimagem que identificam e quantificam o acúmulo de ferro no cérebro são a relaxometria, dada pela quantificação dos mapas de T2 e T2*, e a técnica de QSM (Quantitative Susceptibility Mapping), que é feita através da quantificação de mapas de susceptibilidade magnética. As imagens ponderadas em T2 e T2* possuem uma boa sensibilidade na detecção de depósitos de ferro com alta resolução espacial e podem abarcar todo o córtex. Contudo, tais imagens são muito susceptíveis a artefatos provenientes do campo estático B0 (Cohen-Adad, 2014).

As técnicas baseadas em susceptibilidade magnética possuem maior sensibilidade aos depósitos de ferro quando comparadas às técnicas de relaxometria e são menos influenciadas pelo ambiente microscópico que envolve a região de acúmulo de ferro (Lotfipour et al., 2012). Porém, a grande limitação da técnica de QSM está associada à limitação física de aplicação da técnica,

uma vez que esta só pode ser realizada na região de gânglios da base. O motivo pelo qual isso acontece está associado ao aparecimento de artefatos gerados pela alta diferença de susceptibilidade magnética nas outras regiões (ex. interface ar-tecido). Portanto, avaliando por este aspecto, a técnica de QSM apresenta uma limitação significativa e, assim, um aperfeiçoamento da quantificação de depósitos de ferro por relaxometria T2 ou T2* talvez seja a melhor abordagem para estudo dos depósitos de ferro. No entanto, ambas ainda são técnicas manuais que necessitam de muito tempo para execução e são dependentes da habilidade e experiência do usuário em diversas etapas do processamento.

Desta forma, consideramos que o desenvolvimento de uma metodologia de imagem com uma abordagem “volumétrica” (whole-brain) e automática seria bastante oportuna a fim de aumentar a reprodutibilidade e acurácia das medidas, bem como diminuir o tempo de cálculo dos parâmetros. Estas são vantagens importantes, sobretudo considerando a possibilidade de uso da quantificação do ferro como um biomarcador para estudos longitudinais, conforme sugerido por Bonilha da Silva et al., 2014. Além disso, em sua grande maioria, os estudos de deposição de ferro no cérebro acabam restritos à região de gânglios da base, com pouca exploração de regiões corticais e cerebelares devido a limitações nas técnicas empregadas. Atualmente existem fortes evidências de que algumas patologias, tais como a ataxia de Friedreich e a Esclerose Múltipla, possuem depósitos de ferro no núcleo denteado no cerebelo e no córtex motor, respectivamente, (Boddaert *et al.*, 2010; Rumzan *et al.*, 2013). Tais evidências reforçam a necessidade do desenvolvimento de uma técnica que possibilite a avaliação destas áreas. Por conseguinte, propomos a elaboração de uma ferramenta automática que use os conceitos de mudança das taxas de relaxação para identificar o acúmulo de ferro em regiões cerebelares e corticais.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Desenvolver uma ferramenta computacional, baseada em imagens de ressonância magnética ponderadas em T2, que identifique possíveis regiões de acúmulo de ferro no cérebro e cerebelo.

Objetivos Específicos

- Implementação das sequências de gradiente-eco e spin-eco no scanner do Laboratório de Neuroimagem da Unicamp de modo que cada volume da aquisição seja um eco;
- Determinação e implementação do melhor método de cálculo dos tempos de relaxação a partir de imagens segmentadas automaticamente (ajuste linear ou não-linear);
- Implementação do software;
- Identificar possíveis regiões de acúmulo de ferro no cérebro e cerebelo em pacientes com ataxia de Friedreich.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção dos voluntários/imagens

Para desenvolvimento e validação da ferramenta, foram selecionados voluntários adultos (>18anos), saudáveis, sem enfermidades neurológicas ou antecedentes de ataxia, para realização de exames de RM. Posteriormente, incluímos um grupo de pacientes seguidos no ambulatório de Neurogenética e Neurologia do HC-Unicamp, com diagnóstico confirmado por teste molecular de ataxia de Friedreich (FRDA). Este último grupo será importante para a demonstração da utilidade prática do método. Os pacientes com FRDA tiveram a severidade da doença quantificada por meio da escala FARS (*Friedreich's Ataxia Rating Score*) (Subramony et al., 2005), dados clínicos como início da doença, idade, duração da doença e quantificação dos tripletos de GAA, longo e curto, também foram adquiridos.

Foram excluídos indivíduos com quaisquer contraindicações para a realização do exame, aqueles cujas imagens apresentem artefatos significativos de movimento, e/ou que venham fazendo uso de medicamentos que interfiram com o metabolismo do ferro (sulfato ferroso, quelantes).

Estudo de Imagem

Aquisição

As aquisições das imagens de ressonância magnética serão realizadas em um equipamento de 3 Teslas Achieva (Philips, Holanda). Será utilizada uma bobina padrão de cabeça com 32 canais com capacidade para aplicar a técnica SENSE. Os cortes serão orientados paralelamente à linha que vai da comissura anterior à posterior. Os seguintes parâmetros serão utilizados:

- Sequência Turbo Spin Eco (3D) combinada com aquisição multiplanar *GRASE* (definida pela Philips para reduzir o tempo de exame) será adquirida para a construção do mapa de T2, com 5 ecos TE = 28 ms, TR = 500 ms, ângulo de flip igual a 90° e resolução espacial de 1 x 1 x 1 mm³ com FOV de 240 x 240 x 180 mm³.
- Sequência *Gradiente Eco* (3D) será adquirida para a construção do mapa de T2*, com 5 ecos, TE = 2,3/4,6 ms, TR = 25 ms, ângulo de flip igual a 15°, resolução espacial de 1 x 1 x 1 mm³ com FOV de 240 x 240 x 180 mm³.
- Sequência T1 volumétrica (3D) do crânio: espessura entre os cortes de 1 mm, TE = 3,2 ms, TR = 7,1 ms, ângulo de excitação (*flip angle*) 8°, voxels isotrópicos de 1,0 x 1,0 x 1,0 mm³ e FOV = 240 x 240 x 180 mm³.

Foram adquiridos dois tipos de imagens para identificar os depósitos de ferro, imagens ponderadas em T2 e T2* (a diante será explicada a diferenças entre elas). Além disso, uma imagem T1 anatômica de alta resolução foi feita para corrigir o movimento da cabeça entre os ecos, fazer o skull-strip (retirada de todo tecido que não for cerebral ou cerebelar) e identificação das estruturas anatômicas.

*Relaxometria T2 e T2**

Quando uma amostra biológica é posta em contato com um campo magnético estático e é excitada por um pulso de radiofrequência (RF), próximo à frequência de Larmor (ω_0), os prótons das moléculas de água reemitem um sinal de RF que é capturado pelas bobinas de RF do equipamento de ressonância. Devido às interações entre os spins, as quais induzem defasagem entre eles (relaxação spin-spin), a amplitude do sinal de ressonância decai com o tempo seguindo uma exponencial (Eq. 1):

$$S(TE) \sim S_0 \cdot \exp(-t/T_2) , \quad (1)$$

onde t é o tempo depois da excitação e T_2 é o tempo de relaxação transversal. No caso real, T_2 é influenciado por outros fatores tais como deslocamento químico e elétrons de átomos que não sejam o hidrogênio. Além disso, inomogeneidades do campo estático B_0 também induzem defasagem dos spins e, assim, o decaimento do sinal fica ainda mais rápido. O tempo de relaxação efetivo ou aparente, T_2^* , leva em consideração esses fatores. Desta forma, T_2 e T_2^* estão relacionados seguindo a seguinte equação matemática:

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{\gamma}{2\pi} \cdot \Delta B_{inom} , \quad (2)$$

onde γ é a razão giromagnética (rad/sT) e ΔB_{inom} descreve a amplitude da inomogeneidade de campo para um dado voxel (T). Em muitas publicações, ao invés de usar o tempo T_2^* , costuma-se usar a taxa de relaxação efetiva ou aparente R_2^* , dada por:

$$R_2^* = \frac{1}{T_2^*} . \quad (3)$$

Portanto, T_2^* pode ser estimado segundo a equação 1, trocando T_2 por T_2^* . Nessa equação, S_0 representa a amplitude máxima do sinal (antes do decaimento) e depende da densidade de prótons e alguns parâmetros de aquisição da imagem, como por exemplo, o ângulo de *flip*. A influência das inomogeneidades de campo na imagem é uma consequência da relação entre o tamanho do voxel e a extensão das inomogeneidades de campo (Yablonskiy and Haacke, 1994). Estas inomogeneidades são advindas da diferença de susceptibilidade magnética entre os tecidos (cuja extensão dificilmente é maior que um voxel) ou advindas de distorções macroscópicas nas linhas de campo por efeitos de borda (ar-tecido) ou objetos ferromagnéticos (próteses). Este último tipo causa um aumento do decaimento do sinal nas imagens de gradiente-eco e, então, um decréscimo aparente no T_2^* (Yablonskiy and Haacke, 1994).

É muito importante entender a diferença do tempo T_2^* para o sinal ponderado por T_2^* . Este último representa a magnitude do sinal para um dado

tempo ao eco (Figura 1). Além disso, o sinal ponderado em T_2^* depende do ângulo de *flip*, da sensibilidade da bobina, e dos parâmetros usados na FFT (Fast Fourier Transform) para formação da imagem, entre outros. Com isto, o sinal ponderado por T_2^* é tomado como uma medida relativa, a qual pode ser útil para detectar características anatômicas ou patológicas para uma avaliação qualitativa do manto cortical (Barbier *et al.*, 2002). Portanto, para uma análise quantitativa e, por sua vez, mais robusta, as medidas do tempo T_2^* são usadas. Formalmente, T_2^* corresponde ao instante em que sobra 37% do sinal inicial para $TE=0$ (Figura 1). Contudo, é importante ter em mente que mesmo T_2^* sendo uma grandeza física, ela é dependente de inhomogeneidades de campo macroscópicas e, por isso, deve ser analisada com cuidado.

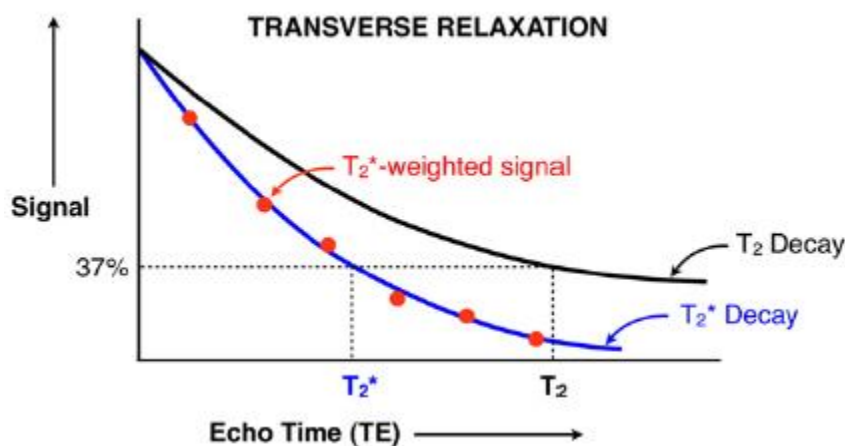


Figura 16: Estudo 3 - **Figura 1:** Curvas de decaimento do sinal de ressonância relacionadas à relaxação transversal com constantes de tempo T_2 e T_2^* (Cohen-Adad *et al.*, 2014)

As imagens ponderadas por T_2^* são adquiridas usando uma sequência de gradiente-eco, bem como as imagens ponderadas por T_2 são adquiridas usando sequências spin-eco. Estas imagens podem ser 2D ou 3D. Em geral, sequências 2D possuem rápida aquisição, enquanto as 3D possuem alta SNR (Signal-to-Noise Ratio, relação sinal-ruído) e voxels isotrópicos. Isto ocorre pois, as sequências 2D são adquiridas com um *gap* entre as fatias para evitar uma sobreposição das mesmas à custa da diminuição da SNR e introdução de um componente T_1 na ponderação da imagem.

O decaimento T_2/T_2^* começa depois que a excitação é cessada e progride com o tempo. Quanto maior o TE, menor o sinal. Desta forma, para se ter uma boa estimativa de T_2/T_2^* deve-se amostrar o sinal ponderado por T_2/T_2^* ao longo de todo o decaimento da curva. Tipicamente são adquiridos de 4 a 8 ecos para um ajuste mono-exponencial. A quantidade de ecos é altamente dependente da região escolhida para se quantificar o T_2/T_2^* (susceptibilidade) e da intensidade do campo magnético do *scanner*. Ecos tardios devem ser evitados por possuírem uma grande contribuição de ponderação por T1.

Com relação ao ângulo de *flip*, valores pequenos deste ângulo fazem com que a magnetização longitudinal permaneça muito próxima ao estado antes da excitação, o que leva a uma baixa contribuição da ponderação por T1. Alternativamente, um grande TR pode também reduzir efeitos de T1, mas à custa de aumento no tempo de aquisição. Portanto, a ponderação por T_2/T_2^* pode ser alcançada usando um pequeno ângulo de *flip*, TE da ordem de T_2/T_2^* e TR longo.

A escolha da resolução espacial está intimamente ligada à SNR, bem como ao tempo de *scan*. O uso de voxels isotrópicos é altamente recomendado uma vez que voxels anisotrópicos são fortemente dependentes de inhomogeneidades de campo e volume parcial na direção das fatias (Yablonskiy and Haacke, 1994).

A estimativa dos T_2/T_2^* , de modo geral, de um ajuste mono-exponencial baseia-se no ajuste da curva seguindo a equação 2. Há vários métodos para realizar este ajuste, o mais simples e também mais rápido é um simples ajuste linear do $\ln(S_{\text{corr}})$ versus TE usando o método dos mínimos quadrados (OLS). Outros métodos mais robustos que dependem menos da variância entre os ecos são mais recomendados, por exemplo o método dos mínimos quadrados generalizado (GLS). Porém, para um ajuste mono-exponencial, o método mais recomendado consiste no ajuste do S_{corr} versus TE usando um *fitting* de mínimos quadrados exponencial não-linear (NLLS) (Hagberg *et al.*, 2002).

Desenvolvimento do software

Pré-processamento

O pré-processamento realizado consiste na confecção da máscara usada no *skull-stripping* das imagens ponderadas em T2/T2* por meio da imagem T1 anatômica de alta resolução. Para tal, a imagem T1 é segmentada em GM, WM e CSF usando algoritmos do software SPM12 (<http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/software/spm12/>) (Ashburner and Friston, 2000). Após a segmentação, os mapas têm as intensidades normalizadas, somados e suavizados usando um filtro gaussiano com kernel de 3 mm para retirar pontos de singularidades, gerando, assim, a máscara do *skull-stripping*. Por fim, essa máscara será multiplicada no mapa de T2/T2* que será calculado (Figura 2).

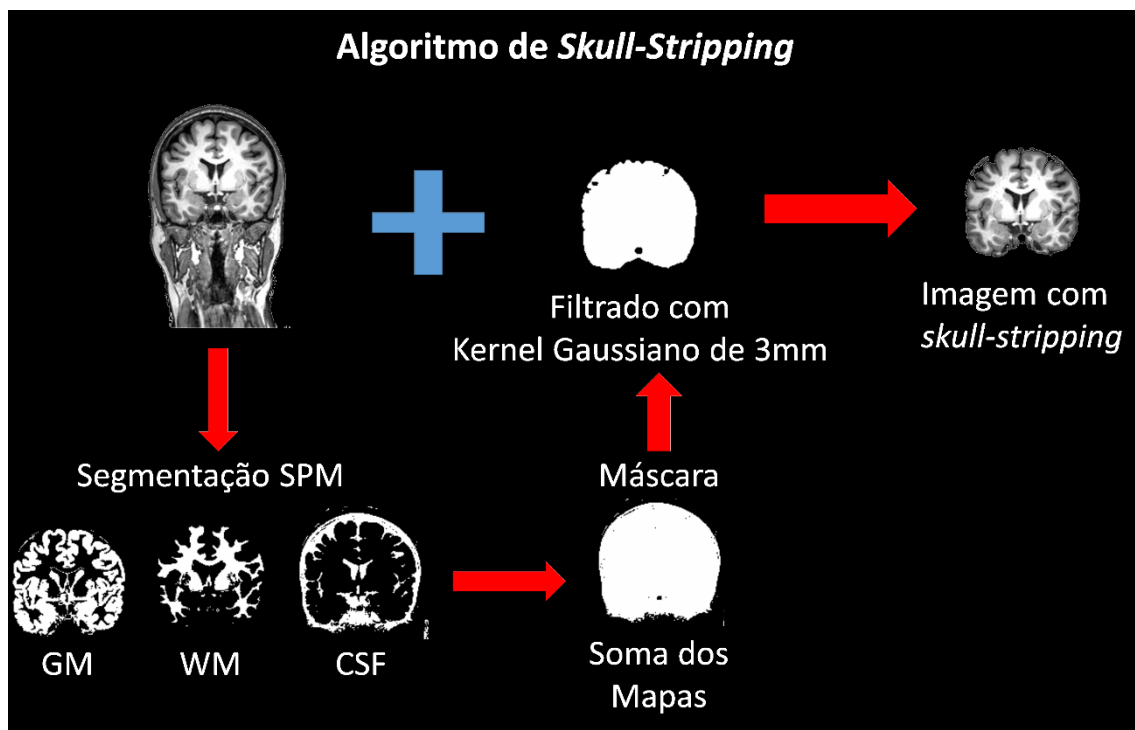


Figura 17: Estudo 3 - Figura 2: Etapas realizadas no pré-processamento das imagens, segmentação e *skull-stripping*.

Quantificação dos Tempos de Relaxação

As quantificações dos tempos de relaxação podem ser feitas usando um ajuste linear ou não-linear. No primeiro modelo é feito uma linearização da equação 1 que fica da seguinte forma:

$$\ln(S_{corr}) = S_0 - \frac{t}{TE} \quad (4)$$

O ajuste então é feito usando o método dos mínimos quadrados. O não linear é feito ajustando uma curva mono-exponencial nos dados através de um *fitting* de mínimos quadrados exponencial não-linear conforme sugerido por Hagberg *et al.* (2002). Todos estes ajustes foram feitos usando o software Matlab R2014b através das funções 'polyfit' (<https://www.mathworks.com/help/matlab/ref/polyfit.html>) e 'fit' (<https://www.mathworks.com/help/curvefit/fit.html>) que estão disponíveis para uso nos laboratórios de Neuroimagem e Física Médica da Unicamp. No entanto, antes que qualquer cálculo seja feito, primeiramente, um alinhamento de todos os ecos com a imagem T1 anatômica de alta resolução que foi adquirida juntamente com as sequências spin eco e gradiente eco para corrigir o movimento da cabeça. Além disso, este passo garante que todos os volumes estejam com a mesma orientação e que, portanto, uma mesma coordenada (x,y,z), em cada um dos ecos, represente o mesmo ponto ao longo dos ecos. Correções para inomogeneidades de campo e distorções geométricas são feitas na própria máquina com algoritmos da Phillips.

Normalização Espacial

Este passo é fundamental na estatística dos dados, sobretudo na implementação da análise baseada em voxel (VBA, *voxel-based analysis*). Este método de análise estatística é muito interessante por analisar todo o cérebro, possibilitando identificar de maneira precisa a localização espacial do dano encontrado e por permitir monitorar as mudanças anatômicas de cada voxel. O VBA é baseado na hipótese que haja uma correspondência entre os cérebros dos indivíduos o que só é alcançado quando os cérebros estão no mesmo espaço.

A normalização espacial, então, consiste em levar ou coregistrar todos os cérebros para um espaço padrão que usualmente é o MNI, o qual será usado nesse trabalho. A normalização também é feita por meio de um algoritmo disponível no *software* SPM12. Para realizar tal procedimento, nós usamos a imagem T1 anatômica para fornecer o alinhamento do *template* de normalização (MNI) e também por fornecer mais informação no registro. Então, a matriz de transformação calculada entre a imagem T1 e o *template* é aplicada na imagem

com os tempos de relaxação usando uma interpolação do tipo trilinear (Figura 3).

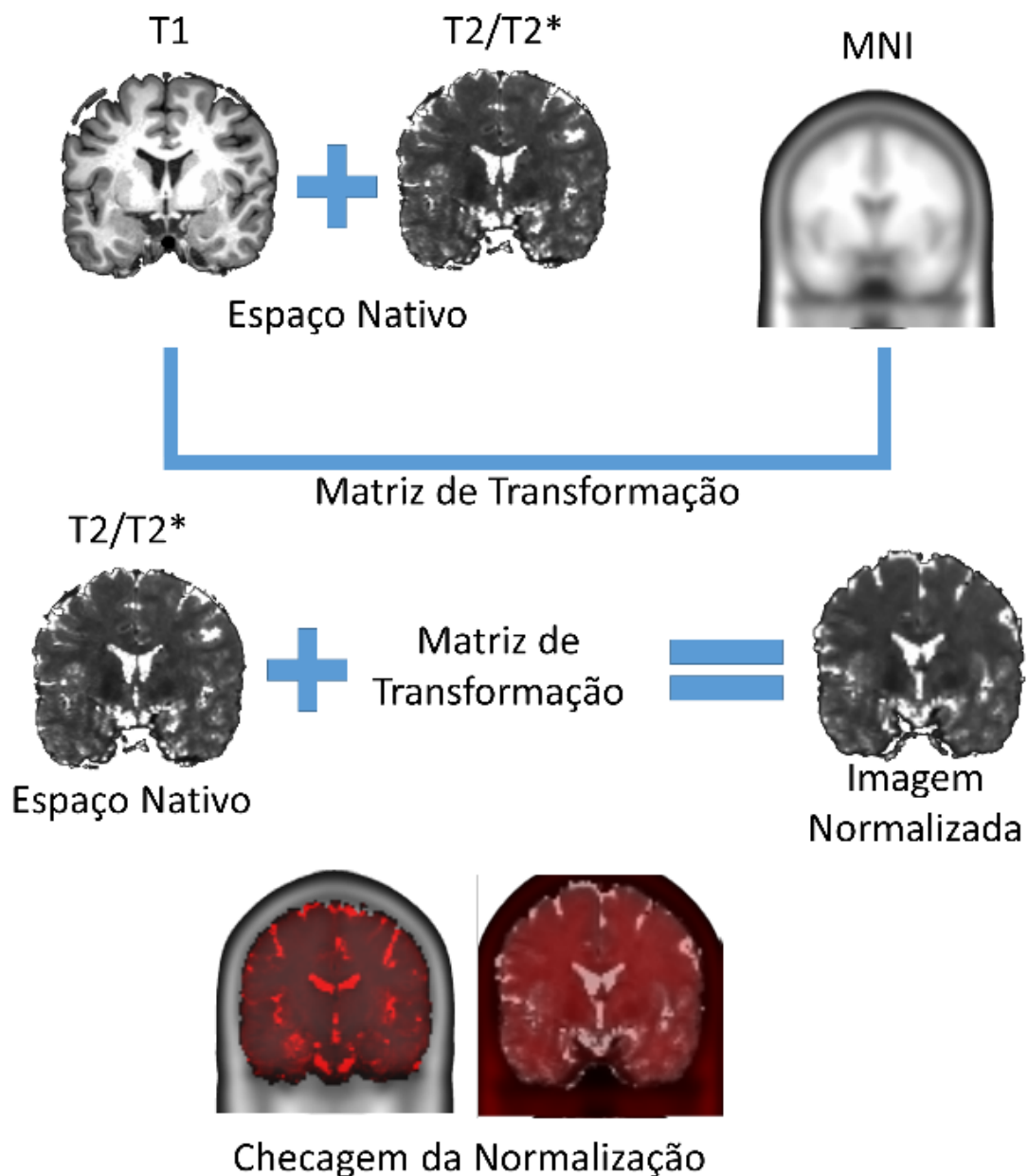


Figura 18: Estudo 3 - **Figura 3:** Algoritmo de normalização espacial dos mapas de T2/T2*.

Extração dos Dados

A extração dos tempos de relaxação para cada estrutura anatômica também é de suma importância, pois nos habilita a fazer análises estatísticas, de fato, quantitativas e, também, aumentar o poder estatístico da mesma devido a diminuição do ruído na medida e o número de múltiplas comparações nas

análises. Este tipo de abordagem é conhecido como análise estatística baseada em ROI (Região de Interesse).

As regiões de interesse, no nosso caso, são as estruturas anatômicas do cérebro. Para obtê-las, nós utilizamos *softwares* que segmentam e identificam tais estruturas automaticamente. Neste trabalho nós usamos o FreeSurfer (<https://surfer.nmr.mgh.harvard.edu/fswiki/FreeSurferWiki>). Resumidamente, as imagens são corrigidas para inomogeneidades do campo magnético, alinhadas ao atlas de Talairach e Tournoux (*Talairach and Tournoux, 1988*) e é feita a remoção de tecido não cerebral (skull-strip). Em seguida, há a segmentação dos voxels em SC, SB e liquor, os quais são identificados baseados na sua localização, na sua intensidade e na intensidade dos voxels vizinhos. Uma rede de faces de triângulos é construída em torno da superfície de WM, onde cada voxel é caracterizado por 2 triângulos. A rede, por sua vez, é suavizada usando um algoritmo que leva em consideração a intensidade local na imagem original (*Dale and Sereno, 1993*), para uma resolução subvoxel, usando interpolação trilinear. A fim de garantir que a superfície possui as mesmas propriedades topológicas de uma esfera, os defeitos topológicos (buracos na superfície) são corrigidos (*Fischl et al., 2001*). Neste sentido, uma representação mais realística da interface entre GM e WM é necessária. Portanto, uma segunda interação de suavização é aplicada produzindo, assim, uma superfície chamada *White Surface*. Neste contexto, a superfície cortical externa, a qual compreende a *pia mater*, é produzida empurrando (*nudging outwards*) a *White Surface* rumo a *pia mater* em um ponto onde o contraste do tecido é máximo (*Fischl and Dale, 2000*). Esta superfície recebe o nome de *pial surface*. Essa superfície é, então, segmentada em pequenas regiões neuroanatômicas, segundo *Desikan et al. 2006*, usando um processo automatizado proposto por *Fischl et al., 2004*. Para isto, a *pial surface* é mapeada homeomorficamente (*homeomorphically 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 correspondidos à um atlas de probabilidades. Com isso, por meio de um processo de segmentação Bayesiano, é atribuída para cada vértice uma marcação neuroanatômica que, por sua vez, possuem seus rótulos confrontados

com relação à atribuição de seus vizinhos utilizando, para isto, um algoritmo de Campos Aleatórios de Markov (*Fischl et al., 2002, 2004*).

Após o processamento acima descrito, obtemos o atlas de segmentação do indivíduo, o qual já está alinhado com a imagem T1 e, por conseguinte, com a imagem dos tempos de relaxação. Portanto, cada estrutura do atlas de segmentação é usada como máscara e multiplicada nos mapas de T2/T2*, isolando a estrutura na imagem original. Os valores são extraídos e uma média é feita, porém só são contabilizados, tempos de relaxação abaixo de 80 ms, valores acima são tomados como sendo CSF (Cohen-Adad, 2014). Os dados são salvos na forma de tabela (Figura 4).

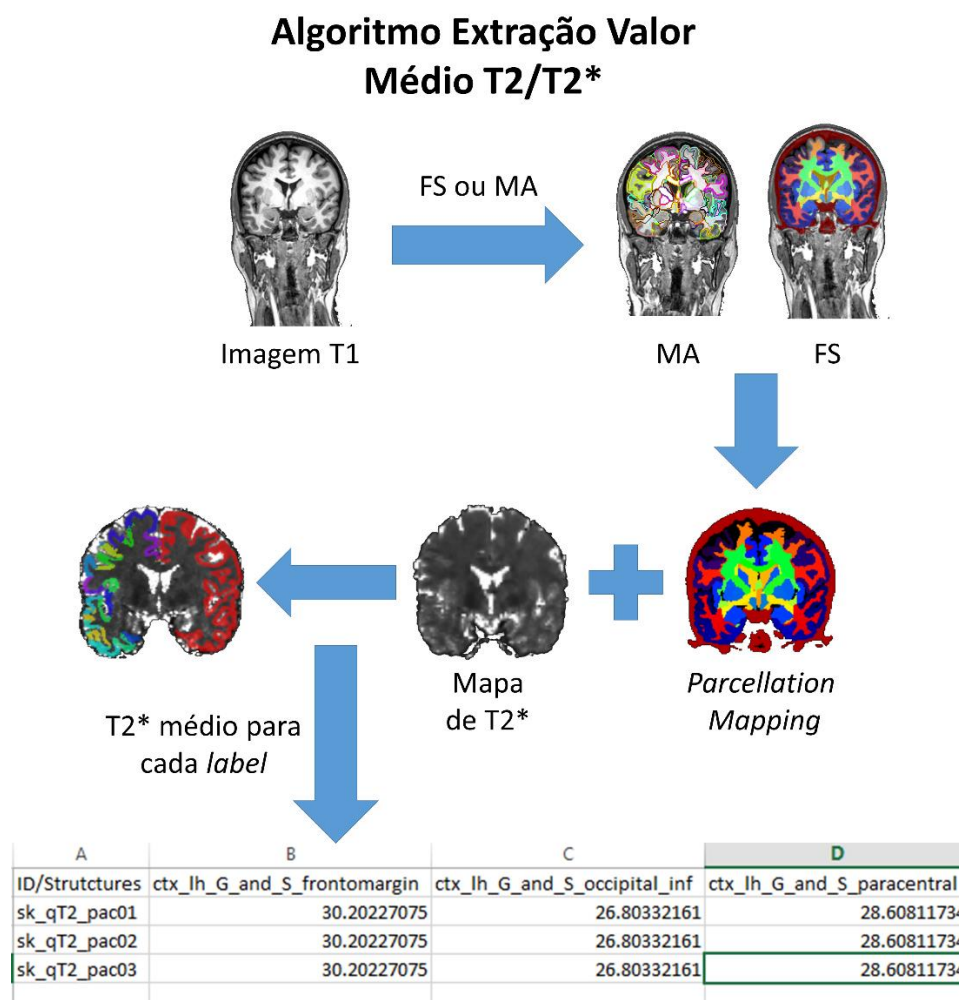


Figura 19: Estudo 3 - **Figura 4:** Algoritmo de extração dos tempos T2/T2* médios para as estruturas anatômicas.

O mesmo procedimento acima descrito foi feito para extrair os tempos T2* médios de regiões do cerebelo. Para tal, foi usado o mapa de parcelamento obtido pelo CERES (<http://volbrain.upv.es/index.php>). O CERES é uma ferramenta dedicada a segmentação automatizada do cerebelo em regiões anatômicas (Romero et al., 2017). Resumidamente, o pré-processamento é feito redução do ruído da imagem, correção para inomogeneidades de campo no espaço nativo, alinhamento das imagens como o MNI via registro *affine*, correção para inomogeneidades de campo no espaço do MNI, redução da dimensionalidade da imagem para a área do cerebelo, registro não-linear com um atlas de cerebelo para melhorar o alinhamento da imagem com os atlas de segmentação, normalização da intensidade de cinza, alinhamento não-linear com os atlas de segmentação e, por fim, a identificação das estruturas anatômicas (Romero et al., 2017). A identificação das estruturas é feita por um algoritmo que combina a segmentação de referência dos atlas para formar a segmentação correta (Coupé et al., 2011, Romero et al., 2017).

Análise Estatística

Para avaliar diferenças nos tempos de relaxação T2* dos grupos, nós utilizamos o teste ANOVA e, além disso, foram removidos efeitos de idade e gênero das análises. O VBA foi feito no SPM usando as imagens normalizadas e para corrigir efeitos de múltiplas comparações foi utilizado o teste FWE (*Family-wise error*) com alfa sendo 0,05. Em contrapartida, a análise baseada em ROI foi feita usando um código desenvolvido por mim e que será anexada na versão final do programa (Anexo II). Para corrigir efeitos de múltiplas comparações foi utilizado o teste de Bonferroni, tomando alfa 0,05.

RESULTADOS

Aquisição das Imagens

Durante o período de referência do trabalho foram avaliados 21 pacientes e 32 controles, na Tabela 1 estão descritos os dados demográficos dos dois grupos. A avaliação dos pacientes consiste na aplicação da escala FARS e, por fim, o exame de ressonância magnética que já foi descrito nos métodos desta tese. Infelizmente, 6 pacientes se recusaram a participar da pesquisa durante o

período de referência do trabalho por diversos motivos, são eles: depressão, mal-estar, claustrofobia e dificuldades logísticas de transporte.

Tabela 9: Estudo 3 - **Tabela 1:** Dados Demográficos

	FRDA (n=21)	Controles (n=32)	p-valor
Idade (média±SD, anos)	38,1 ± 11,0	34,3 ± 14,7	0,283 **
Gênero (H/M)	10/11	11/21	0,397 *
Início (média±SD, anos)	23,1 ± 7,3	-	-
Duração (média±SD, anos)	19,0 ± 11,8	-	-
GAA₁	1063 ± 287	-	-
GAA₂	899 ± 194	-	-
FARS (média±SD)	54,5 ± 26,7	-	-

*Teste de Chi-quadrado com correção de Yates

**Teste T

Qualidade das Imagens

Como proposto e descrito nos métodos deste trabalho, nós adquirimos dois tipos de imagem para poder identificar os depósitos de ferro, uma para quantificar o tempo de relaxação T2 (sequência turbo spin-eco) e outro para quantificar T2* (sequência gradiente-eco). Após a aquisição de 10 controles com as duas sequências e posterior avaliação visual das imagens obtidas (Figura 5), chegamos à conclusão que a sequência spin-eco é muito susceptível a parâmetros externos, tais como movimento da cabeça, inhomogeneidade do campo e, até mesmo, ao batimento cardíaco, o que leva a importantes artefatos nas imagens, sobretudo nos 3 primeiros ecos. Alguns destes artefatos podem ser visualizados na Figura 5. Por outro lado, a sequência gradiente-eco não demonstrou tanta sensibilidade a estes problemas e, portanto, nós optamos por excluir a sequência spin-eco e, assim, adicionar uma sequência de DTI para nos habilitar a fazer um completo estudo de imagem nesses pacientes posteriormente.

A sequência gradiente-eco foi adquirida duas vezes uma com um tempo de eco (TE) de 2,3 ms e outra com tempo de eco de 4,6 ms. Nós estamos fazendo isso, pois não temos noção da quantidade de ferro que pode estar acumulado no tecido cerebral. Ou seja, se houver acúmulo muito acentuado um TE de 4,6 pode atenuar significativamente o sinal da ressonância e não permitir que quantifiquemos o tempo de relaxação deste depósito. No entanto, ao usar

tempos de eco tão curtos e com pequenos tempos de repetição, percebe-se que a imagem sofre uma grande influência de T1 (Figura 5), principalmente nos primeiros ecos. Uma forma de minimizar estes efeitos seria reduzir o ângulo de *flip* e aumentar o TR, mas isso acarretaria em um grande aumento no tempo de aquisição. Por fim, o *software* de aquisição da Philips só permite adquirir 5 ecos para sequências 3D, porém mais ecos seria melhor.

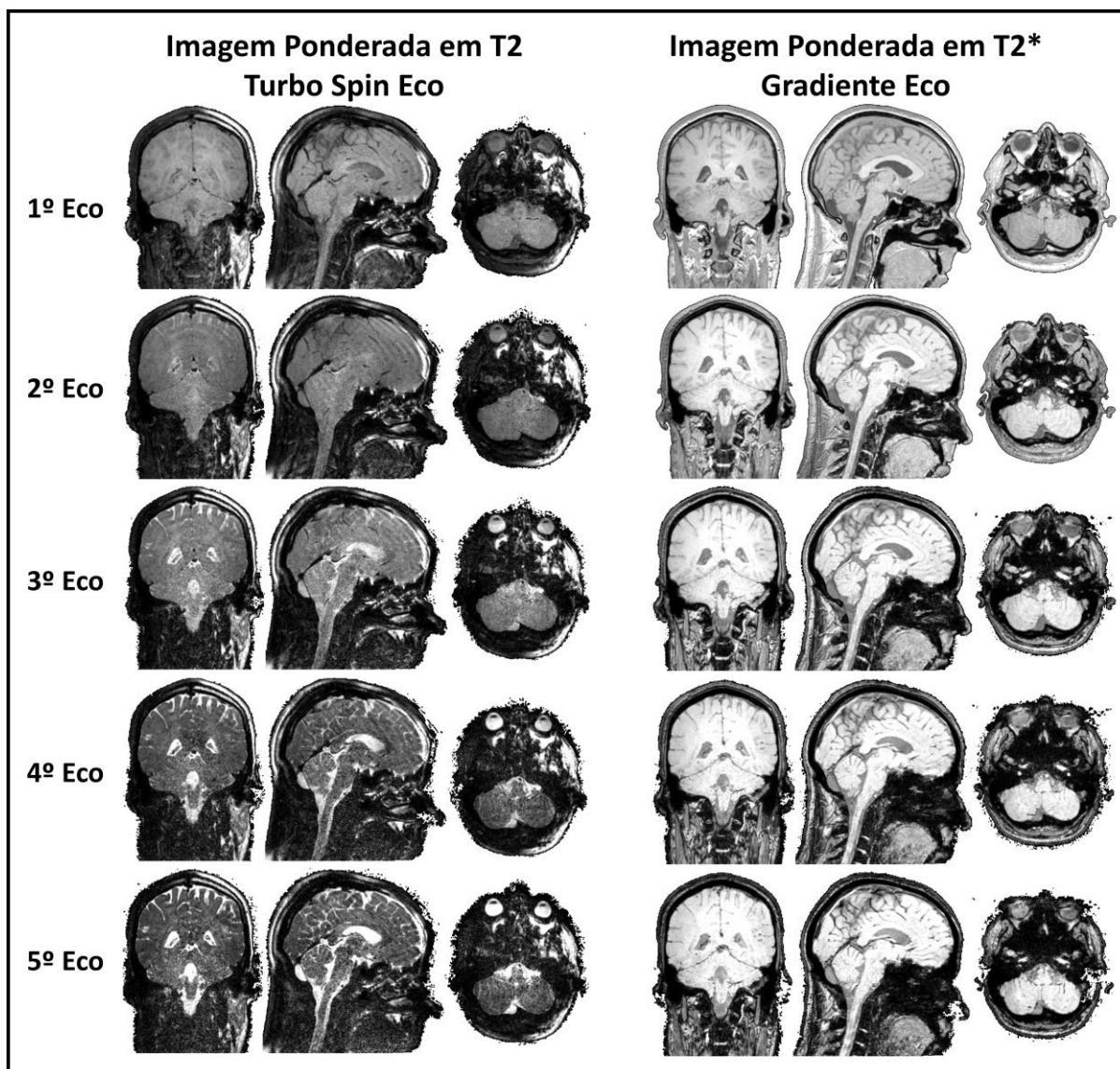


Figura 20: Estudo 3 - **Figura 5:** Imagens obtidas com a sequência spin-eco e gradiente-eco. Notar que muitos artefatos na imagem obtida pela sequência spin-eco, principalmente nos 3 primeiros ecos. Fato este que não ocorre na sequência gradiente-eco.

Cálculo dos Tempos de Relaxação

Para calcular os tempos de relaxação nós implementamos dois métodos, um linear e outro não linear, como descrito na metodologia. Há uma pequena diferença nos valores calculados para os ajustes (Figura 6). O método mais recomendado para estimar os tempos de relaxação é o ajuste não-linear (Hagberg et al., 2002), porém este método possui um custo computacional muito grande, levando cerca de 36hrs (processador com 8 núcleos i7 5ª geração de 3,3 GHz e 32 GB de memória RAM) para se efetuar o cálculo de uma imagem inteira. Enquanto isso, o ajuste linear leva cerca de 1 hora para finalizar no mesmo computador. Neste sentido, propomos usar o ajuste linear para um estudo exploratório ou para um estudo com uma doença que possui um acúmulo severo de ferro no cérebro, pois nestes casos não é necessária uma precisão tão grande na estimativa do cálculo dos tempos de relaxação. Nos demais, sugerimos usar o ajuste não-linear. Além disso, visualmente a imagem calculada com o ajuste não-linear possui um contraste um pouco melhor que a calculada pelo ajuste linear (Figura 7).

Modelos de Cálculos dos Tempos de Relaxação

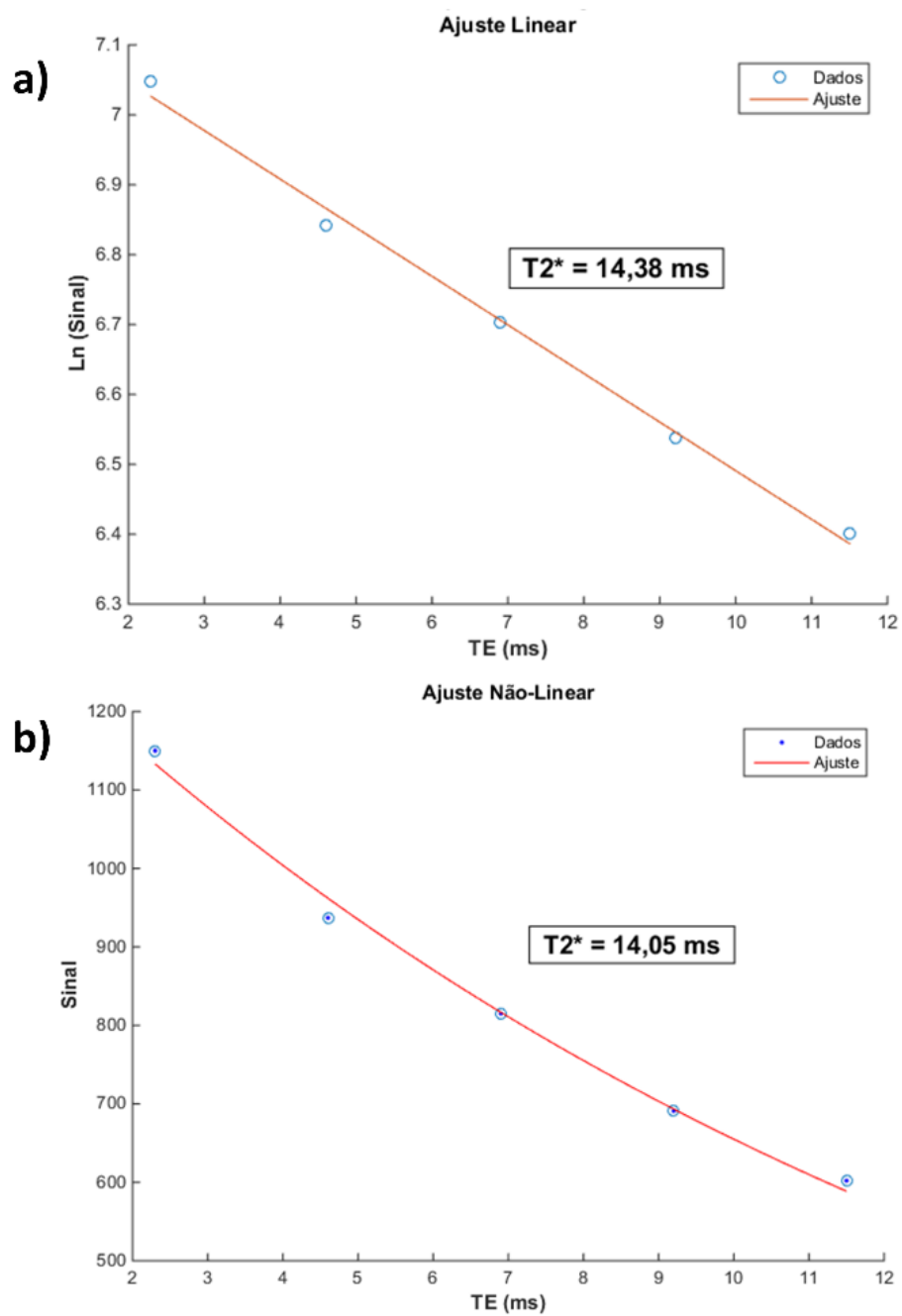


Figura 21: Estudo 3 - Figura 6: Gráfico de cálculo do tempo de relaxação para a coordenada x, y e z (99,93,202) usando um a) ajuste linear e b) não linear.

Mapas de T2*

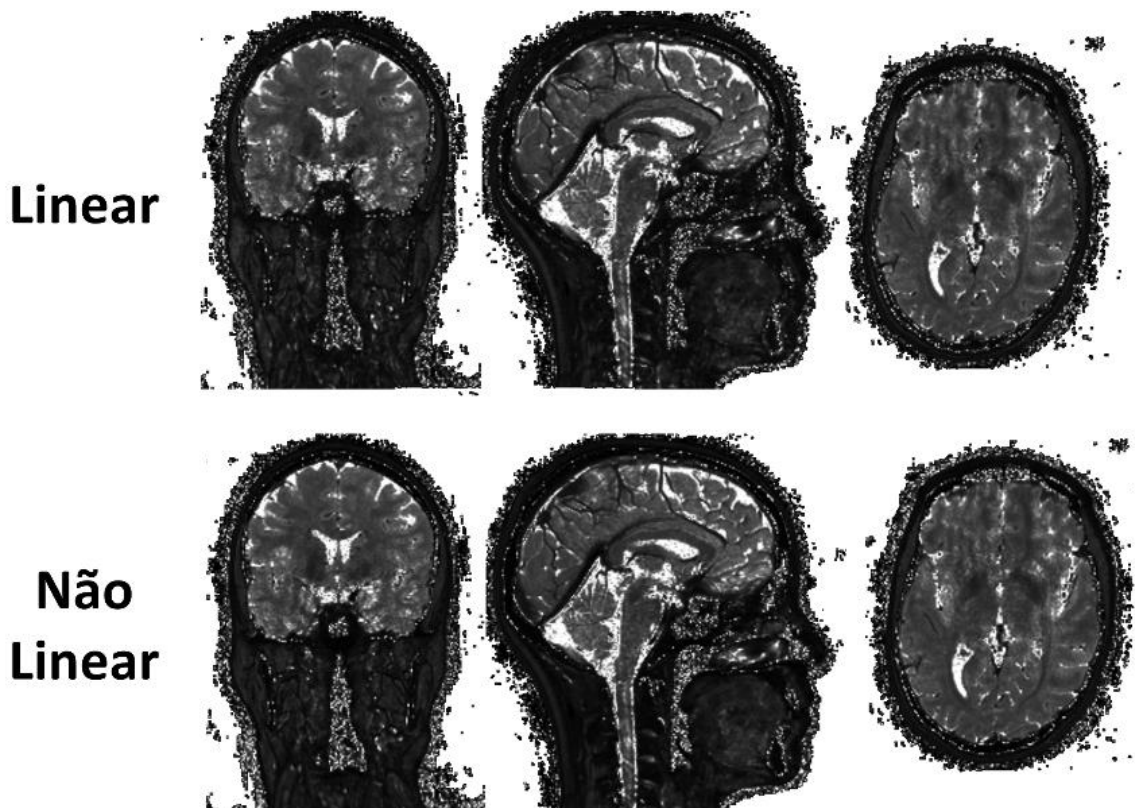


Figura 22: Estudo 3 - **Figura 7**: Imagem dos tempos de relaxação T2* para ajuste linear e não linear.

Implementação do Software

O *software* foi escrito em linguagem Matlab R2014b (The MathWorks, Inc., Natick, MA) e teve todos os seus processos automatizados. A única tarefa do usuário é escolher o tipo de regressão que ele quer, selecionar as imagens T1, as imagens gradiente ou spin-eco, seguindo o protocolo de aquisição descrito na metodologia, e selecionar a segmentação das estruturas anatômicas do cérebro que foram feitas previamente no FreeSurfer ou no MRICloud. Os processos de segmentação do SPM, *skull-stripping*, normalização espacial e extração dos dados são saídas do programa.

O programa ainda não tem uma interface gráfica, pois seria necessário um certo tempo para implementar isso e já fazer a versão final do mesmo. Além disso, o programa também não contempla um pacote estatístico, pois é algo muito complexo e trabalhoso de se implementar devido à complexidade de

análises que podem ser feitas. Contudo, o programa fornece dados para realizar qualquer tipo de estatística em programas que já são consagrados no meio. Em anexo (Anexo I) seguem as linhas de código do programa.

Identificação dos Depósitos de Ferro

Nós não fomos capazes de identificar nenhuma diferença de grupo para todas as estruturas como visto abaixo, onde estão as tabelas com os resultados das análises de grupo. Tal achado, apesar de negativo, não é desanimador, pois há somente registro de depósitos de ferro no núcleo denteado do cerebelo e não no córtex cerebral e cerebelar (Bonilha et al., 2014; Boddaert et al., 2007). Neste sentido, seria interessante desenvolver um método de segmentação do núcleo denteado do cerebelo para avaliar a redução do tempo T2* nos pacientes com ataxia de Friedreich.

Após este primeiro resultado, nós dividimos os pacientes em 2 grupos baseados no tempo de doença. O primeiro grupo, como 9 pacientes possuíam tempo de doença menor que 15 anos e o segundo com duração maior que 15 anos. Novamente não encontramos nenhum resultado significativo, reforçando a nova hipótese que os pacientes não possuem acúmulo de ferro fora do núcleo denteado (Tabelas S1 - S12).

Mesmo não encontrando nenhum resultado para pacientes com ataxia de Friedreich, o programa ficará disponível no site do laboratório para *download* e qualquer pesquisador poderá usar. O programa em si e a sequência de aquisição disponível não são específicos para ferro e podem ser usados para múltiplos propósitos, no nosso caso estamos avaliando ferro porque este metal, em específico, está envolvido na fisiopatologia da doença. Porém, a implementação de uma segmentação do núcleo denteado do cerebelo seria uma importante ferramenta para, principalmente, avaliar doenças relacionadas ao cerebelo, tais como as ataxias espinocerebelares.

Resultado da diferença de grupo da comparação entre pacientes e controles.

Tabela 10: Estudo 3 - Tabela S1: Análise de grupo para regiões do córtex cerebelar definidas pelo CERES, relaxometria-T2.

Structures	p-value	Bonferroni	FDR
Left Lobule I-II	0,350	1,000	1,000
Left Lobule III	0,595	1,000	1,000
Left Lobule IV	0,039	0,982	1,000
Left Lobule V	0,063	1,000	1,000
Left Lobule VI	0,833	1,000	1,000
Left Lobule Crus I	0,648	1,000	1,000
Left Lobule Crus II	0,366	1,000	1,000
Left Lobule VIIB	0,983	1,000	1,000
Left Lobule VIIIA	0,607	1,000	1,000
Left Lobule VIIIB	0,055	1,000	1,000
Left Lobule IX	0,355	1,000	1,000
Left Lobule X	0,416	1,000	1,000
Right Lobule I-II	0,480	1,000	1,000
Right Lobule III	0,640	1,000	1,000
Right Lobule IV	0,908	1,000	1,000
Right Lobule V	0,667	1,000	1,000
Right Lobule VI	0,558	1,000	1,000
Right Lobule Crus I	0,564	1,000	1,000
Right Lobule Crus II	0,593	1,000	1,000
Right Lobule VIIB	0,896	1,000	1,000
Right Lobule VIIIA	0,795	1,000	1,000
Right Lobule VIIIB	0,102	1,000	1,000
Right Lobule IX	0,790	1,000	1,000
Right Lobule X	0,013	0,337	1,000

Tabela 11: Estudo 3 - Tabela S2: Análise de grupo para regiões do córtex cerebral esquerdo definidas pelo FreeSurfer, relaxometria-T2.

Structures	p-value	Bonferroni	FDR
lh_G_and_S_frontomargin	0,007	0,527	0,683
lh_G_and_S_occipital_inf	0,599	1,000	1,000
lh_G_and_S_paracentral	0,074	1,000	1,000
lh_G_and_S_subcentral	0,607	1,000	1,000
lh_G_and_S_transv_frontopol	0,021	1,000	0,833
lh_G_and_S_cingul-Ant	0,293	1,000	1,000
lh_G_and_S_cingul-Mid-Ant	0,202	1,000	1,000
lh_G_and_S_cingul-Mid-Post	0,467	1,000	1,000
lh_G_cingul-Post-dorsal	0,255	1,000	1,000
lh_G_cingul-Post-ventral	0,051	1,000	1,000
lh_G_cuneus	0,094	1,000	1,000
lh_G_front_inf-Opercular	0,273	1,000	1,000
lh_G_front_inf-Orbital	0,043	1,000	1,000
lh_G_front_inf-Triangul	0,145	1,000	1,000
lh_G_front_middle	0,132	1,000	1,000
lh_G_front_sup	0,077	1,000	1,000
lh_G_Ins_Ig_and_S_cent_ins	0,653	1,000	1,000
lh_G_insular_short	0,647	1,000	1,000
lh_G_occipital_middle	0,675	1,000	1,000
lh_G_occipital_sup	0,726	1,000	1,000
lh_G_oc-temp_lat-fusifor	0,036	1,000	1,000
lh_G_oc-temp_med-Lingual	0,013	0,949	0,683
lh_G_oc-temp_med-Parahip	0,075	1,000	1,000
lh_G_orbital	0,005	0,382	0,683
lh_G_pariet_inf-Angular	0,150	1,000	1,000
lh_G_pariet_inf-Supramar	0,392	1,000	1,000
lh_G_parietal_sup	0,013	0,978	0,683
lh_G_postcentral	0,194	1,000	1,000
lh_G_precentral	0,318	1,000	1,000
lh_G_precuneus	0,038	1,000	1,000
lh_G_rectus	0,018	1,000	0,809
lh_G_subcallosal	0,399	1,000	1,000
lh_G_temp_sup-G_T_transv	0,435	1,000	1,000
lh_G_temp_sup-Lateral	0,104	1,000	1,000
lh_G_temp_sup-Plan_polar	0,609	1,000	1,000
lh_G_temp_sup-Plan_tempo	0,716	1,000	1,000
lh_G_temporal_inf	0,008	0,626	0,683
lh_G_temporal_middle	0,243	1,000	1,000
lh_Lat_Fis-ant-Horizont	0,609	1,000	1,000
lh_Lat_Fis-ant-Vertical	0,471	1,000	1,000
lh_Lat_Fis-post	0,838	1,000	1,000
lh_Pole_occipital	0,943	1,000	1,000

lh_Pole_temporal	0,002	0,170	0,683
lh_S_calcarine	0,126	1,000	1,000
lh_S_central	0,942	1,000	1,000
lh_S_cingul-Marginalis	0,114	1,000	1,000
lh_S_circular_insula_ant	0,531	1,000	1,000
lh_S_circular_insula_inf	0,256	1,000	1,000
lh_S_circular_insula_sup	0,449	1,000	1,000
lh_S_collat_transv_ant	0,792	1,000	1,000
lh_S_collat_transv_post	0,102	1,000	1,000
lh_S_front_inf	0,367	1,000	1,000
lh_S_front_middle	0,110	1,000	1,000
lh_S_front_sup	0,055	1,000	1,000
lh_S_interm_prim-Jensen	0,678	1,000	1,000
lh_S_intrapariet_and_P_trans	0,252	1,000	1,000
lh_S_oc_middle_and_Lunatus	0,782	1,000	1,000
lh_S_oc_sup_and_transversal	0,612	1,000	1,000
lh_S_occipital_ant	0,660	1,000	1,000
lh_S_oc-temp_lat	0,927	1,000	1,000
lh_S_oc-temp_med_and_Lingual	0,259	1,000	1,000
lh_S_orbital_lateral	0,409	1,000	1,000
lh_S_orbital_med-olfact	0,392	1,000	1,000
lh_S_orbital-H_Shaped	0,221	1,000	1,000
lh_S_parieto_occipital	0,039	1,000	1,000
lh_S_pericallosal	0,088	1,000	1,000
lh_S_postcentral	0,308	1,000	1,000
lh_S_precentral-inf-part	0,963	1,000	1,000
lh_S_precentral-sup-part	0,468	1,000	1,000
lh_S_suborbital	0,012	0,865	0,683
lh_S_subparietal	0,196	1,000	1,000
lh_S_temporal_inf	0,800	1,000	1,000
lh_S_temporal_sup	0,910	1,000	1,000
lh_S_temporal_transverse	0,558	1,000	1,000

Tabela 12: Estudo 3 - Tabela S3: Análise de grupo para regiões do córtex cerebral direito definidas pelo FreeSurfer, relaxometria-T2.

Structures	p-value	Bonferroni	FDR
rh_G_and_S_frontomargin	0,026	1,000	1,000
rh_G_and_S_occipital_inf	0,261	1,000	1,000
rh_G_and_S_paracentral	0,296	1,000	1,000
rh_G_and_S_subcentral	0,389	1,000	1,000
rh_G_and_S_transv_frontopol	0,285	1,000	1,000
rh_G_and_S_cingul-Ant	0,725	1,000	1,000
rh_G_and_S_cingul-Mid-Ant	0,031	1,000	1,000
rh_G_and_S_cingul-Mid-Post	0,197	1,000	1,000
rh_G_cingul-Post-dorsal	0,499	1,000	1,000
rh_G_cingul-Post-ventral	0,819	1,000	1,000
rh_G_cuneus	0,429	1,000	1,000
rh_G_front_inf-Opercular	0,587	1,000	1,000
rh_G_front_inf-Orbital	0,883	1,000	1,000
rh_G_front_inf-Triangul	0,411	1,000	1,000
rh_G_front_middle	0,816	1,000	1,000
rh_G_front_sup	0,357	1,000	1,000
rh_G_Ins_Ig_and_S_cent_ins	0,136	1,000	1,000
rh_G_insular_short	0,902	1,000	1,000
rh_G_occipital_middle	0,346	1,000	1,000
rh_G_occipital_sup	0,753	1,000	1,000
rh_G_oc-temp_lat-fusifor	0,440	1,000	1,000
rh_G_oc-temp_med-Lingual	0,726	1,000	1,000
rh_G_oc-temp_med-Parahip	0,105	1,000	1,000
rh_G_orbital	0,166	1,000	1,000
rh_G_pariet_inf-Angular	0,081	1,000	1,000
rh_G_pariet_inf-Supramar	0,055	1,000	1,000
rh_G_parietal_sup	0,722	1,000	1,000
rh_G_postcentral	0,701	1,000	1,000
rh_G_precentral	0,702	1,000	1,000
rh_G_precuneus	0,109	1,000	1,000
rh_G_rectus	0,096	1,000	1,000
rh_G_subcallosal	0,642	1,000	1,000
rh_G_temp_sup-G_T_transv	0,246	1,000	1,000
rh_G_temp_sup-Lateral	0,087	1,000	1,000
rh_G_temp_sup-Plan_polar	0,989	1,000	1,000
rh_G_temp_sup-Plan_tempo	0,884	1,000	1,000
rh_G_temporal_inf	0,966	1,000	1,000
rh_G_temporal_middle	0,146	1,000	1,000
rh_Lat_Fis-ant-Horizont	0,047	1,000	1,000
rh_Lat_Fis-ant-Vertical	0,646	1,000	1,000
rh_Lat_Fis-post	0,112	1,000	1,000
rh_Pole_occipital	0,721	1,000	1,000

rh_Pole_temporal	0,044	1,000	1,000
rh_S_calcarine	0,703	1,000	1,000
rh_S_central	0,750	1,000	1,000
rh_S_cingul-Marginalis	0,517	1,000	1,000
rh_S_circular_insula_ant	0,254	1,000	1,000
rh_S_circular_insula_inf	0,367	1,000	1,000
rh_S_circular_insula_sup	0,889	1,000	1,000
rh_S_collat_transv_ant	0,220	1,000	1,000
rh_S_collat_transv_post	0,205	1,000	1,000
rh_S_front_inf	0,796	1,000	1,000
rh_S_front_middle	0,978	1,000	1,000
rh_S_front_sup	0,965	1,000	1,000
rh_S_interm_prim-Jensen	0,734	1,000	1,000
rh_S_intrapariet_and_P_trans	0,936	1,000	1,000
rh_S_oc_middle_and_Lunatus	0,417	1,000	1,000
rh_S_oc_sup_and_transversal	0,617	1,000	1,000
rh_S_occipital_ant	0,084	1,000	1,000
rh_S_oc-temp_lat	0,809	1,000	1,000
rh_S_oc-temp_med_and_Lingual	0,046	1,000	1,000
rh_S_orbital_lateral	0,690	1,000	1,000
rh_S_orbital_med-olfact	0,010	0,729	1,000
rh_S_orbital-H_Shaped	0,030	1,000	1,000
rh_S_parieto_occipital	0,696	1,000	1,000
rh_S_pericallosal	0,672	1,000	1,000
rh_S_postcentral	0,757	1,000	1,000
rh_S_precentral-inf-part	0,279	1,000	1,000
rh_S_precentral-sup-part	0,931	1,000	1,000
rh_S_suborbital	0,118	1,000	1,000
rh_S_subparietal	0,588	1,000	1,000
rh_S_temporal_inf	0,652	1,000	1,000
rh_S_temporal_sup	0,053	1,000	1,000
rh_S_temporal_transverse	0,314	1,000	1,000

Tabela 13: Estudo 3 - Tabela S4: Análise de grupo para regiões de substância cinzenta profunda definidas pelo FreeSurfer, relaxometria-T2.

Structures	p-value	Bonferroni	FDR
Left-Cerebellum-Cortex	0,962	1,000	1,000
Left-Thalamus-Proper	0,058	1,000	1,000
Left-Caudate	0,127	1,000	1,000
Left-Putamen	0,848	1,000	1,000
Left-Pallidum	0,977	1,000	1,000
Left-Hippocampus	0,889	1,000	1,000
Left-Amygdala	0,287	1,000	1,000
Left-Accumbens-area	0,074	1,000	1,000
Left-VentralDC	0,151	1,000	1,000
Right-Cerebellum-Cortex	0,202	1,000	1,000
Right-Thalamus-Proper	0,498	1,000	1,000
Right-Caudate	0,958	1,000	1,000
Right-Putamen	0,281	1,000	1,000
Right-Pallidum	0,018	0,325	1,000
Right-Hippocampus	0,485	1,000	1,000
Right-Amygdala	0,609	1,000	1,000
Right-Accumbens-area	0,310	1,000	1,000
Right-VentralDC	0,389	1,000	1,000

Resultado comparação de grupo entre pacientes e controles separados por tempo de doença.

Tabela 14: Estudo 3 - Tabela S5: Análise de grupo para pacientes com menor duração da doença, regiões do córtex cerebelar definidas pelo CERES, relaxometria-T2.

Structures	p-value	Bonferroni	FDR
Left Lobule I-II	0,347	1,000	1,000
Left Lobule III	0,681	1,000	1,000
Left Lobule IV	0,158	1,000	1,000
Left Lobule V	0,131	1,000	1,000
Left Lobule VI	0,344	1,000	1,000
Left Lobule Crus I	0,384	1,000	1,000
Left Lobule Crus II	0,252	1,000	1,000
Left Lobule VIIB	0,877	1,000	1,000
Left Lobule VIIIA	0,639	1,000	1,000
Left Lobule VIIIB	0,053	1,000	1,000
Left Lobule IX	0,114	1,000	1,000
Left Lobule X	0,022	0,546	1,000
Right Lobule I-II	0,271	1,000	1,000
Right Lobule III	0,787	1,000	1,000
Right Lobule IV	0,737	1,000	1,000
Right Lobule V	0,641	1,000	1,000
Right Lobule VI	0,802	1,000	1,000
Right Lobule Crus I	0,384	1,000	1,000
Right Lobule Crus II	0,445	1,000	1,000
Right Lobule VIIB	0,537	1,000	1,000
Right Lobule VIIIA	0,754	1,000	1,000
Right Lobule VIIIB	0,097	1,000	1,000
Right Lobule IX	0,905	1,000	1,000
Right Lobule X	0,022	0,551	1,000

Tabela 15: Estudo 3 - Tabela S6: Análise de grupo para pacientes com menor duração da doença, regiões do córtex cerebral esquerdo definidas pelo FreeSurfer, relaxometria-T2.

Structures	p-value	Bonferroni	FDR
lh_G_and_S_frontomargin	0,046	1,000	1,000
lh_G_and_S_occipital_inf	0,560	1,000	1,000
lh_G_and_S_paracentral	0,343	1,000	1,000
lh_G_and_S_subcentral	0,251	1,000	1,000
lh_G_and_S_transv_frontopol	0,496	1,000	1,000
lh_G_and_S_cingul-Ant	0,038	1,000	1,000
lh_G_and_S_cingul-Mid-Ant	0,484	1,000	1,000
lh_G_and_S_cingul-Mid-Post	0,652	1,000	1,000
lh_G_cingul-Post-dorsal	0,310	1,000	1,000
lh_G_cingul-Post-ventral	0,550	1,000	1,000
lh_G_cuneus	0,328	1,000	1,000
lh_G_front_inf-Opercular	0,112	1,000	1,000
lh_G_front_inf-Orbital	0,770	1,000	1,000
lh_G_front_inf-Triangul	0,615	1,000	1,000
lh_G_front_middle	0,091	1,000	1,000
lh_G_front_sup	0,104	1,000	1,000
lh_G_Ins_Ig_and_S_cent_ins	0,526	1,000	1,000
lh_G_insular_short	0,234	1,000	1,000
lh_G_occipital_middle	0,093	1,000	1,000
lh_G_occipital_sup	0,372	1,000	1,000
lh_G_oc-temp_lat-fusifor	0,178	1,000	1,000
lh_G_oc-temp_med-Lingual	0,496	1,000	1,000
lh_G_oc-temp_med-Parahip	0,596	1,000	1,000
lh_G_orbital	0,182	1,000	1,000
lh_G_pariet_inf-Angular	0,120	1,000	1,000
lh_G_pariet_inf-Supramar	0,139	1,000	1,000
lh_G_parietal_sup	0,239	1,000	1,000
lh_G_postcentral	0,232	1,000	1,000
lh_G_precentral	0,136	1,000	1,000
lh_G_precuneus	0,060	1,000	1,000
lh_G_rectus	0,383	1,000	1,000
lh_G_subcallosal	0,107	1,000	1,000
lh_G_temp_sup-G_T_transv	0,662	1,000	1,000
lh_G_temp_sup-Lateral	0,392	1,000	1,000
lh_G_temp_sup-Plan_polar	0,368	1,000	1,000
lh_G_temp_sup-Plan_tempo	0,949	1,000	1,000
lh_G_temporal_inf	0,230	1,000	1,000
lh_G_temporal_middle	0,228	1,000	1,000
lh_Lat_Fis-ant-Horizont	0,969	1,000	1,000
lh_Lat_Fis-ant-Vertical	0,845	1,000	1,000
lh_Lat_Fis-post	0,487	1,000	1,000

Ih_Pole_occipital	0,896	1,000	1,000
Ih_Pole_temporal	0,000	0,027	0,132
Ih_S_calcarine	0,056	1,000	1,000
Ih_S_central	0,296	1,000	1,000
Ih_S_cingul-Marginalis	0,045	1,000	1,000
Ih_S_circular_insula_ant	0,628	1,000	1,000
Ih_S_circular_insula_inf	0,323	1,000	1,000
Ih_S_circular_insula_sup	0,985	1,000	1,000
Ih_S_collat_transv_ant	0,645	1,000	1,000
Ih_S_collat_transv_post	0,243	1,000	1,000
Ih_S_front_inf	0,355	1,000	1,000
Ih_S_front_middle	0,047	1,000	1,000
Ih_S_front_sup	0,185	1,000	1,000
Ih_S_interm_prim-Jensen	0,496	1,000	1,000
Ih_S_intrapariet_and_P_trans	0,032	1,000	1,000
Ih_S_oc_middle_and_Lunatus	0,163	1,000	1,000
Ih_S_oc_sup_and_transversal	0,166	1,000	1,000
Ih_S_occipital_ant	0,965	1,000	1,000
Ih_S_oc-temp_lat	0,363	1,000	1,000
Ih_S_oc-temp_med_and_Lingual	0,008	0,579	1,000
Ih_S_orbital_lateral	0,283	1,000	1,000
Ih_S_orbital_med-olfact	0,940	1,000	1,000
Ih_S_orbital-H_Shaped	0,604	1,000	1,000
Ih_S_parieto_occipital	0,079	1,000	1,000
Ih_S_pericallosal	0,284	1,000	1,000
Ih_S_postcentral	0,047	1,000	1,000
Ih_S_precentral-inf-part	0,262	1,000	1,000
Ih_S_precentral-sup-part	0,172	1,000	1,000
Ih_S_suborbital	0,034	1,000	1,000
Ih_S_subparietal	0,017	1,000	1,000
Ih_S_temporal_inf	0,742	1,000	1,000
Ih_S_temporal_sup	0,886	1,000	1,000
Ih_S_temporal_transverse	0,781	1,000	1,000

Tabela 16: Estudo 3 - Tabela S7: Análise de grupo para pacientes com menor duração da doença, regiões do córtex cerebral direito definidas pelo FreeSurfer, relaxometria-T2.

Structures	p-value	Bonferroni	FDR
rh_G_and_S_frontomargin	0,175	1,000	1,000
rh_G_and_S_occipital_inf	0,591	1,000	1,000
rh_G_and_S_paracentral	0,730	1,000	1,000
rh_G_and_S_subcentral	0,603	1,000	1,000
rh_G_and_S_transv_frontopol	0,267	1,000	1,000
rh_G_and_S_cingul-Ant	0,407	1,000	1,000
rh_G_and_S_cingul-Mid-Ant	0,246	1,000	1,000
rh_G_and_S_cingul-Mid-Post	0,865	1,000	1,000
rh_G_cingul-Post-dorsal	0,632	1,000	1,000
rh_G_cingul-Post-ventral	0,971	1,000	1,000
rh_G_cuneus	0,769	1,000	1,000
rh_G_front_inf-Opercular	0,514	1,000	1,000
rh_G_front_inf-Orbital	0,450	1,000	1,000
rh_G_front_inf-Triangul	0,007	0,527	1,000
rh_G_front_middle	0,264	1,000	1,000
rh_G_front_sup	0,286	1,000	1,000
rh_G_Ins_lg_and_S_cent_ins	0,187	1,000	1,000
rh_G_insular_short	0,388	1,000	1,000
rh_G_occipital_middle	0,342	1,000	1,000
rh_G_occipital_sup	0,339	1,000	1,000
rh_G_oc-temp_lat-fusifor	0,287	1,000	1,000
rh_G_oc-temp_med-Lingual	0,134	1,000	1,000
rh_G_oc-temp_med-Parahip	0,326	1,000	1,000
rh_G_orbital	0,716	1,000	1,000
rh_G_pariet_inf-Angular	0,562	1,000	1,000
rh_G_pariet_inf-Supramar	0,911	1,000	1,000
rh_G_parietal_sup	0,173	1,000	1,000
rh_G_postcentral	0,523	1,000	1,000
rh_G_precentral	0,353	1,000	1,000
rh_G_precuneus	0,175	1,000	1,000
rh_G_rectus	0,868	1,000	1,000
rh_G_subcallosal	0,210	1,000	1,000
rh_G_temp_sup-G_T_transv	0,381	1,000	1,000
rh_G_temp_sup-Lateral	0,559	1,000	1,000
rh_G_temp_sup-Plan_polar	0,631	1,000	1,000
rh_G_temp_sup-Plan_tempo	0,034	1,000	1,000
rh_G_temporal_inf	0,579	1,000	1,000
rh_G_temporal_middle	0,284	1,000	1,000
rh_Lat_Fis-ant-Horizont	0,160	1,000	1,000
rh_Lat_Fis-ant-Vertical	0,758	1,000	1,000
rh_Lat_Fis-post	0,119	1,000	1,000

rh_Pole_occipital	0,576	1,000	1,000
rh_Pole_temporal	0,198	1,000	1,000
rh_S_calcarine	0,786	1,000	1,000
rh_S_central	0,317	1,000	1,000
rh_S_cingul-Marginalis	0,472	1,000	1,000
rh_S_circular_insula_ant	0,884	1,000	1,000
rh_S_circular_insula_inf	0,301	1,000	1,000
rh_S_circular_insula_sup	0,942	1,000	1,000
rh_S_collat_transv_ant	0,127	1,000	1,000
rh_S_collat_transv_post	0,005	0,397	1,000
rh_S_front_inf	0,557	1,000	1,000
rh_S_front_middle	0,413	1,000	1,000
rh_S_front_sup	0,227	1,000	1,000
rh_S_interm_prim-Jensen	0,135	1,000	1,000
rh_S_intrapariet_and_P_trans	0,901	1,000	1,000
rh_S_oc_middle_and_Lunatus	0,535	1,000	1,000
rh_S_oc_sup_and_transversal	0,860	1,000	1,000
rh_S_occipital_ant	0,044	1,000	1,000
rh_S_oc-temp_lat	0,983	1,000	1,000
rh_S_oc-temp_med_and_Lingual	0,050	1,000	1,000
rh_S_orbital_lateral	0,321	1,000	1,000
rh_S_orbital_med-olfact	0,159	1,000	1,000
rh_S_orbital-H_Shaped	0,382	1,000	1,000
rh_S_parieto_occipital	0,866	1,000	1,000
rh_S_pericallosal	0,970	1,000	1,000
rh_S_postcentral	0,980	1,000	1,000
rh_S_precentral-inf-part	0,393	1,000	1,000
rh_S_precentral-sup-part	0,345	1,000	1,000
rh_S_suborbital	0,953	1,000	1,000
rh_S_subparietal	0,426	1,000	1,000
rh_S_temporal_inf	0,195	1,000	1,000
rh_S_temporal_sup	0,112	1,000	1,000
rh_S_temporal_transverse	0,928	1,000	1,000

Tabela 17: Estudo 3 - Tabela S8: Análise de grupo para pacientes com menor duração da doença, regiões de substância cinzenta profunda definidas pelo FreeSurfer, relaxometria-T2.

Structures	p-value	Bonferroni	FDR
Left-Cerebellum-Cortex	0,906	1,000	1,000
Left-Thalamus-Proper	0,211	1,000	1,000
Left-Caudate	0,114	1,000	1,000
Left-Putamen	0,857	1,000	1,000
Left-Pallidum	0,870	1,000	1,000
Left-Hippocampus	0,338	1,000	1,000
Left-Amygdala	0,380	1,000	1,000
Left-Accumbens-area	0,019	0,343	1,000
Left-VentralDC	0,209	1,000	1,000
Right-Cerebellum-Cortex	0,078	1,000	1,000
Right-Thalamus-Proper	0,914	1,000	1,000
Right-Caudate	0,373	1,000	1,000
Right-Putamen	0,224	1,000	1,000
Right-Pallidum	0,318	1,000	1,000
Right-Hippocampus	0,088	1,000	1,000
Right-Amygdala	0,804	1,000	1,000
Right-Accumbens-area	0,790	1,000	1,000
Right-VentralDC	0,352	1,000	1,000

Tabela 18: Estudo 1 - Tabela S9: Análise de grupo para pacientes com maior duração da doença, regiões do córtex cerebelar definidas pelo CERES, relaxometria-T2.

Structures	p-value	Bonferroni	FDR
Left Lobule I-II	0,350	1,000	1,000
Left Lobule III	0,305	1,000	1,000
Left Lobule IV	0,012	0,296	1,000
Left Lobule V	0,102	1,000	1,000
Left Lobule VI	0,882	1,000	1,000
Left Lobule Crus I	0,777	1,000	1,000
Left Lobule Crus II	0,537	1,000	1,000
Left Lobule VIIB	0,773	1,000	1,000
Left Lobule VIIIA	0,386	1,000	1,000
Left Lobule VIIIB	0,178	1,000	1,000
Left Lobule IX	0,654	1,000	1,000
Left Lobule X	0,595	1,000	1,000
Left White Matter	0,649	1,000	1,000
Right Lobule I-II	0,837	1,000	1,000
Right Lobule III	0,571	1,000	1,000
Right Lobule IV	0,468	1,000	1,000
Right Lobule V	0,439	1,000	1,000
Right Lobule VI	0,404	1,000	1,000
Right Lobule Crus I	0,610	1,000	1,000
Right Lobule Crus II	0,392	1,000	1,000
Right Lobule VIIB	0,572	1,000	1,000
Right Lobule VIIIA	0,800	1,000	1,000
Right Lobule VIIIB	0,299	1,000	1,000
Right Lobule IX	0,350	1,000	1,000
Right Lobule X	0,472	1,000	1,000

Tabela 19: Estudo 1 - Tabela S10: Análise de grupo para pacientes com maior duração da doença, regiões do córtex cerebral esquerdo definidas pelo FreeSurfer, relaxometria-T2.

Structures	p-value	Bonferroni	FDR
lh_G_and_S_frontomargin	0,323	1,000	1,000
lh_G_and_S_occipital_inf	0,810	1,000	1,000
lh_G_and_S_paracentral	0,358	1,000	1,000
lh_G_and_S_subcentral	0,910	1,000	1,000
lh_G_and_S_transv_frontopol	0,141	1,000	1,000
lh_G_and_S_cingul-Ant	0,690	1,000	1,000
lh_G_and_S_cingul-Mid-Ant	0,714	1,000	1,000
lh_G_and_S_cingul-Mid-Post	0,956	1,000	1,000
lh_G_cingul-Post-dorsal	0,745	1,000	1,000
lh_G_cingul-Post-ventral	0,059	1,000	1,000
lh_G_cuneus	0,327	1,000	1,000
lh_G_front_inf-Opercular	0,946	1,000	1,000
lh_G_front_inf-Orbital	0,078	1,000	1,000
lh_G_front_inf-Triangul	0,424	1,000	1,000
lh_G_front_middle	0,971	1,000	1,000
lh_G_front_sup	0,695	1,000	1,000
lh_G_Ins_Ig_and_S_cent_ins	0,737	1,000	1,000
lh_G_insular_short	0,602	1,000	1,000
lh_G_occipital_middle	0,557	1,000	1,000
lh_G_occipital_sup	0,876	1,000	1,000
lh_G_oc-temp_lat-fusifor	0,171	1,000	1,000
lh_G_oc-temp_med-Lingual	0,056	1,000	1,000
lh_G_oc-temp_med-Parahip	0,117	1,000	1,000
lh_G_orbital	0,074	1,000	1,000
lh_G_pariet_inf-Angular	0,517	1,000	1,000
lh_G_pariet_inf-Supramar	0,938	1,000	1,000
lh_G_parietal_sup	0,073	1,000	1,000
lh_G_postcentral	0,779	1,000	1,000
lh_G_precentral	0,645	1,000	1,000
lh_G_precuneus	0,206	1,000	1,000
lh_G_rectus	0,157	1,000	1,000
lh_G_subcallosal	0,782	1,000	1,000
lh_G_temp_sup-G_T_transv	0,846	1,000	1,000
lh_G_temp_sup-Lateral	0,392	1,000	1,000
lh_G_temp_sup-Plan_polar	0,880	1,000	1,000
lh_G_temp_sup-Plan_tempo	0,710	1,000	1,000
lh_G_temporal_inf	0,190	1,000	1,000
lh_G_temporal_middle	0,912	1,000	1,000
lh_Lat_Fis-ant-Horizont	0,713	1,000	1,000

Ih_Lat_Fis-ant-Vertical	0,974	1,000	1,000
Ih_Lat_Fis-post	0,904	1,000	1,000
Ih_Pole_occipital	0,904	1,000	1,000
Ih_Pole_temporal	0,146	1,000	1,000
Ih_S_calcarine	0,754	1,000	1,000
Ih_S_central	0,540	1,000	1,000
Ih_S_cingul-Marginalis	0,670	1,000	1,000
Ih_S_circular_insula_ant	0,368	1,000	1,000
Ih_S_circular_insula_inf	0,822	1,000	1,000
Ih_S_circular_insula_sup	0,897	1,000	1,000
Ih_S_collat_transv_ant	0,274	1,000	1,000
Ih_S_collat_transv_post	0,563	1,000	1,000
Ih_S_front_inf	0,640	1,000	1,000
Ih_S_front_middle	0,830	1,000	1,000
Ih_S_front_sup	0,526	1,000	1,000
Ih_S_interm_prim-Jensen	0,711	1,000	1,000
Ih_S_intrapariet_and_P_trans	0,828	1,000	1,000
Ih_S_oc_middle_and_Lunatus	0,422	1,000	1,000
Ih_S_oc_sup_and_transversal	0,934	1,000	1,000
Ih_S_occipital_ant	0,746	1,000	1,000
Ih_S_oc-temp_lat	0,743	1,000	1,000
Ih_S_oc-temp_med_and_Lingual	0,948	1,000	1,000
Ih_S_orbital_lateral	0,861	1,000	1,000
Ih_S_orbital_med-olfact	0,696	1,000	1,000
Ih_S_orbital-H_Shaped	0,606	1,000	1,000
Ih_S_parieto_occipital	0,292	1,000	1,000
Ih_S_pericallosal	0,615	1,000	1,000
Ih_S_postcentral	0,851	1,000	1,000
Ih_S_precentral-inf-part	0,290	1,000	1,000
Ih_S_precentral-sup-part	0,284	1,000	1,000
Ih_S_suborbital	0,367	1,000	1,000
Ih_S_subparietal	0,921	1,000	1,000
Ih_S_temporal_inf	0,658	1,000	1,000
Ih_S_temporal_sup	0,954	1,000	1,000
Ih_S_temporal_transverse	0,685	1,000	1,000

Tabela 20: Estudo 1 - Tabela S11: Análise de grupo para pacientes com maior duração da doença, regiões do córtex cerebral direito definidas pelo FreeSurfer, relaxometria-T2.

Structures	p-value	Bonferroni	FDR
rh_G_and_S_frontomargin	0,208	1,000	1,000
rh_G_and_S_occipital_inf	0,058	1,000	1,000
rh_G_and_S_paracentral	0,472	1,000	1,000
rh_G_and_S_subcentral	0,287	1,000	1,000
rh_G_and_S_transv_frontopol	0,477	1,000	1,000
rh_G_and_S_cingul-Ant	0,674	1,000	1,000
rh_G_and_S_cingul-Mid-Ant	0,303	1,000	1,000
rh_G_and_S_cingul-Mid-Post	0,405	1,000	1,000
rh_G_cingul-Post-dorsal	0,893	1,000	1,000
rh_G_cingul-Post-ventral	0,875	1,000	1,000
rh_G_cuneus	0,809	1,000	1,000
rh_G_front_inf-Opercular	0,794	1,000	1,000
rh_G_front_inf-Orbital	0,546	1,000	1,000
rh_G_front_inf-Triangul	0,571	1,000	1,000
rh_G_front_middle	0,449	1,000	1,000
rh_G_front_sup	0,198	1,000	1,000
rh_G_Ins_lg_and_S_cent_ins	0,788	1,000	1,000
rh_G_insular_short	0,799	1,000	1,000
rh_G_occipital_middle	0,137	1,000	1,000
rh_G_occipital_sup	0,853	1,000	1,000
rh_G_oc-temp_lat-fusifor	0,066	1,000	1,000
rh_G_oc-temp_med-Lingual	0,710	1,000	1,000
rh_G_oc-temp_med-Parahip	0,036	1,000	1,000
rh_G_orbital	0,166	1,000	1,000
rh_G_pariet_inf-Angular	0,010	0,742	1,000
rh_G_pariet_inf-Supramar	0,035	1,000	1,000
rh_G_parietal_sup	0,322	1,000	1,000
rh_G_postcentral	0,396	1,000	1,000
rh_G_precentral	0,844	1,000	1,000
rh_G_precuneus	0,545	1,000	1,000
rh_G_rectus	0,251	1,000	1,000
rh_G_subcallosal	0,299	1,000	1,000
rh_G_temp_sup-G_T_transv	0,868	1,000	1,000
rh_G_temp_sup-Lateral	0,110	1,000	1,000
rh_G_temp_sup-Plan_polar	0,767	1,000	1,000
rh_G_temp_sup-Plan_tempo	0,246	1,000	1,000
rh_G_temporal_inf	0,810	1,000	1,000
rh_G_temporal_middle	0,375	1,000	1,000
rh_Lat_Fis-ant-Horizont	0,295	1,000	1,000
rh_Lat_Fis-ant-Vertical	0,379	1,000	1,000
rh_Lat_Fis-post	0,719	1,000	1,000

rh_Pole_occipital	0,787	1,000	1,000
rh_Pole_temporal	0,060	1,000	1,000
rh_S_calcarine	0,355	1,000	1,000
rh_S_central	0,963	1,000	1,000
rh_S_cingul-Marginalis	0,405	1,000	1,000
rh_S_circular_insula_ant	0,257	1,000	1,000
rh_S_circular_insula_inf	0,725	1,000	1,000
rh_S_circular_insula_sup	0,960	1,000	1,000
rh_S_collat_transv_ant	0,793	1,000	1,000
rh_S_collat_transv_post	0,703	1,000	1,000
rh_S_front_inf	0,917	1,000	1,000
rh_S_front_middle	0,705	1,000	1,000
rh_S_front_sup	0,894	1,000	1,000
rh_S_interm_prim-Jensen	0,173	1,000	1,000
rh_S_intrapariet_and_P_trans	0,817	1,000	1,000
rh_S_oc_middle_and_Lunatus	0,269	1,000	1,000
rh_S_oc_sup_and_transversal	0,519	1,000	1,000
rh_S_occipital_ant	0,302	1,000	1,000
rh_S_oc-temp_lat	0,994	1,000	1,000
rh_S_oc-temp_med_and_Lingual	0,281	1,000	1,000
rh_S_orbital_lateral	0,726	1,000	1,000
rh_S_orbital_med-olfact	0,087	1,000	1,000
rh_S_orbital-H_Shaped	0,017	1,000	1,000
rh_S_parieto_occipital	0,803	1,000	1,000
rh_S_pericallosal	0,849	1,000	1,000
rh_S_postcentral	0,637	1,000	1,000
rh_S_precentral-inf-part	0,762	1,000	1,000
rh_S_precentral-sup-part	0,905	1,000	1,000
rh_S_suborbital	0,103	1,000	1,000
rh_S_subparietal	0,697	1,000	1,000
rh_S_temporal_inf	0,460	1,000	1,000
rh_S_temporal_sup	0,306	1,000	1,000
rh_S_temporal_transverse	0,350	1,000	1,000

Tabela 21: Estudo 3 - Tabela S12: Análise de grupo para pacientes com maior duração da doença, regiões de substância cinzenta profunda definidas pelo FreeSurfer, relaxometria-T2.

Structures	p-value	Bonferroni	FDR
Left-Cerebellum-Cortex	0,604	1,000	1,000
Left-Thalamus-Proper	0,203	1,000	1,000
Left-Caudate	0,684	1,000	1,000
Left-Putamen	0,716	1,000	1,000
Left-Pallidum	0,971	1,000	1,000
Left-Hippocampus	0,780	1,000	1,000
Left-Amygdala	0,301	1,000	1,000
Left-Accumbens-area	0,354	1,000	1,000
Left-VentralDC	0,357	1,000	1,000
Right-Cerebellum-Cortex	0,605	1,000	1,000
Right-Thalamus-Proper	0,290	1,000	1,000
Right-Caudate	0,591	1,000	1,000
Right-Putamen	0,244	1,000	1,000
Right-Pallidum	0,019	0,351	1,000
Right-Hippocampus	0,499	1,000	1,000
Right-Amygdala	0,947	1,000	1,000
Right-Accumbens-area	0,437	1,000	1,000
Right-VentralDC	0,671	1,000	1,000

Estudo 4: Neuroimagem em Pacientes de FRDA Pediátricos

(Trabalho submetido como artigo completo a revista *Journal of Neurology,
Neurosurgery and Psychiatry*)

Neuroimaging in Pediatric Friedreich Ataxia: Insights in the Disease Onset

Thiago Junqueira R. Rezende¹, Msc, Alberto Rolim M. Martinez¹, MD, Ingrid Faber¹, MD, Karen Giroto¹, MD, Msc, Melina P. Martins, MD, Fabrício D. Lima, MD Msc, Iscia Lopes-Cendes², MD, PhD, Fernando Cendes¹, MD PhD, Marcondes C. França Jr¹, MD PhD.

¹ Department of Neurology and Neuroimaging Laboratory, School of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas SP, Brazil

² Department of Medical Genetics, School of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas SP, Brazil

Word Count: Title 65 characters, Abstract 250 words, Manuscript 3233 words, References 39

Figures: 05 **Table:** 02

Supplemental Data: 0

Short title: Neuroimaging in pediatric FRDA.

KeyWords: Friedreich's Ataxia, pediatric patients, MRI, Cortical thickness, Multi-atlas Approach

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) (Grant #13/01766-7, 2013/07559-3 and #2014/19786-7) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

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: mcfraja@uol.com.br

Abstract

Introduction: Friedreich's ataxia (FRDA) is the most common autosomal-recessive ataxia worldwide; it is characterized by early onset, sensory abnormalities and slowly progressive ataxia. Besides that, all MRI-based studies have focused in the evaluation of adult patients. Therefore, we designed a cross sectional multimodal MRI-based study to investigate the anatomical substrates involved in the early stages of FRDA.

Methods: We enrolled 37 patients (12 children) and 38 controls. All subjects underwent magnetic resonance imaging in a 3T device to assess gray and white matter. To evaluate the cerebral and cerebellar cortices, we used measures from FreeSurfer and CERES. T1 multiatlas assessed deep GM. DTI multiatlas was used to investigate microstructural-abnormalities in cerebral WM and SpineSeg to assess the cervical spinal cord. All analyses were corrected for multiple comparisons.

Results Comparison with age-matched controls showed that pediatric patients have spinal cord, inferior cerebellar peduncle and red nucleus damage. In contrast, the adult patients showed more widespread white matter damage than pediatric patients. Regarding GM, we found cortical thinning at the left central sulcus and volumetric reduction in the thalami and hippocampi only in adult patients. Finally, values of FA in adult patients and RD in pediatric patients from inferior cerebellar peduncle correlated with disease duration and ataxia severity, respectively.

Conclusion: Structural damage in FRDA begins in spinal cord, inferior cerebellar peduncle as well as red nucleus, and progresses to cerebral areas in adulthood. These structural differences shed some light in the pathogenesis of FRDA and highlight potential neuroimaging markers for therapeutic trials.

Introduction

Friedreich's ataxia (FRDA) is the most common autosomal-recessive ataxia worldwide, with prevalence ranging from 1 to 3 for each 100,000 people (1-3), beginning in late childhood or adolescence. It is caused by homozygous GAA expansions in the first intron of the *FXN* gene (1), reducing the expression of the protein Frataxin and leading to mitochondrial dysfunction. Neurodegeneration then causes slowly progressive ataxia and deep sensory abnormalities (4).

Neurodegeneration in FRDA extends to the central and peripheral nervous system. Spinal cord is a major target in FRDA and neuroimaging typically reveals local volumetric reduction (5). Previous MRI-based studies showed gray matter (GM) and white matter (WM) atrophy in portions of the cerebellum, brainstem and cerebellar peduncles (6,7). Cortical damage, mainly in the precentral gyri, has been described in some studies (8-9). Prospective studies are much more scarce. Bonilha et al. (2014) described progressive alterations in the T2 relaxometry of dentate nuclei, whereas Rezende et al. (2016) showed progressive WM abnormalities at the corpus callosum, pyramidal tracts and superior cerebellar peduncles in a short follow-up of 1 year.

These studies helped us to understand the pathological signature of FRDA, but they mostly included adult patients with a rather long disease duration. Hence, the pattern previously described probably reflects the final stages of the disease. In this scenario, the characterization of the early stages of the disease will be helpful to elucidate the origins and the course of the disease. This information is particularly useful for prognostic prediction and to unravel potential biomarkers for clinical trials. Therefore, we focused in the investigation of the anatomical substrates selectively involved in young (yFRDA, age <18 years) and adult (aFRDA, age >18 years) patients with classical FRDA. Moreover, we assessed possible associations of these features with clinical parameters. To accomplish that, we used a multimodal MRI-based approach to evaluate cerebral and spinal cord damage in these subjects.

Materials

Participants

This study was approved by our institution research ethics committee and a written informed consent was obtained from all participants and parents. Thirty-seven patients with molecular confirmation of FRDA (25 aFRDA and 12 yFRDA) and 38 healthy controls (13 children, mean age = 14.1 ± 2.7 years, 5 males; 25 adults, mean age = 28.4 ± 12.2 years, 10 males) were enrolled in this study. All patients were regularly followed at the neurogenetics outpatient clinics at the University of Campinas (UNICAMP) hospital between 2009 and 2017. Clinical (age at disease onset, duration of disease, and clinical subtype) and genetic data (length of expanded repeat in both shorter, GAA1, and longer, GAA2 alleles) were recorded (Table 1). We used the Friedreich's Ataxia Rating Scale (FARS) (11) to quantify the ataxia severity (Table 1). Patients with concomitant neurological disorders, unable to perform MRI scans and those with significant motion artifacts on images were excluded.

Image Acquisition

We submitted all subjects to a high resolution MRI on a 3T Phillips Achieva Scanner. To exclude unrelated abnormalities, such as white matter disease or minor strokes, we performed routine T2 weighted sequences in all subjects. A board-certified neuroradiologist (FC) carefully reviewed the images that were all acquired using a standard 8-channel head coil.

For SpineSeg, CERES, FreeSurfer and T1 Multi-Atlas analyses, we used high resolution T1 volumetric images of the brain with sagittal orientation, voxel matrix 240x240x180, voxel size 1x1x1mm³, TR/TE 7/3.201ms and flip angle 8°.

For DTI Multi-Atlas analyses, we used a spin echo DTI sequence: 2x2x2 mm³ acquiring voxel size, interpolated to 1x1x2 mm³; reconstructed matrix 256x256; 70 slices; TE/TR 61/8500 ms; flip angle 90°; 32 gradient directions; no averages; max b-factor = 1000 s/mm²; six minutes scan.

Image Processing

Gray Matter Analysis

T1 Multi-Atlas

The images were processed using “MRICloud” (MRICloud.org), a public web-based service for multi-contrast imaging segmentation and quantification. The image processing involves orientation correction of sagittal to axial, in order to match the atlas orientation with the image in processing, homogeneity correction using the N4 algorithm (12), and two-level brain segmentation: skull-stripping (13) first and, then, the whole brain segmentation. To improve the alignment and correspondence between the atlas and the image processed we used a non-linear algorithm, LDDMM (14), in addition to linear algorithms for brain co-registration. To identify the brain regions, a multi-atlas labeling fusion (MALF) algorithm was employed (13), followed by a last step of labeling adjusting with PICS (13) (https://masi.vuse.vanderbilt.edu/workshop2013/images/1/1b/SATA_2013_Proceedings.pdf).

To segment the young and adult subjects (controls and yFRDA), we used 28 and 26 atlases, respectively, (JHU adult atlas version 9B) to generate 283 structural definitions in a five-level ontological hierarchical relationship (15,16). We used T1 multi-atlas to evaluate deep GM, because this methodology provides more accurate and reliable measures (17). The computations were done on the Gordon cluster of XSEDE (18).

FreeSurfer

We used cortical thickness measures, provided by FreeSurfer software v.5.3. We chose this metric because some studies showed that cortical thickness is more sensitive to cortical variations than area and volume (19).

Images were aligned to the Talairach and Tournoux atlas (20), corrected for magnetic field inhomogeneity and skull-stripped. The voxels are identified as gray matter (GM), white matter (WM) or cerebral spinal fluid (CSF). Next, two surfaces were created using triangle meshes: the white surface, which is the interface between GM and WM, and the pial surface (21). Cortical thickness was calculated as the shortest distance between the pial and white surface at each vertex across the cortical mantle. A Gaussian filter with 10 mm FWHM was used

for all analyses in order to smooth the surface. Furthermore, estimated total intracranial volume (eTIV) (22) was computed for each subject.

CERES

We evaluated the cerebellar GM using cortical thickness measurement determined by CERES, an automated segmentation tool that combines multiple reference atlases to create one that anatomically fits to the target case. In summa, the preprocessing involves image denoising, inhomogeneity correction in the native space, normalization at MNI space, inhomogeneity correction in the MNI space, matrix reduction to the cerebellum area, non-linear registration between the segmentation atlas and the image processed, intensity normalization, non-linear alignment of the image and the segmentation atlas and, lastly, the identification of the cerebellar lobules (24,25). CERES provides cerebellar cortical thickness and volume, but we evaluated only cerebellar cortical thickness to stay in line with the statement done in the cerebral cortex analysis.

White Matter Analysis

DTI Multi-Atlas

DTI-weighted images were corrected for eddy currents and co-registered (26) in order to remove subject motion using a 12-parameter affine transform (27). The DTI-parameters were calculated using a multivariate linear fitting and skull-stripped using the b=0 image, by intensity threshold, a tool of RoiEditor software (Li, X.; Jiang, H.; Yue, Li.; and Mori, S.; Johns Hopkins University, www.MriStudio.org or www.kennedykrieger.org). This preprocessing was performed using “MRICloud” (MRICloud.org), a public web-based service for multi-contrast imaging segmentation and quantification. Next, we employed the multi-contrast LDDMM algorithm to register the atlas to the images (17) and, then, the parcellation, which employs a DLFA algorithm (17). All analyses are performed in native space. The computations were processed on the Gordon cluster of XSEDE (18).

Spinal cord

SpineSeg

SpineSeg software was developed to estimate, semi-automatically, the cervical spinal cord area and eccentricity (ECC) (28). Firstly, the software resamples the MR images in order to correct for variations in imaging angle and neck position. Next, cross-sections of the spinal cord are segmented and it is fitted an ellipse in the corresponding cross-section based on a semi-automatic protocol. The boundary of the spinal cord is segmented by automatic tree pruning (29). These measures were performed at the higher section of the intervertebral disc between C2 and C3 using standard structural brain MRI acquisition (30). We chose this level because it includes the cervical intumescence, thus making the cord larger and enabling easier detection of atrophy. The measures represent the average from three consecutive levels measurements at the mid-section of the intervertebral disc between C2 and C3 for each subject (30). A single investigator, who was blind to the clinical status of subjects (TJRR), performed all measurements.

Statistical Analysis

YFRDA and aFRDA groups were compared to age-and-gender-matched controls separately. To assess these between-group differences we used ANOVA test. For all analyses, we removed age, gender and eTIV effects. In order to correct for multiple comparisons, we employed the Bonferroni test with level of significance adjusted to 0.05. Furthermore, to assess possible correlations between imaging measures and clinical data (disease duration and disease severity) we employed a general linear model. In order to adjust for multiple comparisons, we employed the Bonferroni correction (level of significance $\alpha = 0.05$).

We regressed a linear fit over the cervical spinal cord area specifically in the young group (both patients and controls) to assess how different are the plots in both groups.

Results

Gray Matter Analysis

T1 Multi-Atlas

When we compared yFRDA patients with controls, we just found volumetric reduction in red nuclei (Left: $p < 0.001$; Right: $p = 0.003$). In contrast, the aFRDA showed volumetric reduction in several areas, including bilateral hippocampus (Left: $p < 0.001$; Right: $p = 0.002$), thalami (Left: $p < 0.011$; Right: $p = 0.008$), red nuclei (Left: $p < 0.001$; Right: $p < 0.001$); right substantia nigra ($p = 0.009$), midbrain ($p = 0.001$), pons ($p = 0.007$) and medulla oblongata ($p < 0.001$) (Figure 1).

FreeSurfer

We did not find cortical thinning in the yFRDA group compared to matched healthy controls. The aFRDA showed cortical thinning in the left central sulcus (cortical thickness: aFRDA = 1.69 ± 0.10 mm, control = 1.79 ± 0.10 , $p = 0.039$) when compared to controls.

CERES

We did not identify significant cerebellar cortical damage in any of the FRDA groups (yFRDA and aFRDA).

White Matter Analysis

DTI Multi-Atlas

Axial Diffusivity

We did not find increased AD in the yFRDA group when compared to the respective control group. However, the aFRDA group showed increased AD, in contrast to the respective control group, mostly in cerebellar pathways, such as bilateral superior cerebellar peduncles (Right: $p = 0.002$; Left: $p < 0.001$), left medial lemniscus ($p = 0.029$), right inferior cerebellar peduncle ($p = 0.001$) and medulla oblongata ($p = 0.004$) (Figure 2).

Fractional Anisotropy

We did not find decreased FA in the yFRDA group in any WM tract. On the other hand, the aFRDA group presented FA decrease in several areas, including motor and sensory pathways (Figure 2). The regions with abnormal results were the WM beneath the superior parietal gyri (Right: $p = 0.003$; Left: $p = 0.016$), precentral gyri (both $p < 0.001$), postcentral gyri (both $p < 0.001$), right middle

frontal gyrus ($p = 0.029$), right cuneus ($p < 0.001$), superior occipital gyri (Right: $p = 0.002$; Left: $p = 0.002$), middle occipital gyri (Right: $p < 0.001$; Left: $p = 0.020$) and left lingual gyrus ($p < 0.001$). We also identified decreased FA at the corticospinal tract (both $p < 0.001$), inferior cerebellar peduncles (both $p < 0.001$), superior cerebellar peduncles (both $p < 0.001$), medial lemnisci (Right: $p < 0.001$; Left: $p = 0.014$), bilateral posterior thalamic radiation (both $p < 0.001$), bilateral superior corona radiata (Right: $p < 0.001$; Left: $p = 0.001$) and posterior limb of internal capsule ($p < 0.001$). We also found decreased FA in bilateral splenium (Right: $p = 0.021$; Left: $p = 0.005$) and body of corpus callosum (Right: $p < 0.003$; Left: $p = 0.002$).

Mean Diffusivity

We did not find increased MD in the yFRDA group when compared to the respective control group. The aFRDA group showed increased MD in a pattern much like that reported for FA maps (Figure 2). These abnormalities include the inferior cerebellar peduncles (both $p < 0.001$), superior cerebellar peduncles (both $p < 0.001$), cerebral peduncles (Right: $p = 0.011$; Left: $p < 0.001$), medial lemnisci (both $p < 0.001$) and middle cerebellar peduncles (Right: $p = 0.041$; Left: $p < 0.006$).

Radial Diffusivity

The yFRDA group showed increased RD in right inferior cerebellar peduncle ($p = 0.010$) and medulla oblongata ($p = 0.035$), when compared to the matched healthy controls (Figure 3).

The aFRDA group showed increased RD in several WM tracts (Figure 2). The regions found altered were the WM beneath the left superior parietal gyrus ($p = 0.016$), left precentral gyrus ($p < 0.001$), postcentral gyri (Right: $p = 0.047$; Left: $p < 0.001$), right middle frontal gyrus ($p = 0.029$), left cuneus ($p < 0.023$) and left superior occipital gyrus ($p = 0.002$). We also found increased RD at the left corticospinal tract ($p = 0.003$), inferior cerebellar peduncles (both $p < 0.001$), superior cerebellar peduncles (both $p < 0.001$), medial lemnisci (both $p < 0.001$), bilateral superior corona radiata (Right: $p = 0.004$; Left: $p = 0.013$) and right posterior limb of internal capsule ($p < 0.001$). Finally, the left body of corpus callosum ($p = 0.030$) showed increased RD as well.

Spinal cord

SpineSeg

We found reduction of cervical spinal cord area and increased ECC in both groups, yFRDA and aFRDA, when compared to the respective control groups (Table 2 and Figure 4). Furthermore, the plot of cervical spinal cord area vs age revealed distinct behavior in yFRDA and young controls. There is a clear positive correlation between cord area and age in healthy subjects, whereas in yFRDA one can clearly see progressive decline with aging (Figure 5).

Correlation Analysis

In the aFRDA group, the decreased FA at left inferior cerebellar peduncle (ICC), right cerebral peduncle (CP) and body of the corpus callosum (BCC) correlated with disease duration (ICC: $R = -0.662$, $p = 0.015$; CP: $R = -0.648$, $p = 0.022$; BCC: $R = -0.621$, $p = 0.044$). In addition, disease duration also correlated with increased RD at left body of the corpus callosum ($R = -0.622$, $p = 0.026$). We did not find correlation between imaging parameters and disease duration in the yFRDA group. In contrast, the yFRDA group showed correlation between RD of right inferior cerebellar peduncle and disease severity ($R = 0.696$, $p = 0.025$). In Adult patients, there was a correlation between spinal cord area and disease severity ($R = -0.657$, $p = 0.001$). All results were corrected for multiple comparisons using Bonferroni test.

Discussion

Pediatric patients offer a unique opportunity to study FRDA onset. This is a group where subjects have not yet suffered the whole burden of damage related to long term exposure to frataxin deficiency. On clinical grounds, young patients would be the ideal subjects to be included in clinical trials. In terms of imaging, looking at these individuals would potentially unravel candidate biomarkers that might be used to follow progression of the disease and to be used as outcome measures for clinical trials. Despite all that, there are essentially no studies focusing in these subjects. This is indeed a major gap in the literature related to FRDA.

In this scenario, the present study focused in the identification of the neuroanatomical signature of the early stages of the disease. We found structural abnormalities in the cervical spinal cord, medulla oblongata, inferior cerebellar peduncle and red nucleus in pediatric patients. The same regions were found damaged in aFRDA patients. Cortical thinning was not found in yFRDA patients, only in the adult group. The results for the aFRDA group are in line with previous neuroimaging studies (5-9,31). In addition, we observed that only adult patients presented supratentorial damage, whereas the yFRDA group showed essentially infratentorial involvement. Hence, our results strongly suggest that neurodegeneration in FRDA begins in the lower brainstem and spinal cord, then progressing to deep cerebral WM and eventually to the cerebral cortex. This somewhat resembles a “dying-back” model of axonal degeneration.

Post-mortem studies identified essentially the same targets of damage in adult FRDA patients (32-34). The available pathological data come mostly from patients with long standing disease and reflect the late stages of neurodegeneration. In contrast, pathological studies in pediatric patients are very scarce. Despite that, our findings are in agreement with the few pathological reports available in children (32), which identified spinal cord area reduction and depletion of myelinated fibers in the dorsal columns of the cord (32).

Spinal cord volumetric reduction is a hallmark of FRDA and has been described since Friedreich’s initial reports (4,5). However, there is some debate whether it is due to atrophy, hypoplasia or a mixture of both. Our imaging findings reveal that volumetric reduction is already present early in the disease course. The direct comparison between yFRDA and aFRDA in terms of cord area found no significant difference ($p > 0.05$). This is an important result, especially if we take into account that mean ages are remarkably different in both groups (14 vs 28 years). Moreover, when one looks at the cord area vs age plots, it becomes clear that the spinal cord “fails” to increase in the yFRDA group. From our data, it seems that spinal cord area in patients with FRDA reaches its maximum at some point before 10 years of age, and then begins to fall. So, our data strongly support the concept of a developmental spinal cord abnormality, possibly followed latter by progressive atrophy. This hypothesis is in line with a neuropathological report published by Koeppen et al, who found no significant

differences regarding cord areas between adult patients and 2 yFRDA patients that died prematurely (death at 10 and 11 years). Furthermore, these authors found that healthy controls and FRDA patients have different thoracic spinal cord growth curves - FRDA patients fail to achieve the normal adult size, remaining stable during entire disease course (32). In a recently published neuroimaging study, Mascalchi et al. (2017) showed that spinal cord area remains stable after almost 4 years of follow-up (Mascalchi et al., 2017) and argued in favor of a hypoplastic phenomenon. These pathological and MRI findings are also supported by experimental data providing evidence that frataxin plays a major role in embryonic development (32,35,36). On clinical grounds, the correlates for spinal cord hypoplasia might be delayed motor development, which is indeed reported by some parents of patients with FRDA, especially when compared to unaffected siblings (32).

The inferior cerebellar peduncles and the red nuclei were also abnormal in pediatric FRDA patients. The former structure contains most afferent fibers arising from the spinal cord that reach cerebellar cortex. Therefore, its early involvement in the disease might reflect the damage to the spinocerebellar tracts coming from spinal cord. The red nuclei are tightly connected to the dentate nuclei of the cerebellum, which is another major target in FRDA. We assume that red nuclei atrophy might be due to the loss of input coming from the dentate nuclei through the upper cerebellar peduncles. Compromise of this circuitry has been associated to motor incoordination in FRDA (37-39).

Despite the novel findings herein reported, this study has noticeable limitations. We enrolled a relatively small sample of yFRDA patients in a purely cross-sectional analysis. This might have underpowered our study to detect more subtle differences in this subgroup. It would be important to recruit more patients in this age group and follow them prospectively with imaging. Considering the rarity of FRDA, such research effort would need the collaboration of multiple centers across the globe. Hopefully, initiatives such as the ENIGMA ataxia group will help to solve this issue in the near future (<http://enigma.ini.usc.edu/ongoing/enigma-ataxia/>).

In conclusion, we were able to identify the anatomical structures initially affected in FRDA (spinal cord, inferior cerebellar peduncle and red nucleus). Our

results favor a combination of neurodegeneration superimposed on a developmental process in the disease.

Funding: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, São Paulo, Brazil. Drs. MCFJ, IL-C and FC are supported by FAPESP and CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa-BRAZIL). TJRB and ARMM receive a PhD scholarship from FAPESP (Grant #2014/19786-7 and 2013/26410-0), IF and MPM receives a PhD scholarship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de nível superior-BRAZIL). The funding agencies did not interfere with the design of the study, collection of data or drafting of the manuscript.

Disclosures: Authors have nothing to disclose regarding this manuscript.

Contribution of the authors:

1. Research project: A. Conception, B. Organization, C. Execution;
2. Statistical Analysis: A. Design, B. Execution, C. Review and Critique;
3. Manuscript: A. Writing of the first draft, B. Review and Critique;

Thiago Junqueira R. Rezende: 1, 2A, 2B, 3A

Alberto R. Muro Martinez: 1C, 2B, 3A

Ingrid Faber: 1C, 2B, 3B

Karen Giroto: 1C, 2B, 3B

Melina Martins: 1A, 1B, 2C, 3B

Fabício Diniz: 1A, 1B, 2C, 3B

Iscia Lopes-Cendes: 1A, 1B, 2C, 3B

Fernando Cendes: 1A, 1B, 2C, 3B

Marcondes C. França Jr: 1, 2A, 2B,3B

References

1. Campuzano V, Montermini L, Molto MD, et al. Friedreich ' s ataxia: autosomal recessive disease caused by anintrinsic GAA triplet repeat expansion. *Science*. 1996;271:1423 – 7.
2. Bhidayasiri R, Perlman SL, Pulst SM, et al. Late-onset Friedreich ataxia: phenotypic analysis, magnetic resonance imaging findings, and review of the literature. *Arch Neurol*. 2005;629:1865 – 9.
3. Abrahão A, Pedroso JL, Braga-Neto P, et al. Milestones in Friedreich ataxia: more than a century and still learning. *Neurogenetics*. 2015;16:151 – 60.
4. Pandolfo M. Friedreich ataxia. *Arch Neurol* 2008;65:1296-1303.
5. Chevis CF, da Silva CB, D'Abreu A, et al. Spinal cord atrophy correlates with disability in Friedreich's ataxia. *Cerebellum*. 2013;12:43-7.
6. Della Nave R, Ginestroni A, Diciotti S, et al. Axial diffusivity is increased in the degenerating superior cerebellar peduncles of Friedreich's ataxia. *Neuroradiology* 2011;53:367-372.
7. Pagani E, Ginestroni A, Della Nave R, et al. Assessment of brain white matter bundle atrophy in patients with Friedreich ataxia. *Radiology* 2010;255:882-887.
8. Rezende TJ, Silva CB, Yassuda CL, et al. Longitudinal magnetic resonance imaging study shows progressive pyramidal and callosal damage in Friedreich's ataxia. *Mov Disord*. 2016;31:70-8.
9. França MC, Jr., D'Abreu A, Yassuda CL, et al. A combined voxel-based morphometry and 1H MRS study in patients with Friedreich's ataxia. *J Neurol* 2009;256:1114-1120.
10. Bonilha da Silva C, Bergo FP, D'Abreu A, et al. Dentate nuclei T2 relaxometry is a reliable neuroimaging marker in Friedreich's ataxia. *Euro J Neurol* 2014;21:1131-1136.
11. Subramony SH, May W, Lynch DR, et al. Measuring Friedreich ataxia: Interrater reliability of a neurologic rating scale. *Neurology* 2005;64:1261-1262.
12. Tustison NJ, Avants BB, Cook PA, et al. N4ITK: improved N3 bias correction. *IEEE Trans Med Imaging* 2010;29:1310 – 1320.

13. Tang X, Crocetti D, Kutten K, et al. Segmentation of brain magnetic resonance images based on multi-atlas likelihood fusion: testing using data with a broad range of anatomical and photometric profiles. *Front Neurosci* 2015;3:61.
14. Miller MI, Beg MF, Ceritoglu C, et al. Increasing the power of functional maps of the medial temporal lobe by using large deformation diffeomorphic metric mapping. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005;102:9685–9690.
15. Djamanakova A, Tang X, Li X, et al. Tools for multiple granularity analysis of brain MRI data for individualized image analysis. *Neuroimage* 2014;101:168-76.
16. Wu D, Ma T, Ceritoglu C et al. Resource atlases for multi-atlas brain segmentations with multiple ontology levels based on T1-weighted MRI. *Neuroimage* 2016;125:120-30.
17. Tang X, Shoko Y, Hsu John, et al. Multi-contrast multi-atlas parcellation of diffusion tensor imaging of the human brain. *Plos One* 2014;9:e96985.
18. Towns J, Cockerill T, Dahan M, et al. XSEDE: accelerating scientific discovery. *Comput Sci Eng* 2014;16:62-72.
19. Hutton C, Draganski B, Ashburner J, et al. A comparison between voxel-based cortical thickness and voxel-based morphometry in normal aging. *Neuroimage* 2009;48:371-80.
20. Talairach J, Tournoux P. *Co-planar Stereotaxic Atlas of the Human Brain*, Thieme, NY. 1988.
21. Fischl B, Dale AM. Measuring the thickness of the human cerebral cortex from magnetic resonance images. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:11050-5.
22. Buckner RL, Head D, Parker J, 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.
23. Fischl B, Salat DH, Busa E, et al. Whole brain segmentation: automated labeling of neuroanatomical structures in the human brain. *Neuron* 2002;33:341-55.

24. Coupé P, Manjón JV, Fonov V, et al. Patch-based Segmentation using Expert Priors: application to Hippocampus and Ventricle Segmentation. *NeuroImage* 2011;54: 940–954.
25. Romero JE, Coupé P, Giraud R, et al. CERES: A new cerebellum lobule segmentation method. *Neuroimage* 2017;15:916-924.
26. Zhuang J, Hrabec J, Kangarlu A, et al. Correction of eddy-current distortions in diffusion tensor images using the known directions and strengths of diffusion gradients. *J. Magn. Reson. Imaging* 2006;24:1188–1193.
27. Woods RP, Grafton ST, Holmes CJ, et al. Automated image registration: I. general methods and intrasubject, intramodality validation. *J Comput Assist Tomogr.* 1998;22:139–152.
28. Bergo FPG, França MCJr, Chevis CF, Cendes F . SpineSeg: A Segmentation and Measurement Tool for Evaluation of Spinal Cord Atrophy. In: CISTI'2012 (7^a Conferencia Ibérica de Sistemas y Tecnología de Información). Madrid, Spain: IEEE; 2012:400 – 3.
29. Bergo FPG, Falcão AX, Miranda PAV, et al. Automatic image segmentation by tree pruning. *J Math Imaging Vis* 2007;29:141-62.
30. Branco LM, De Albuquerque M, De Andrade HM, Bergo FP, Nucci A, França Jr MC. Spinal cord atrophy correlates with disease duration and severity in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2014;15:93–7.
31. Rezende TJR, Martinez ARM, Faber I, et al. Structural signature of classical versus late-onset Friedreich's ataxia by multimodality brain MRI. *Hum Brain Mapp.* 2017;38:4157-4168.
32. Koeppen AH, Becker AB, Qian J, Feustel PJ. Friedreich Ataxia: Hypoplasia of Spinal Cord and Dorsal Root Ganglia. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2017;76:101-108.
33. Pandolfo M. Friedreich ataxia: the clinical picture. *J Neurol.* 2009;256:3–8
34. Johnson WG. Friedreich ataxia. *Clin Neurosci.* 1995;3:33–8.

35. Mascalchi M, Bianchi A, Ciulli S, et al., Lower medulla hypoplasia in Friedreich ataxia: MR Imaging confirmation 140 years later. *J Neurol.* 2017;264:1526-1528.
36. Cossée M, Puccio H, Gansmuller A et al. Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Hum Mol Genet.* 2000;9:1219-26.
37. Akhlaghi H, Yu J, Corben L, et al. Cognitive deficits in Friedreich ataxia correlate with micro-structural changes in dentatorubral tract. *Cerebellum.* 2014;13:187-98.
38. Habas C, Guillevin R, Abanou A. In vivo structural and functional imaging of the human rubral and inferior olivary nuclei: A minireview. *Cerebellum (London, England).* 2010;9(2):167–73.
39. Nioche C, Cabanis EA, Habas C. Functional connectivity of the human red nucleus in the brain resting state at 3T. *Ajnr.* 2009;30(2): 396–403.

Tables

Tabela 22: Estudo 5 - **Table 1:** Clinical, demographic and genetic data of patients

	aFRDA (n=25)	yFRDA (n=12)	p-value
Age (mean±SD, years)	28.4 ± 12.4	14.2 ± 1.9	<0.001
Gender (M/F)	7/18	4/8	0.999
Onset (mean±SD, years)	13.8 ± 5.2	9.2±2.6	0.007
Duration (mean±SD, years)	13.1 ± 10.5	6.0±3.0	0.028
GAA₁	1063 ± 287	1022±226	0.667
GAA₂	899 ± 194	975±216	0.289
FARS III subscore	61.0 ± 17.8	53.3±15.1	0.205

*Chi-square test with Yates correction

**T-Test

Tabela 23: Estudo 5 - **Table 2:** Results of SpineSeg analyses showing significant cervical spinal cord area and ECC when compared to healthy controls.

SpineSeg Results			
	Control yFRDA	yFRDA	p-value
Area (mean \pm SD, mm²)	62.7 \pm 5.3	40.6 \pm 5.8	<0.001
ECC (mean \pm SD)	0.780 \pm 0.075	0.861 \pm 0.042	0.010
	Control aFRDA	aFRDA	p-value
Area (mean \pm SD, mm²)	69.4 \pm 6.7	37.1 \pm 5.2	<0.001
ECC (mean \pm SD)	0.785 \pm 0.052	0.856 \pm 0.039	<0.001

Figures

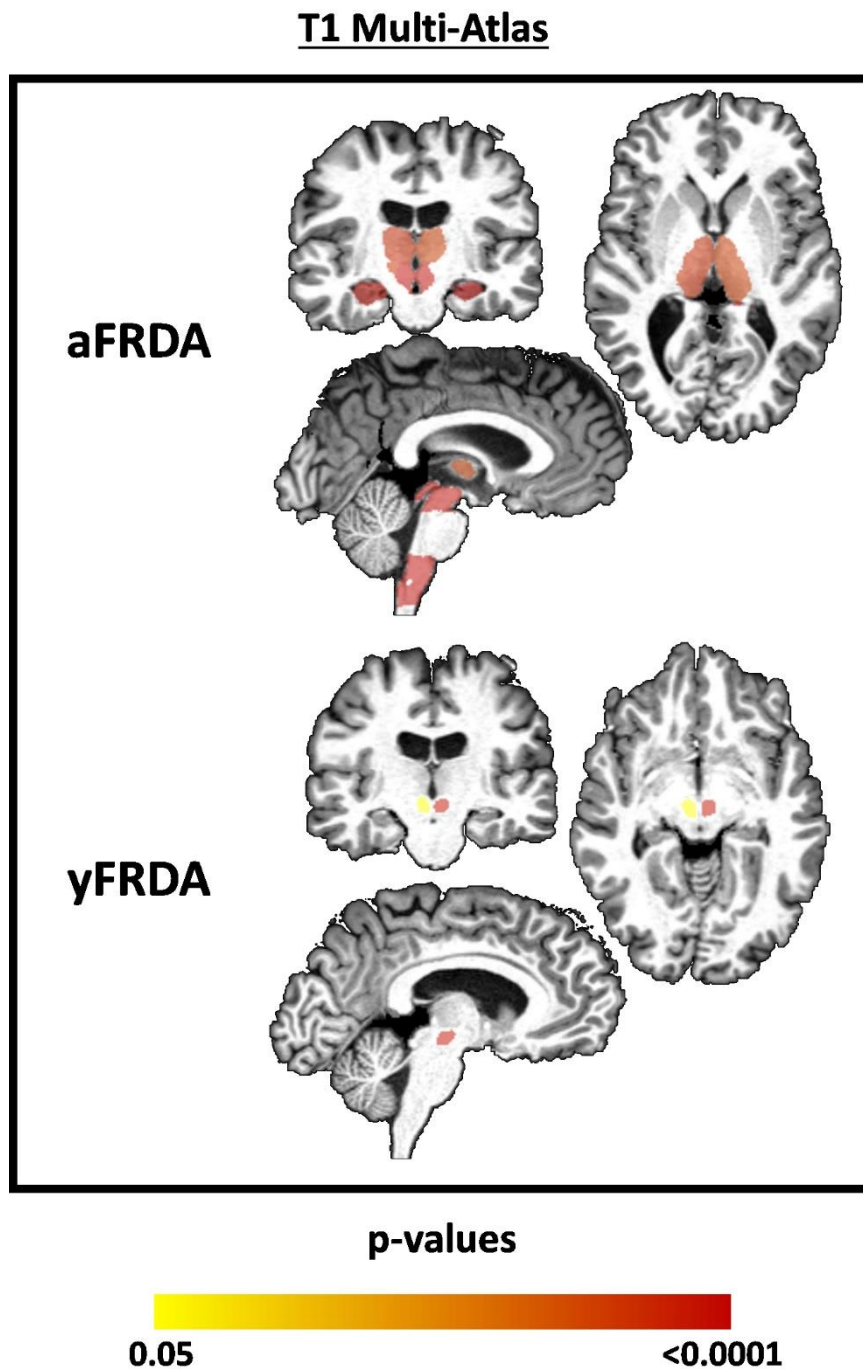


Figura 23: Estudo 5 - **Figure 1:** Results of ROI-based analyses using T1 multi-atlas approach to assess deep GM. The yFRDA and aFRDA patients were compared to their respective healthy controls. All results were corrected for multiple comparisons, using Bonferroni test.

DTI Multi-Atlas aFRDA vs. Controls

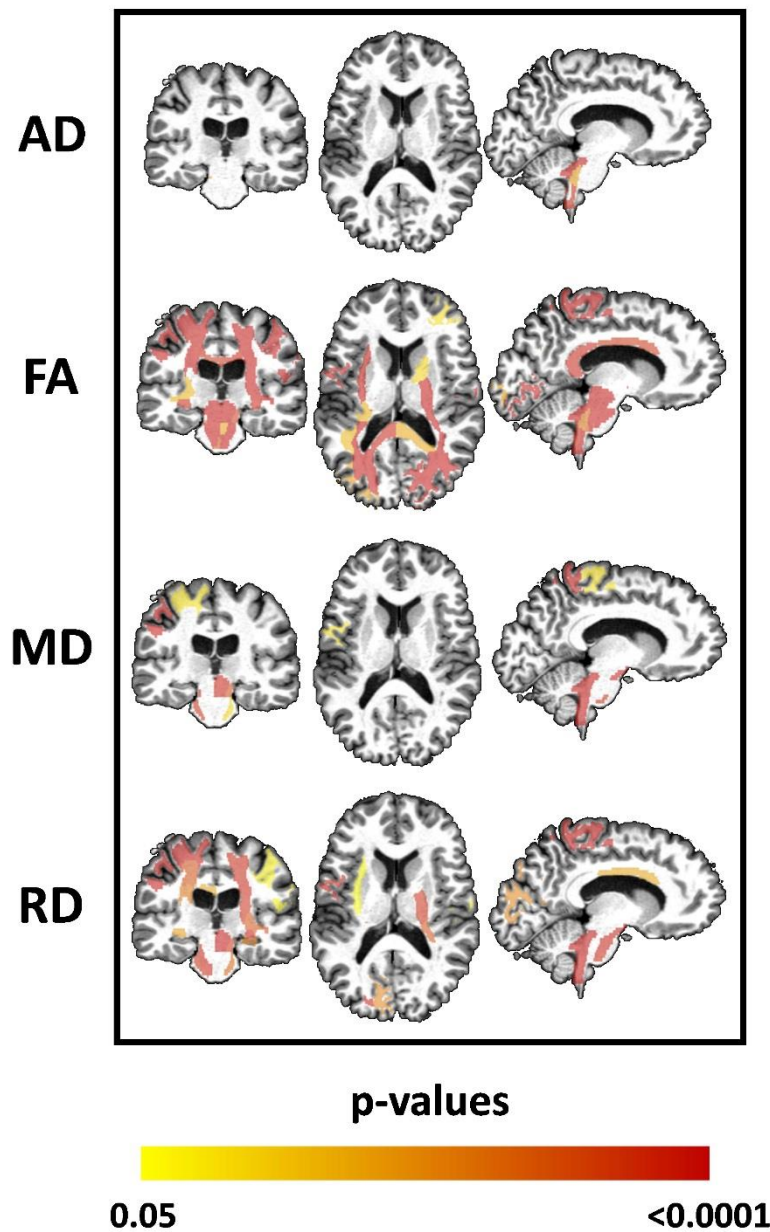


Figura 24: Estudo 5 - **Figure 2:** Results of DTI multi-atlas approach showing areas of reduced fractional anisotropy (FA) and increased axial diffusivity (AD), mean diffusivity (MD) and radial diffusivity (RD) in patients with aFRDA after comparison with controls. Effects of age and gender were removed and all results were corrected for multiple comparison using Bonferroni test.

DTI Multi-Atlas yFRDA vs. Controls

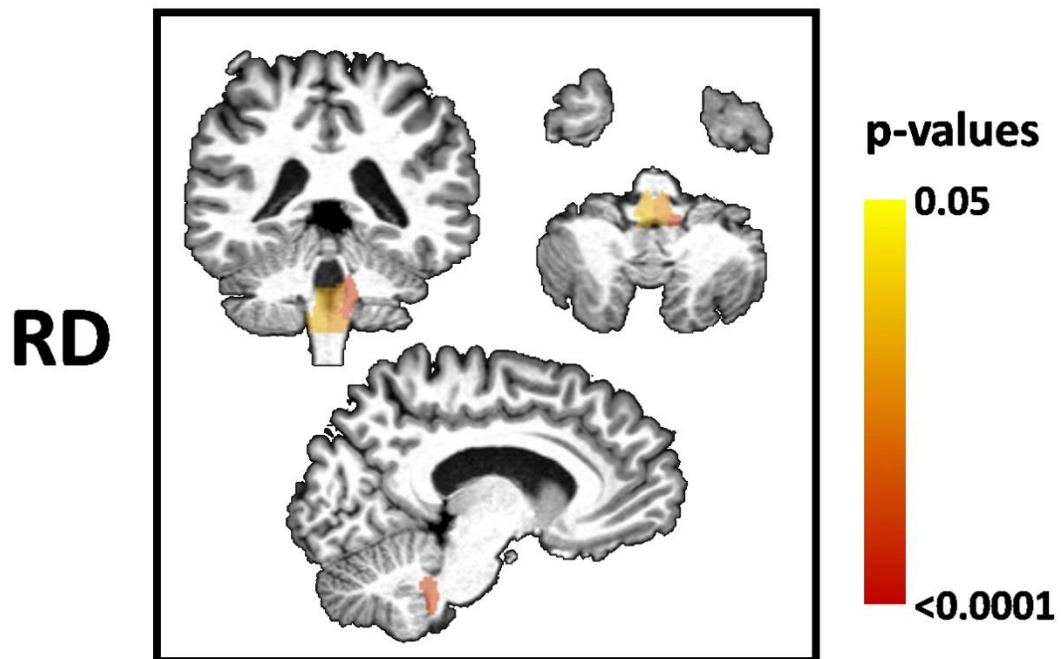


Figura 25: Estudo 5 - Figure 3: Results of DTI multi-atlas approach showing areas of increased radial diffusivity (RD) in patients with yFRDA after comparison with controls. Effects of age and gender were removed and all results were corrected for multiple comparison using Bonferroni test.

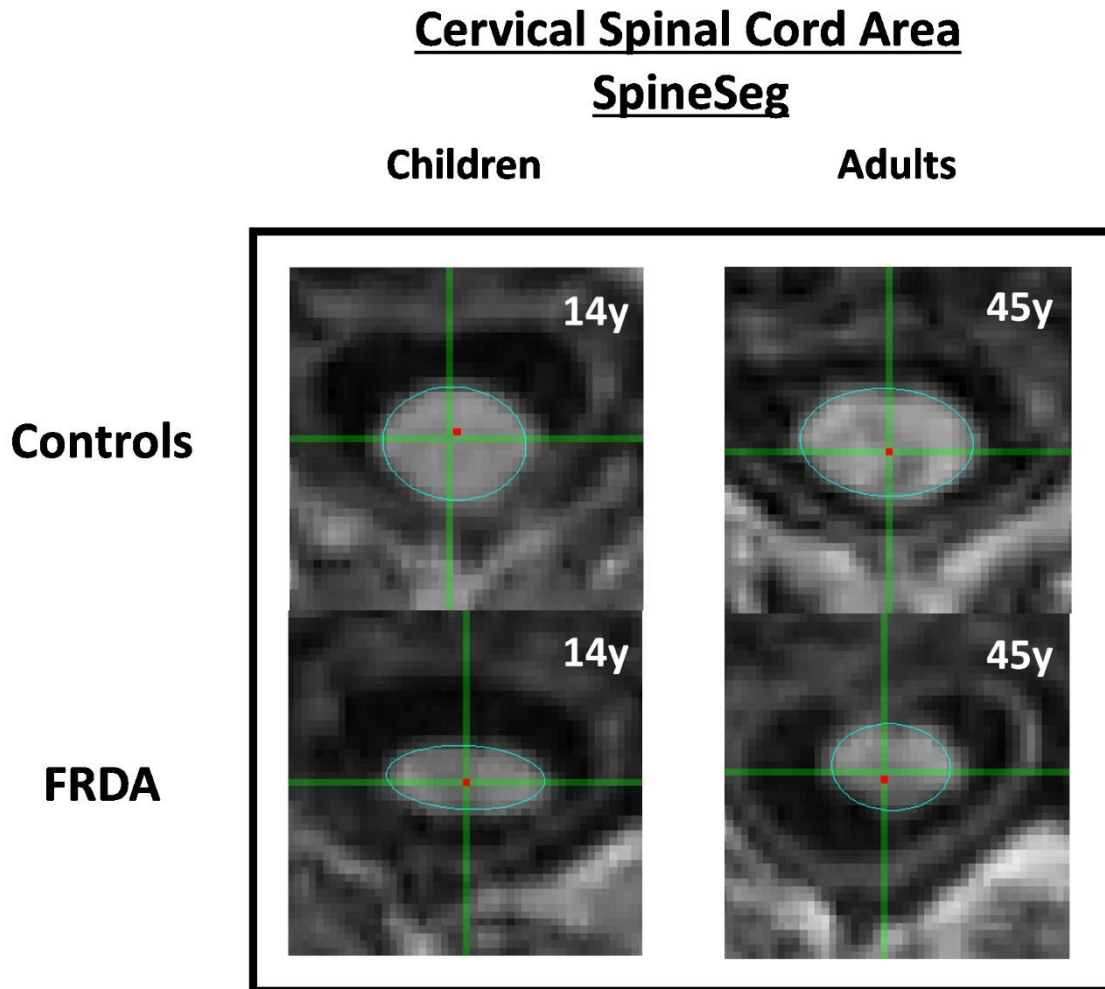


Figura 26: Estudo 5 - **Figure 4:** Visual spinal cord area for yFRDA and aFRDA patients with their matched healthy controls.

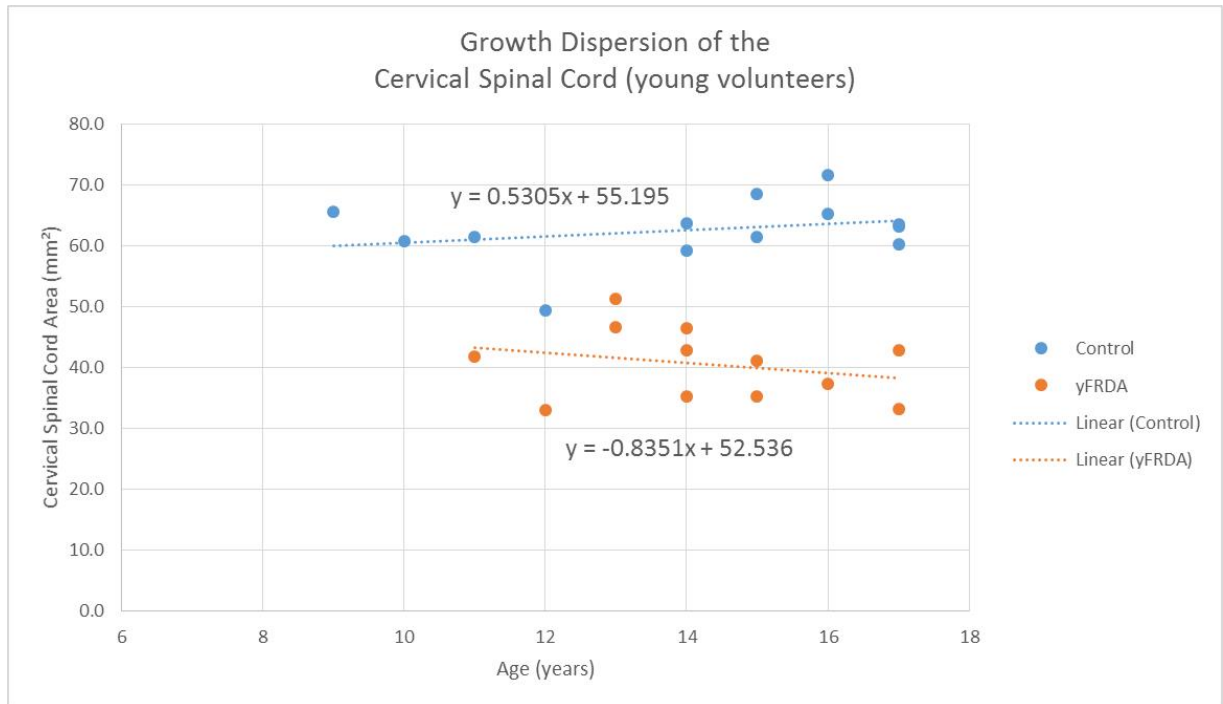


Figura 27: Estudo 5 - Figure 5: Linear regression of cervical spinal cord area and age for yFRDA patients and matched healthy controls.

Discussão

Nesta tese empregamos e criamos técnicas de neuroimagem para avaliar diversos temas ainda não abordados na FRDA, tais como: a presença de dano cerebral, a progressão da doença após 1 e 2 anos de seguimento, o padrão de dano entre os diferentes fenótipos da doença e, o mais importante, a identificação das primeiras estruturas acometidas na doença.

A FRDA faz parte de um grupo de doenças bastante raro e pouco estudado no mundo. Contudo, os resultados obtidos podem ser impactantes para os pacientes por fornecer informações a respeito da fisiopatologia da doença e identificação de biomarcadores para ensaios clínicos.

Assinatura do Dado Estrutural na FRDA

A primeira contribuição de nosso trabalho para a literatura foi a identificação da real extensão do dano neuroanatômico na FRDA. Diferentemente dos estudos prévios de imagem, nós homogeneizamos os grupos de pacientes em função da idade e do fenótipo. Com isso, fomos capazes de identificar quais estruturas são inicialmente acometidas pela doença e como elas evoluem, o comportamento dela em cada fenótipo (forma clássica e de início tardio) e, podemos compreender indiretamente como os baixos níveis de frataxina se relacionam com o desenvolvimento dos pacientes e a evolução do dano cerebral.

Até o presente trabalho, os estudos de imagem e patológicos na FRDA, em sua maioria, identificaram perda neuronal nos gânglios da raiz dorsal, alterações nos fascículos grácil e cuneiforme nas colunas dorsais da medula espinhal, atrofia de tronco, NDC e pedúnculos cerebelares em pacientes adultos e heterogêneos quanto ao fenótipo (4-6, 14, 62). Nosso primeiro e segundo estudos identificaram, além das alterações já citadas, danos no trato piramidal, corpo caloso, SC profunda (tálamo, putâmen, núcleo caudado) e córtex cerebral, principalmente atrofia do giro précentral e hipocampo em pacientes adultos e com a forma clássica da doença. Estes achados ainda não haviam sido descritos na literatura e, especificamente, o dano no córtex motor vai de encontro a estudos *post-mortem* que mostram redução de volume das células de Betz na camada V do córtex motor (14). Os primeiros estudos de imagem provavelmente

falharam em identificar tais anormalidades por causa do pequeno tamanho da amostra, uso de imagens adquiridas em um equipamento de 1,5 T e heterogeneidade da amostra quanto a idade e subtipo clínico dos pacientes (4, 5, 62).

No segundo estudo, realizamos o primeiro ensaio de imagem comparando os dois subtipos clínicos da FRDA. Nele, nós observamos que o dano em pacientes com LOFA é similar ao encontrado nos pacientes clássicos, mas restrito ao trato piramidal, pedúnculos cerebelares, fórnix, tálamo e córtex motor. O dano mais restrito nestes indivíduos está relacionado a base genética da doença, pois repetições de GAA mais curtas levam a um déficit de expressão menos severo de frataxina (14, 63), e por isso, um impacto neuroanatômico menor.

Na FRDA, sabe-se que os maiores sítios de neurodegeneração são os pedúnculos cerebelares e o trato piramidal (4-6, 14, 62). Porém, não se sabe onde o dano neurológico começa e como ele evolui. Para responder esta pergunta, nós recrutamos pacientes pediátricos (com idade <18 anos), tal como apresentado no quinto estudo, e, de fato, esta foi a grande contribuição de nosso trabalho na literatura. Nós identificamos anormalidades na medula espinhal cervical, pedúnculos cerebelares inferiores e núcleo rubro. Estas regiões também são encontradas nos pacientes adultos, reforçando a consistência dos achados. Em termos de patologia, nossos achados estão em acordo com um estudo prévio publicado por Koeppen et al. (2017); nele os autores foram capazes de identificar a redução da área da medula espinhal e diminuição de fibras mielinizadas na coluna dorsal de pacientes pediátricos (64).

Contribuição para Caracterização Fenotípica e Fisiopatologia da Doença

A FRDA se caracteriza fundamentalmente por uma ataxia de início juvenil, mas existem alguns outros sintomas clínicos que não são explicados por alterações no cerebelo e conexões (4-6, 62), como exemplo a presença de sinais piramidais, distúrbios comportamentais e declínio cognitivo leve (14, 15, 65, 66). Os sinais piramidais, interessante, não apresentam o mesmo comportamento nos pacientes LOFA e clássicos. Neste sentido, possíveis

diferenças de danos estruturais e, até mesmo, funcionais entre estes dois fenótipos devem ser consideradas.

Nos pacientes com a forma clássica da FRDA, as principais estruturas acometidas são o trato córtico-espinhal e as conexões cerebelares. O comprometimento de tais estruturas ajuda a explicar os principais sintomas motores da doença, a ataxia e os sinais piramidais. As lesões de SB encontradas no corpo caloso, hipocampo, fórnix e vias ligando o cerebelo ao tálamo e ao córtex pré-frontal, podem explicar os déficits cognitivos leves (executivo e visuoespacial) encontrados nestes pacientes (65). Além disso, nós também encontramos lesões em áreas do sistema límbico que é uma região estreitamente relacionada a distúrbios de comportamento. Tal achado pode estar associado aos distúrbios de humor comuns na doença, conforme detalhado por Bonilha et al., (2014) que identificou 36,3% dos pacientes com FRDA tendo depressão.

Os sinais piramidais, marcados pela presença de espasticidade, hiper-reflexia e sinal de Babinski, têm sido descritos como mais exuberantes e frequentes em pacientes com LOFA do que na forma clássica, sendo um dos principais sinais para diferenciar os subtipos clínicos e até para diagnóstico em pacientes com início muito tardio da doença (15). Nossos dados mostraram que o trato córtico-espinhal se apresentou com dano microestrutural mais proeminente no grupo LOFA, explicando os sintomas piramidais mais proeminentes nesse grupo.

Em termos da fisiopatologia da doença, nós acreditamos que o padrão de dano encontrado para cFRDA e LOFA levanta informações relevantes a respeito da perda neuronal relacionada ao baixo nível de frataxina. Ao comparar estes dois grupos, parece que os baixos níveis de frataxina determinam um dano neuronal seletivo dependendo da magnitude e duração da deficiência. Se considerarmos que pacientes com FRDA, de modo geral, estão sob os efeitos deletérios da redução de frataxina desde que eles são concebidos, temos que a exposição aos baixos níveis de frataxina é diferente entre os fenótipos e, é razoável supor que os pacientes com LOFA experimentam maior tempo de exposição a tais efeitos, pois são, em média, mais velhos que os pacientes cFRDA. Neste sentido, hipotetizamos que o trato córtico-espinhal é mais

resistente aos efeitos deletérios da perda de frataxina a curto prazo e, portanto, o dano apareceria tardiamente no curso da doença, justificando o trato córtico-espinhal estar pior nos LOFAs e, portanto, a presença dos sintomas piramidais mais exuberantes nestes pacientes. Outra hipótese seria que pequenas e grandes expansões de GAA levam ao processo neurodegenerativo através de mecanismos bioquímicos distintos. Alguns tratos específicos, como a via córtico-espinhal, podem ser preferencialmente afetados em um cenário de pequenas expansões de GAA, os quais são típicos para LOFAs. De fato, há alguns estudos que mostram que a assinatura neuropatológica, a nível celular, é levemente diferente entre os grupos de cFRDA e LOFA (14), reforçando nossos achados.

A atrofia da medula espinhal é uma característica marcante e bem descrita na literatura da FRDA (14, 26). Contudo, têm surgido debates acerca da origem e causa deste dano, ou seja, se a atrofia da medula é dada por atrofia, hipoplasia ou ambos (64, 67). Do estudo 5, é possível observar que não há diferença entre a área medular de pacientes pediátricos e adultos. Este resultado é muito forte, pois a média de idade para cada grupo de pacientes (pediátricos e adultos) é 14 e 28 anos respectivamente. Além disso, se analisarmos a figura 5 deste estudo, ou seja, o gráfico da área da medula vs a idade do sujeito, notamos que a medula para de crescer por volta dos 10 anos de idade e então começa a atrofiar. Em um estudo neuropatológico com 2 pacientes pediátricos, os autores mostraram que estes dois indivíduos (óbito aos 10 e 11 anos de idade) não apresentavam diferença de tamanho da área medular quando comparados com pacientes adultos (64). Além disso, estes autores também mostraram que controles e pacientes com FRDA possuem diferentes curvas de crescimento medular, onde os pacientes, além de não atingirem valores dentro da normalidade, permanecem com a área inalterada durante todo o curso da doença (64). Em um outro estudo de imagem, Mascalchi et al. (2017) demonstraram que a medula permanece estável depois de 4 anos de seguimento. Neste sentido, nossos resultados, atrelados aos demais, apontam para um distúrbio de desenvolvimento seguido de um processo neurodegenerativo. Não obstante, em um estudo com modelo animal de FRDA os autores observaram que os embriões de camundongos morriam após a deleção do gene (68), sugerindo que a frataxina desempenha um importante

papel no desenvolvimento fetal. Além disso, há relatos de pais de pacientes com FRDA que afirmam que seus filhos possuem retardo no aprendizado motor quando comparados com seus irmãos saudáveis (64).

Além da medula, os pacientes pediátricos também apresentaram danos no pedúnculo cerebelar inferior e no núcleo rubro. A primeira estrutura contém a maior parte das fibras aferentes que, chegando da medula espinhal, atingem o córtex cerebelar. Neste sentido, o envolvimento do pedúnculo cerebelar inferior logo no começo da doença pode refletir o dano sofrido de tratos espinocerebelares que vêm da medula. Por outro lado, o núcleo rubro está diretamente ligado ao NDC, sendo este último um dos principais sítios de degeneração da FRDA. Portanto, assumimos que a redução volumétrica dos núcleos rubros em pacientes pediátricos com FRDA pode estar relacionada à lesão nos tratos que saem do NDC e passam pelos pedúnculos cerebelares superiores. De fato, há estudos relacionando lesões nestas estruturas com incoordenação motora na doença (30, 68, 69).

Para compreender a disfunção no metabolismo do ferro, tentamos desenvolver uma sequência de aquisição dedicada a identificar este metal no cérebro e implementamos um ferramental para analisar estas imagens. Infelizmente, não encontramos nenhum resultado significativo. Neste sentido, sugere-se que pacientes com FRDA não possuem acúmulo de ferro no cérebro, somente no núcleo denteado do cerebelo (18). Porém, não podemos descartar que a ausência de resultados possa ser devida a questões metodológicas. Neste cenário, a escolha da ferramenta de segmentação pode resultar em medidas ruidosas, pois imagens ponderadas em T2/T2* possuem pouco contraste entre córtex, líquor e SB, e a “contaminação” das medidas pelos outros dois tecidos (líquor e SB) torna-se importante se o método de segmentação não for robusto. Para as análises, nós utilizamos a segmentação do FreeSurfer, porém em um estudo colaborativo com a Faculdade de Medicina da *Johns Hopkins University*, nós investigamos a reprodutibilidade e estabilidade dos métodos de segmentação. Encontramos que o FreeSurfer, em comparação com o T1 MultiAtlas, é bem menos reprodutível, logo as medidas tendem a ser mais ruidosas. Uma outra opção é que a sequência desenvolvida por nós, ponderada

em T2/T2*, pode não ter sensibilidade suficiente para identificar os depósitos de ferro no cérebro.

Biomarcadores de Imagem

Atualmente ainda não há tratamentos aprovados para FRDA e, com isso, estudos clínicos a fim de investigar possíveis terapias são necessários e urgentes. Alguns ensaios clínicos vêm sendo feitos (70), mas a falta de medidas de desfecho sensíveis o suficiente para avaliar a melhora ou piora dos pacientes ainda é uma grande limitação. Todos os estudos empregam escalas clínicas, tais como a FARS ou a SARA (*Scale for Assessment and Rating of Ataxia*) (71), como medidas de desfecho primárias. Contudo, estas escalas não são sensíveis o suficiente para detectar mudanças longitudinais em um curto intervalo de tempo. Neste sentido, avaliar outras métricas, como por exemplo dados de MRI, torna-se fundamental. No entanto, para isso é importante que tais dados tenham sensibilidade para identificar mudanças a curto prazo e que estas mudanças se correlacionem com dados clínicos (duração e gravidade da doença).

A gravidade da doença, expressa pelo escore FARS, se correlacionou com o dano na SC e SB do cerebelo e suas conexões, bem como a redução volumétrica do núcleo denteado. Além disso, alterações microestruturais do corpo caloso também se correlacionaram com a piora motora dos pacientes. Uma vez que esta estrutura é a maior comissura de SB no cérebro e desempenha importantes funções na execução de tarefas motoras complexas pela transferência de *inputs* sensitivos entre os hemisférios, ela se torna um biomarcador útil na FRDA. Além disso, nós observamos dano microestrutural progressivo em um curto período de 1 ano no trato córtico-espinhal, pedúnculo cerebelar superior e corpo caloso, reforçando o potencial desta última estrutura como biomarcador.

Ao contrário das análises de SB, as técnicas volumétricas não mostraram progressão da atrofia depois de 1 ou 2 anos de seguimento. Este achado está de acordo com a lenta progressão da doença. Achados similares, a aparente falta de progressão, também foram reportados por estudos de nosso grupo em outras ataxias hereditárias, tais como a SCA3 (doença de Machado-Joseph). Talvez, sejam necessários maiores intervalos entre as imagens para detectar

alguma mudança. Outra alternativa seria avaliar e seguir predominantemente crianças e adolescentes com FRDA nos quais ainda não existe uma neurodegeneração expressiva.

Nós não encontramos nenhuma correlação entre os dados de imagem e os parâmetros clínicos no grupo LOFA. Ao contrário, o grupo clássico mostrou correlações significativas - tal como o volume do mesencéfalo que se correlacionou tanto com a duração quanto com a gravidade da doença. No entanto, deve-se enfatizar que nós recrutamos uma pequena coorte de pacientes, e a falta de correlação pode ser simplesmente um problema de poder estatístico. Contudo, pode ser que os dados clínicos se comportem de forma diferente para FRDA clássicos e LOFAs. Logo, nossos resultados indicam, para doenças hereditárias degenerativas, que qualquer métrica de imagem deve ser validada para todos os fenótipos e estágios de uma doença antes de seu uso definitivo como medida de desfecho em ensaios clínicos. O mesmo comportamento foi observado nos pacientes pediátricos, reforçando a hipótese comentada anteriormente.

Por fim, o presente estudo apresenta novos achados na FRDA e, mais do que isso, aborda e responde questões importantes acerca da fisiopatologia e variabilidade fenotípica da doença.

Perspectivas Futuras

A falta de estudos longitudinais na FRDA é uma das grandes limitações para compreender a fisiopatologia da doença. Destacamos que estudos com tempo longo de acompanhamento de pacientes com doença inicial são inexistentes. Tal empreitada mostraria a evolução de fato da doença, bem com traria informações relevantes acerca do papel da frataxina no corpo humano. Outra perspectiva de interesse seria avaliar de forma prospectiva pais e mães dos pacientes. Estes indivíduos são portadores da alteração genética em um dos alelos apenas, e seria válido determinar se isto teria algum impacto estrutural, sobretudo no longo prazo. De fato, há estudos mostrando que pacientes com FRDA e os portadores possuem o mesmo nível de expressão de frataxina em linfócitos (63). Logo, se a frataxina desempenhar uma função do desenvolvimento embrionário, estes indivíduos podem ter algum grau de lesão. Além disso, deve-se investigar a expressão dessa proteína em outros tecidos e verificar se os níveis de frataxina permanecem iguais entre portadores e doentes, mas ambos diferentes dos controles saudáveis.

Mais estudos de imagem comparando os fenótipos da doença devem ser feitos. Até o presente momento, não há outro estudo comparando LOFA e cFRDA senão o nosso. Infelizmente, nosso levantamento tem restrição quanto à quantidade de pacientes LOFA avaliados, de modo que estudos com mais indivíduos são necessários. Além disso, um estudo comparando LOFAs com pouco tempo de doença contra LOFAs com muito tempo de doença seria interessante para avaliar se a progressão da doença é igual à da forma clássica. Compreendemos que são tarefas árduas, pois a doença é rara, sendo necessário, então, cooperação entre múltiplos centros.

Conclusão

1. Pacientes com ataxia de Friedreich possuem lesões no corpo caloso, núcleo denteado do cerebelo, pedúnculos cerebelares, córtex motor e trato piramidal;
2. Pacientes com ataxia de Friedreich possuem lesões progressivas no corpo caloso, núcleo denteado do cerebelo e trato piramidal;
3. Pacientes com ataxia de Friedreich com a forma clássica e de início tardio possuem um padrão de dano estrutural similar, mas não idêntico, e que ajuda a explicar as diferenças fenotípicas entre eles;
4. Não fomos capazes de identificar depósitos de ferro no cérebro dos pacientes com ataxia de Friedreich;
5. As regiões inicialmente afetadas na ataxia de Friedreich são a medula espinhal, pedúnculo cerebelar inferior e núcleo rubro.

Referências

1. Campuzano V, Montermini L, Molto MD, et al. Friedreich ' s ataxia: autosomal recessive disease caused by anintronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 1996;271:1423 – 7.
2. Pandolfo M. Friedreich ataxia. *Arch Neurol* 2008;65:1296-303.
3. Bhidayasiri R, Perlman SL, Pulst SM, et al. (2005): Late-onset Friedreich ataxia: phenotypic analysis, magnetic resonance imaging findings, and review of the literature. *Arch Neurol* 629:1865 – 9.
4. Della Nave R, Ginestroni A, Diciotti S, et al. Axial diffusivity is increased in the degenerating superior cerebellar peduncles of Friedreich's ataxia. *Neuroradiology* 2011; 53: 367-72.
5. Della Nave R, Ginestroni A, Giannelli M, et al. Brain structural damage in Friedreich's ataxia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008;79:82-5.
6. França Jr MC, D'Abreu A, Yassuda CL, et al. A combined voxel-based morphometry and H-MRS study in patients with Friedreich's ataxia. *J Neurol* 2009;256:1114-20.
7. Akhlaghi H, Corben L, Georgiou-Karistianis N, et al. Superior cerebellar peduncle atrophy in Friedreich's ataxia correlates with disease symptoms. *Cerebellum* 2011; 10: 81-7.
8. Silva CB, Yasuda CL, D'Abreu A, et al. Neuroanatomical correlates of depression in Friedreich's ataxia: a voxel-based morphometry study. *Cerebellum* 2012;12:429-436.
9. Hanna MG, Davis MB, Sweeney MG, et al. Generalized chorea in two patients harboring the Friedreich's ataxia gene trinucleotide repeat expansion. *Mov Disord* 1998;13:339-340.
10. Mantovan MC, Martinuzzi A, Squarzanti F, et al. Exploring mental status in Friedreich's ataxia: a combined neuropsychological, behavioral and neuroimaging study. *Euro J Neurol* 2006;13:827- 835.

11. Bonilha da Silva C, Bergo FP, D'Abreu A, et al. Dentate nuclei T2 relaxometry is a reliable neuroimaging marker in Friedreich's ataxia. *Euro J Neurol* 2014;21:1131-1136.
12. Santner W, Schoke M, Boesch S, et al. A longitudinal VBM study monitoring treatment with erythropoietin in patients with Friedreich ataxia. *Acta Radiol* 2014;3:1-6.
13. Abrahão A, Pedroso JL, Braga-Neto P, et al. (2015): Milestones in Friedreich ataxia: more than a century and still learning. *Neurogenetics* 16:151 – 60.
14. Koeppen AH. Friedreich's ataxia: pathology, pathogenesis and molecular genetics. *J Neurol Sci* 2011;303:1-12.
15. Martinez ARM et al. Nonneurological involvement in late-onset Friedreich ataxia (LOFA): Exploring the phenotypes. *Cerebellum* 2017;16:253–256.
16. Chiang S, Kalinowski DS, Jansson PJ, Richardson DR, Huang ML. Mitochondrial dysfunction in the neuro-degenerative and cardio-degenerative disease, Friedreich's ataxia. *Neurochem Int.* 2017:1730371-6.
17. Morral JA, Davis AN, Qian J, Gelman BB, Koeppen AH. Pathology and pathogenesis of sensory neuropathy in Friedreich's ataxia. *Acta Neuropathol* 2010;120:97-108.
18. Koeppen AH, Ramirez RL, Yu D, Collins SE, Qian J, Parsons PJ, et al. Friedreich's ataxia causes redistribution of iron, copper and zinc in the dentate nucleus. *Cerebellum* 2012;11:845- 60.
19. Koeppen AH, Michael SC, Knutson MD, Haile DJ, Qian J, Levi S, et al. The dentate nucleus in Friedreich's ataxia: the role of iron-responsive proteins. *Acta Neuropathol.* 2007;114:163-73.
20. Mateo I, Llorca J, Volpini V, Corral J, Berciano J, Combarros O. GAA expansion size and age at onset of Friedreich's ataxia. *Neurology* 2003;61:274-5.
21. La Pean A, Jeffries N, Grow C, Ravina B, Di Prospero NA. Predictors of progression in patients with Friedreich ataxia. *Mov Disord* 2008;23:2026-32.

22. Haacke EM, Brown RW, Thompson MR, Venkatesan R. Magnetic resonance imaging: physical principles and sequence design. Vol. 82. New York: Wiley-Liss, 1999.
23. Alexander AL, Hurley SA, Samsonov AA, et al. Characterization of cerebral white matter properties using quantitative magnetic resonance imaging stains. *Brain Connect.* 2011;1:423–46.
24. De Michele G, Di Salle F, Filla A, et al. Magnetic resonance imaging in —typicall and —late onsetll Friedreich’s disease and early onset cerebelar ataxia with retained tendo reflexes. *J Neurol Sci.* 1995;16:303-8.
25. Klockgether T, Petersen D, Grodd W, Dichgans J. Early onset cerebelar ataxia with retained tendon reflexes. Clinical, eletrophysiological and MRI observations in comparisson with Friedreich’s ataxia. *Brain.* 1991;114:1559-73.
26. Chevis CF, da Silva CB, D'Abreu A, et al. Spinal cord atrophy correlates with disability in Friedreich's ataxia. *Cerebellum.* 2013;12:43-7.
27. Cohen-Adad J. What can we learn from T2* maps of the cortex? *Neuroimage.* 2014;93:189-200.
28. Lotfipour AK, Wharton S, Schwarz ST, et al. High resolution magnetic susceptibility mapping of the substantia nigra in Parkinson’s disease. *Journal of magnetic resonance imaging,* 2012;35:48–55.
29. Hohenberg CC, Schoke MF, Wigand MC, et al. Radial diffusivity in cerebellar peduncles correlates with clonical severity in Friedreich ataxia. *Neurol Sci* 2013; 34: 1459-62.
30. Akhlaghi H, Yu J, Corben L, et al. Cognitive deficits in Friedreich ataxia correlate with micro-structural changes in dentatorubral tract. *Cerebellum* 2014;13:187-198.
31. Boddaert N, Le Quan Sang KH, Rötig A, et al. Selective iron chelation in Friedreich ataxia: biologic and clinical implications. *Blood.* 2007;110:401-408.
32. Rumzan R, Wang JJ, Zeng C, et al. Iron deposition in the precentral grey matter in patients with multiple sclerosis: a quantitative study using susceptibility-weighted imaging. *Eur J Radiol.* 2013;82:95-99.

33. Subramony SH, May W, Lynch DR, et al. Measuring Friedreich ataxia: Interrater reliability of a neurologic rating scale. *Neurology* 2005; 64: 1261-2.
34. Ashburner JA. A fast diffeomorphic image registration algorithm. *Neuroimage* 2007; 38: 95-113.
35. Talairach J, Tournoux P. Co-planar Stereotaxic Atlas of the Human Brain, Thieme, NY. 1988.
36. Dale AM, Sereno MI. Improved localization of cortical activity by combining EEG and MEG with MRI cortical surface reconstruction. *J. Cogn. Neurosci.* 1993;5:162–176.
37. Fischl B, Liu A, Dale AM. Automated manifold surgery: constructing geometrically accurate and topologically correct models of the human cerebral cortex. *IEEE Trans. Med. Imaging* 2001;20:70–80.
38. Fischl B, Dale AM. Measuring the thickness of the human cerebral cortex from magnetic resonance images. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 11050-5.
39. Desikan RS, Ségonne F, Fischl B, et al. An automated labeling system for subdividing the human cerebral cortex on mri scans into gyral based regions of interest. *NeuroImage* 2006;31:968–980.
40. Fischl B, van der Kouwe A, Destrieux C, et al. Automatically parcellating the human cerebral cortex. *Cereb. Cortex* 2004;14:11–22.
41. Fischl B, Sereno MI, Tootell RB, Dale AM. High-resolution intersubject averaging and a coordinate system for the cortical surface. *Hum. Brain Mapp.* 1999b;8:272–284.
42. Fischl B, Salat DH, Busa E, et al. Whole brain segmentation: automated labeling of neuroanatomical structures in the human brain. *Neuron* 2002;33:341–355.
43. Tustison NJ, Avants BB, Cook PA, et al. N4ITK: improved N3 bias correction. *IEEE Trans Med Imaging* 2010;29:1310 – 1320.

44. Tang X, Crocetti D, Kutten K, et al. Segmentation of brain magnetic resonance images based on multi-atlaslikelihood fusion: testing using data with a broad range of anatomical and photometric profiles. *Front Neurosci.* 2015;3;9:61
45. Miller MI, Beg MF, Ceritoglu C, Stark C. Increasing the power of functional maps of the medial temporal lobe by using large deformation diffeomorphic metric mapping. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005;102:9685–9690.
46. Wang H, Pouch M, Takabe B, et al. "Multi-atlas segmentation with robust label transfer and label fusion." *Inf Process Med Imaging* 2013;23: 548-559.
47. Djamanakova A, Tang X, Li X, et al. Tools for multiple granularity analysis of brain MRI data for individualized image analysis. *Neuroimage* 2014;101:168-76.
48. Wu D, Ma T, Ceritoglu C et al. Resource atlases for multi-atlas brain segmentations with multiple ontology levels based on T1-weighted MRI. *Neuroimage.* 2016;125:120-30.
49. Towns J, Cockerill T, Dahan M, et al. XSEDE: accelerating scientific discovery. *Comput Sci Eng* 2014;16:13.
50. Romero JE, Coupé P, Giraud R, et al. CERES: A new cerebellum lobule segmentation method. *Neuroimage.* 2017;147:916-924.
51. Coupé P, Manjón JV, Fonov V, et al. Patch-based Segmentation using Expert Priors: application to Hippocampus and Ventricle Segmentation. *NeuroImage* 2011;54:940–954.
52. Zhuang J, Hrabec J, Kangarlu A, et al. Correction of eddy-current distortions in diffusion tensor images using the known directions and strengths of diffusion gradients. *J. Magn. Reson. Imaging* 2006;24:1188–1193.
53. Jiang H, van Zijl PC, Kim J, et al. DtiStudio: resource program for diffusion tensor computation and fiber bundle tracking. *Comput. Methods Prog. Biomed.* 2006;81:106–116.
54. Tang X, Shoko Y, Hsu John, et al. Multi-contrast multi-atlas parcellation of diffusion tensor imaging of the human brain. *Plos One.* 2014;9;5:e96985.

55. Smith SM, Jenkinson M, Woolrich MW, et al. Advances in functional and structural MR image analysis and implementation as FSL. *Neuroimage* 2004; 23: S208-19.
56. Smith SM, Jenkinson M, Johansen-Berg H, et al. Tract-based spatial statistics: voxelwise analysis of multi-subject diffusion data. *Neuroimage* 2006; 31: 1487-505.
57. Menke RA, Körner S, Filippini N, et al. Widespread grey matter pathology dominates the longitudinal cerebral MRI and clinical landscape of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2014; 137: 2546-55.
58. Reuter M, Rosas HD, Fischl B. Highly accurate inverse consistent registration: a robust approach. *Neuroimage*. 2010; 53: 1181-96.
59. Bergo FPG, França MCJr, Chevis CF, Cendes F . SpineSeg: A Segmentation and Measurement Tool for Evaluation of Spinal Cord Atrophy. In: CISTI'2012 (7^a Conferencia Ibérica de Sistemas y Tecnología de Información). Madrid, Spain: IEEE; 2012:400 – 3.
60. Bergo FPG, Falcão AX, Miranda PAV, et al. Automatic image segmentation by tree pruning. *J Math Imaging Vis* 2007;29:141-62.
61. Branco LM, De Albuquerque M, De Andrade HM, Bergo FP, Nucci A, França Jr MC. Spinal cord atrophy correlates with disease duration and severity in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2014;15:93–7.
62. Pagani E, Ginestroni A, Della Nave R, et al. Assessment of brain white matter bundle atrophy in patients with Friedreich ataxia. *Radiology* 2010; 255: 882-7.
63. Saccà F, Puorro G, Antenora A, et al. A combined nucleic acid and protein analysis in Friedreich ataxia: implications for diagnosis, pathogenesis and clinical trial design. *PLoS One*. 2011;11;6:e17627.
64. Koeppen AH, Becker AB, Qian J, Feustel PJ. Friedreich Ataxia: Hypoplasia of Spinal Cord and Dorsal Root Ganglia. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2017;76:101-108.

65. Nieto A, Correia R, de Nóbrega E, et al. Cognition in late-onset Friedreich ataxia. *Cerebellum* 2013;12:504-12.
66. Silva CB, Yasuda CL, D'Abreu A, et al. Neuroanatomical correlates of depression in Friedreich's ataxia: a voxel-based morphometry study. *Cerebellum*. 2013;12:429-36.
67. Mascalchi M, Bianchi A, Ciulli S, et al., Lower medulla hypoplasia in Friedreich . ataxia: MR Imaging confirmation 140 years later. *J Neurol*. 2017;264:1526-1528.
68. Cossée M, Puccio H, Gansmuller A et al. Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Hum Mol Genet*. 2000;9:1219-26.
68. Habas C, Guillevin R, Abanou A. In vivo structural and functional imaging of the human rubral and inferior olivary nuclei: A minireview. *Cerebellum* (London, England). 2010;9(2):167–73.
69. Nioche C, Cabanis EA, Habas C. Functional connectivity of the human red nucleus in the brain resting state at 3T. *Ajnr*. 2009;30(2): 396–403.
70. Aranca TV, Jones TM, Shaw JD et al., Emerging therapies in Friedreich's ataxia. *Neurodegener Dis Manag*. 2016;6:49-65.
71. 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.

ANEXO I

Programa para calcular os mapas de relaxação transversal.

```

clear
clc

regr_type = 'Linear';

%Enter T1 images
[file_vbm, path_vbm] = uigetfile('*.nii','Enter with T1-Images','MultiSelect','on');
file_vbm = cellstr(file_vbm);

%Enter T2 images
[file_T2, path_T2] = uigetfile('*.nii','Enter with T2-Images','MultiSelect','on');
file_T2 = cellstr(file_T2);

%Sort them
file_vbm = sort(file_vbm);
file_T2 = sort(file_T2);

for i = 1:size(file_vbm,2)
    file_vbm{i} = [path_vbm file_vbm{i}];
end

%Transpose de image vectors
file_vbmt = transpose(file_vbm);

%Mask for skull stripping
%Segmentation of T1 images
for j = 1:size(file_vbmt,1)

    clear matlabbatch

    matlabbatch{1}.spm.tools.oldseg.data = file_vbmt(j);
    matlabbatch{1}.spm.tools.oldseg.output.GM = [0 0 1];
    matlabbatch{1}.spm.tools.oldseg.output.WM = [0 0 1];
    matlabbatch{1}.spm.tools.oldseg.output.CSF = [0 0 1];
    matlabbatch{1}.spm.tools.oldseg.output.biascor = 1;
    matlabbatch{1}.spm.tools.oldseg.output.cleanup = 0;
    matlabbatch{1}.spm.tools.oldseg.opts.tpm = {
        'E:\Thiago_Junqueira\toolboxes\spm12\spm12\toolbox\OldSeg\grey.nii'
        'E:\Thiago_Junqueira\toolboxes\spm12\spm12\toolbox\OldSeg\white.nii'
        'E:\Thiago_Junqueira\toolboxes\spm12\spm12\toolbox\OldSeg\csf.nii'
    };
    matlabbatch{1}.spm.tools.oldseg.opts.ngaus = [2 2 2 4];
    matlabbatch{1}.spm.tools.oldseg.opts.regtype = 'mni';
    matlabbatch{1}.spm.tools.oldseg.opts.warpreg = 1;
    matlabbatch{1}.spm.tools.oldseg.opts.warpco = 25;
    matlabbatch{1}.spm.tools.oldseg.opts.biasreg = 0.0001;
    matlabbatch{1}.spm.tools.oldseg.opts.biasfwhm = 60;
    matlabbatch{1}.spm.tools.oldseg.opts.samp = 3;
    matlabbatch{1}.spm.tools.oldseg.opts.msk = {''};

    spm_jobman('run',matlabbatch)

end

```

```

clear j

%List p1 and p2 images
GM_map = dir([path_vbm 'c1*.nii']);
WM_map = dir([path_vbm 'c2*.nii']);
CSF_map = dir([path_vbm 'c3*.nii']);

%Organize these images
for i = 1:size(GM_map,1)
    input1{i,1} = [path_vbm GM_map(i).name];
    input2{i,1} = [path_vbm WM_map(i).name];
    input2_1{i,1} = [path_vbm CSF_map(i).name];
    output1{i,1} = ['cl1_' GM_map(i).name];
    output2{i,1} = ['cl2_' WM_map(i).name];
    output2_1{i,1} = ['cl3_' CSF_map(i).name];
end

clear i

%Perform the binary for each tissue
for k = 1:size(file_vbmt,1)

    clear matlabbatch
    thre = 'i1>0.3'; %Arbitrary threshold

    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.input = input1(k,1);
    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.output = output1{k,1};
    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.outdir = {path_vbm};
    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.expression = thre;
    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.options.dmtx = 0;
    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.options.mask = 0;
    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.options.interp = 1;
    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.options.dtype = 4;

    matlabbatch{2}.spm.util.imcalc.input = input2(k,1);
    matlabbatch{2}.spm.util.imcalc.output = output2{k,1};
    matlabbatch{2}.spm.util.imcalc.outdir = {path_vbm};
    matlabbatch{2}.spm.util.imcalc.expression = thre;
    matlabbatch{2}.spm.util.imcalc.options.dmtx = 0;
    matlabbatch{2}.spm.util.imcalc.options.mask = 0;
    matlabbatch{2}.spm.util.imcalc.options.interp = 1;
    matlabbatch{2}.spm.util.imcalc.options.dtype = 4;

    matlabbatch{3}.spm.util.imcalc.input = input2_1(k,1);
    matlabbatch{3}.spm.util.imcalc.output = output2_1{k,1};
    matlabbatch{3}.spm.util.imcalc.outdir = {path_vbm};
    matlabbatch{3}.spm.util.imcalc.expression = thre;
    matlabbatch{3}.spm.util.imcalc.options.dmtx = 0;
    matlabbatch{3}.spm.util.imcalc.options.mask = 0;
    matlabbatch{3}.spm.util.imcalc.options.interp = 1;
    matlabbatch{3}.spm.util.imcalc.options.dtype = 4;

    spm_jobman('run',matlabbatch)

end

clear k

```

```

cl1_GM = dir([path_vbm 'cl1*.nii']);
cl2_WM = dir ([path_vbm 'cl2*.nii']);
cl3_CSF = dir ([path_vbm 'cl3*.nii']);

for i = 1:size(cl1_GM,1)
    input3{1,i} = [path_vbm cl1_GM(i).name];
    input3{2,i} = [path_vbm cl2_WM(i).name];
    input3{3,i} = [path_vbm cl3_CSF(i).name];
    output3{i,1} = ['sum_' GM_map(i).name];
end

clear i

%create the mask
for j = 1:size(input3,2)

    clear matlabbatch

    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.input = input3(1:size(input3,1),j);
    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.output = output3{j,1};
    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.outdir = {path_vbm};
    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.expression = 'i1+i2+i3';
    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.options.dmtx = 0;
    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.options.mask = 0;
    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.options.interp = 1;
    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.options.dtype = 4;

    spm_jobman('run',matlabbatch)

end

clear j

sum = dir([path_vbm 'sum*.nii']);

for k = 1:size(input3,2)
    input4{k,1} = [path_vbm sum(k).name];
end

clear k

input4 = cellstr(input4);

for j = 1:size(input4,1)
    %smoothie to remove singularity points
    clear matlabbatch
    matlabbatch{1}.spm.spatial.smooth.data = input4{j,1};
    matlabbatch{1}.spm.spatial.smooth.fwhm = [3 3 3];
    matlabbatch{1}.spm.spatial.smooth.dtype = 0;
    matlabbatch{1}.spm.spatial.smooth.im = 0;
    matlabbatch{1}.spm.spatial.smooth.prefix = 's_';

    spm_jobman('run',matlabbatch)

end

```



```

smoothie = dir([path_vbm filesep 's_sum*.nii']);

for i = 1:size(input3,2)
    input5{1,i} = [path_vbm smoothie(i).name];
    input5{2,i} = file_vbmt{i};
    [pathX,nameX,extX] = fileparts(file_vbmt{i});
    output_name = [pathX filesep 'sk_' nameX extX];
    output4{i,1} = output_name;

    clear output_name pathX nameX extX
end

clear smoothie

%T1 skull-stripped
for j = 1:size(input5,2)

    clear matlabbatch

    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.input = input5(1:size(input5,1),j);
    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.output = output4{j,1};
    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.outdir = {path_vbm};
    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.expression = '(i1>1.0).*i2';
    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.options.dmtx = 0;
    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.options.mask = 0;
    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.options.interp = 1;
    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.options.dtype = 4;

    spm_jobman('run',matlabbatch)
end

clear cl1_GM cl2_WM cl3_CSF CSF_map extX GM_map i input1 input2 input2_1...
    input3 input4 input5 j k matlabbatch nameX output1 output2 output2_1...
    output3 output4 output_name pathX smoothie sum thre WM_map;

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%% T2-Quantification %%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

%%%%%%%% Align all volumes from 4D
for i = 1:size(file_T2,2)
    file_T2t{i} = [path_T2 file_T2{i}];
end

for m = 1:size(file_T2t,2)

    for j = 1:5
        img4D{j,1} = [file_T2t{m} ',' num2str(j)];
    end

    img4D = cellstr(img4D);

    clear matlabbatch

    matlabbatch{1}.spm.spatial.realign.estwrite.data = {img4D(1:size(img4D,1),1)};
    matlabbatch{1}.spm.spatial.realign.estwrite.eoptions.quality = 0.9;

```

```

matlabbatch{1}.spm.spatial.realign.estwrite.eoptions.sep = 4;
matlabbatch{1}.spm.spatial.realign.estwrite.eoptions.fwhm = 5;
matlabbatch{1}.spm.spatial.realign.estwrite.eoptions.rtm = 0;
matlabbatch{1}.spm.spatial.realign.estwrite.eoptions.interp = 2;
matlabbatch{1}.spm.spatial.realign.estwrite.eoptions.wrap = [0 0 0];
matlabbatch{1}.spm.spatial.realign.estwrite.eoptions.weight = "";
matlabbatch{1}.spm.spatial.realign.estwrite.roptions.which = [2 0];
matlabbatch{1}.spm.spatial.realign.estwrite.roptions.interp = 4;
matlabbatch{1}.spm.spatial.realign.estwrite.roptions.wrap = [0 0 0];
matlabbatch{1}.spm.spatial.realign.estwrite.roptions.mask = 1;
matlabbatch{1}.spm.spatial.realign.estwrite.roptions.prefix = 'r';

```

```
spm_jobman('run',matlabbatch)
```

```
end
```

```

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%Linear FIT

```

```

switch regr_type
case 'Linear'

```

```
    file_T2reg = dir([path_T2 filesep 'r*.nii']);
```

```
    for k = 1:size(file_T2reg,1)
```

```
        file_T2_calc{k,1} = [path_T2 filesep file_T2reg(k).name];
```

```
    end
```

```
    m = size(file_T2_calc,1);
```

```
    for i = 1:m
```

```
        multiWaitbar('Total_Subjects','Value',i/m,'CancelFcn',@(a,b) disp(['Cancel',a]),'Color',
[0.2 0.9 0.3]);
```

```
        TE = [2.3; 4.6; 6.9; 9.2; 11.5];
```

```
        stru = nifti(file_T2_calc{i,1});
```

```
        mat = stru.dat(:,:,:);
```

```
        [pathX,nameX,extX] = fileparts(file_T2_calc{i,1});
```

```
        output_name = [pathX filesep 'qT2_LIN_' nameX(5:end) extX];
```

```
        stru1 = stru;
```

```
        stru1.dat.fname = output_name;
```

```
        stru1.dat.dim = [240 240 180];
```

```
        stru1.dat.dtype = 'FLOAT32-LE';
```

```
        stru1.dat(:,:,:) = zeros(stru1.dat.dim(1),stru1.dat.dim(2),stru1.dat.dim(3));
```

```
        mat2 = zeros(stru1.dat.dim(1),stru1.dat.dim(2),stru1.dat.dim(3));
```

```
        for z = 1:240
```

```
            multiWaitbar('Subject','Value',z/240,'CancelFcn',@(a,b) disp(['Cancel',a]),'Color', [0.8
0.0 0.1]);
```

```
                for y = 1:240
```

```
                    for x = 1:180
```

```
                        if squeeze(mat(z,y,x,:))>0
```

```
                            lth = squeeze(mat(z,y,x,:));
```

```
                            ln_lth = log(lth);
```

```
                            f = polyfit(TE,ln_lth,1);
```

```

        T2 = abs(1/f(1));
        mat2(z,y,x) = T2;
    end
end
end
end

stru1.dat(:,:,) = mat2;
create(stru1);
clear ith indice ln_lth x y z
end

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%Non-Linear FIT y = a*exp(-b*x)

case 'NonLinear_A'
    file_T2reg = dir([path_T2 filesep 'r*.nii']);

    for k = 1:size(file_T2reg,1)
        file_T2_calc{k,1} = [path_T2 filesep file_T2reg(k).name];
    end

    m = size(file_T2_calc,1);

    for i = 1:m
        multiWaitbar('Total_Subjects','Value',i/m,'CancelFcn',@(a,b) disp(['Cancel',a]),'Color',
[0.2 0.9 0.3]);
        TE = [2.3; 4.6; 6.9; 9.2; 11.5];
        stru = nifti(file_T2_calc{i,1});
        mat3 = stru.dat(:,:,);

        [pathX,nameX,extX] = fileparts(file_T2_calc{i,1});
        output_name = [pathX filesep 'qt2_NONA_' nameX(5:end) extX];

        stru2 = stru;
        stru2.dat.fname = output_name;
        stru2.dat.dim = [240 240 180];
        stru2.dat.dtype = 'FLOAT32-LE';
        stru2.dat(:,:,) = zeros(stru2.dat.dim(1),stru2.dat.dim(2),stru2.dat.dim(3));
        mat4 = zeros(stru2.dat.dim(1),stru2.dat.dim(2),stru2.dat.dim(3));

        for z = 1:240
            multiWaitbar('Subject','Value',z/240,'CancelFcn',@(a,b) disp(['Cancel',a]),'Color', [0.8
0.0 0.1]);
            for y = 1:240
                for x = 1:180
                    if squeeze(mat3(z,y,x,:))>0
                        lth = squeeze(mat3(z,y,x,:));
                        f2 = fit(TE,lth,'exp1');
                        T2_2 = abs(1/f2.b);
                        mat4(z,y,x) = T2;
                    end
                end
            end
        end
    end
end
end
end

```

```

stru2.dat(:,:,:) = mat4;
create(stru2);
clear ith indice x y z
end

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%Non-Linear FIT y = a + b*exp(-c*x)
case 'NonLinear_B'
file_T2reg = dir([path_T2 filesep 'r*.nii']);

for k = 1:size(file_T2reg,1)
file_T2_calc{k,1} = [path_T2 filesep file_T2reg(k).name];
end

m = size(file_T2_calc,1);

for i = 1:m
multiWaitbar('Total_Subjects','Value',i/m,'CancelFcn',@(a,b) disp(['Cancel',a]),'Color',
[0.2 0.9 0.3]);
TE = [2.3; 4.6; 6.9; 9.2; 11.5];
stru = nifti(file_T2_calc{i,1});
mat5 = stru.dat(:,:,:);

[pathX,nameX,extX] = fileparts(file_T2_calc{i,1});
output_name = [pathX filesep 'qT2_NONB_' nameX(5:end) extX];

stru3 = stru;
stru3.dat.fname = output_name;
stru3.dat.dim = [240 240 180];
stru3.dat.dtype = 'FLOAT32-LE';
stru3.dat(:,:,:) = zeros(stru3.dat.dim(1),stru3.dat.dim(2),stru3.dat.dim(3));
mat6 = zeros(stru3.dat.dim(1),stru3.dat.dim(2),stru3.dat.dim(3));

g = fittype('a*exp(-x/b)+c','dependent',{'y'},'independent',{'x'},'coefficients',{'a','b','c'});
options = fitoptions(g);
options.Lower = [0 0 0];
options.Upper = [Inf Inf Inf];
options.Display = 'off';
options.Robust = 'Bisquare';
options.MaxFunEvals = 13824000;

for z = 1:240
multiWaitbar('Subject','Value',z/240,'CancelFcn',@(a,b) disp(['Cancel',a]),'Color', [0.8
0.0 0.1]);
for y = 1:240
for x = 1:180
if squeeze(mat5(z,y,x,:))>500
lth = squeeze(mat5(z,y,x,:));
f2 = fit(TE,lth,g,options);
T2 = abs(1/f2.b);
mat6(z,y,x) = T2;
end
end
end
end
end

```

```

stru3.dat(:,:,:) = mat6;
create(stru3);
clear ith indice x y z
end

end

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%T2 Skull-strip
file_T2reg = dir([path_T2 filesep 'qT2_NONA_*.nii']);
file_s_sum = dir([path_vbm filesep 's_sum*.nii']);

for i = 1:size(file_T2reg,1)
    input6{1,i} = [path_vbm filesep file_s_sum(i).name];
    output5{i,1} = ['mask_' file_T2reg(i).name(5:end)];
end

for j = 1:size(file_T2reg,2)

    clear matlabbatch

    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.input = input6(1,j);
    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.output = output5{j,1};
    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.outdir = {path_T2};
    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.expression = 'i1>1.0';
    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.options.dmtx = 0;
    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.options.mask = 0;
    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.options.interp = 1;
    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.options.dtype = 4;

    spm_jobman('run',matlabbatch)

    clear matlabbatch
end

file_mask = dir([path_T2 filesep 'mask*.nii']);

for k = 1:size(file_T2reg,1)
    input7{1,k} = [path_T2 filesep file_mask(k).name];
    input7{2,k} = [path_T2 filesep file_T2reg(k).name];
    output6{k,1} = ['sk_' file_T2reg(k).name];
end

for j = 1:size(file_T2reg,2)

    clear matlabbatch

    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.input = input7(1:size(input7,1),j);
    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.output = output6{j,1};
    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.outdir = {path_T2};
    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.expression = 'i1.*i2';
    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.options.dmtx = 0;
    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.options.mask = 0;
    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.options.interp = 1;
    matlabbatch{1}.spm.util.imcalc.options.dtype = 16;

```

```

spm_jobman('run',matlabbatch)

clear matlabbatch
end

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%Normalization T2 Maps on MNI152
%img_source = dir([path_vbm filesep '*.nii']); %%% Original Image
img_resample = dir([path_T2 filesep 'sk_qT2_NONA*.nii']);

for k = 1:size(file_vbm,2)
    input8{1,k} = ['sk_' file_vbm{1,k}];
    input8{2,k} = [path_T2 img_resample(k).name];
end

for j = 1:size(input8,2)
    clear matlabbatch

    matlabbatch{1}.spm.spatial.normalise.estwrite.subj.vol = input8(1,j);
    matlabbatch{1}.spm.spatial.normalise.estwrite.subj.resample = input8(2,j);
    matlabbatch{1}.spm.spatial.normalise.estwrite.eoptions.biasreg = 0.0001;
    matlabbatch{1}.spm.spatial.normalise.estwrite.eoptions.biasfwhm = 60;
    matlabbatch{1}.spm.spatial.normalise.estwrite.eoptions.tpm =
    {'E:\Thiago_Junqueira\toolboxes\spm12\spm12\tpm\TPM.nii'};
    matlabbatch{1}.spm.spatial.normalise.estwrite.eoptions.affreg = 'mni';
    matlabbatch{1}.spm.spatial.normalise.estwrite.eoptions.reg = [0 0.001 0.5 0.05 0.2];
    matlabbatch{1}.spm.spatial.normalise.estwrite.eoptions.fwhm = 0;
    matlabbatch{1}.spm.spatial.normalise.estwrite.eoptions.samp = 3;
    matlabbatch{1}.spm.spatial.normalise.estwrite.woptions.bb = [-78 -112 -70 78 76 85];
    matlabbatch{1}.spm.spatial.normalise.estwrite.woptions.vox = [2 2 2];
    matlabbatch{1}.spm.spatial.normalise.estwrite.woptions.interp = 1;
    matlabbatch{1}.spm.spatial.normalise.estwrite.woptions.prefix = 'w';

    spm_jobman('run',matlabbatch)

    clear matlabbatch

end

clear all

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%Extract T2 values from ROIS
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

labels = import_FS_table('FS_table.xlsx');

%Enter T1 images
[file_vbm, path_vbm] = uigetfile('*.nii','Enter with T1-Images','MultiSelect','on');
file_vbm = cellstr(file_vbm);

```

```
%Enter Aseg 2009 images
```

```
[file_label, path_label] = uigetfile('*.nii','Enter with apar2009-Images','MultiSelect','on');
file_label = cellstr(file_label);
```

```
%Enter T2 images
```

```
[file_T2, path_T2] = uigetfile('*.nii','Enter with T2-Images','MultiSelect','on');
file_T2 = cellstr(file_T2);
```

```
%Sort them
```

```
file_label = sort(file_label);
file_T2 = sort(file_T2);
file_vbm = sort(file_vbm);
```

```
for i = 1:size(file_label,2)
    file_label{i} = [path_label file_label{i}];
    file_T2{i} = [path_T2 file_T2{i}];
    file_vbm{i} = [path_vbm file_vbm{i}];
end
```

```
for k = 1:length(file_vbm)
```

```
    clear matlabbatch
```

```
    matlabbatch{1}.spm.spatial.coreg.estwrite.ref = file_vbm(k);
    matlabbatch{1}.spm.spatial.coreg.estwrite.source = file_label(k);
    matlabbatch{1}.spm.spatial.coreg.estwrite.other = {};
    matlabbatch{1}.spm.spatial.coreg.estwrite.eoptions.cost_fun = 'nmi';
    matlabbatch{1}.spm.spatial.coreg.estwrite.eoptions.sep = [4 2];
    matlabbatch{1}.spm.spatial.coreg.estwrite.eoptions.tol = [0.02 0.02 0.02 0.001 0.001 0.001
0.01 0.01 0.01 0.001 0.001 0.001];
    matlabbatch{1}.spm.spatial.coreg.estwrite.eoptions.fwhm = [7 7];
    matlabbatch{1}.spm.spatial.coreg.estwrite.roptions.interp = 0;
    matlabbatch{1}.spm.spatial.coreg.estwrite.roptions.wrap = [0 0 0];
    matlabbatch{1}.spm.spatial.coreg.estwrite.roptions.mask = 0;
    matlabbatch{1}.spm.spatial.coreg.estwrite.roptions.prefix = 'r';
```

```
    spm_jobman('run',matlabbatch)
```

```
end
```

```
file_corLab = dir([path_label 'r*.nii']);
```

```
for k = 1:length(file_corLab)
    file_labReg{k} = [path_label file_corLab(k).name];
end
```

```
%Extract T2 from Labels
```

```
for i=2:size(labels,1)
    table_T2{1,i} = labels{i,2};
end
```

```
for i=1:length(file_T2)
    multiWaitbar('Total_Subjects','Value',i/(length(file_T2)),'CancelFcn',@(a,b)
disp(['Cancel',a]),'Color',[0.2 0.9 0.3]);
    subj_lab = nifti(file_labReg{i});
    mat_lab = subj_lab.dat(:,:,:);
    subj_T2 = nifti(file_T2{i});
```

```

mat_T2 = subj_T2.dat(:,:,:);
[~,nameX,~] = fileparts(file_T2{i});
table_T2{i+1,1} = nameX;

%identify the labels
for j = 2:size(labels,1)
    for x=1:size(mat_lab,1)
        for y=1:size(mat_lab,2)
            for z=1:size(mat_lab,3)
                if mat_lab(x,y,z) == labels{j,1}
                    mat_lab2(x,y,z) = 1;
                else
                    mat_lab2(x,y,z) = 0;
                end
            end
        end
    end
end
%calculate average T2
mat_res = (mat_T2).*(mat_lab2);
row = 1;
for x2=1:size(mat_res,1)
    for y2=1:size(mat_res,2)
        for z2=1:size(mat_res,3)
            if (mat_res(x2,y2,z2) > 0) && (isnan(mat_res(x2,y2,z2)) ~= 1)
                T2v(row,1) = mat_res(x2,y2,z2);
                row = row + 1;
            end
        end
    end
end
%fill the table
multiWaitbar('Subject','Value',j/(size(labels,1)),'CancelFcn',@(a,b) disp(['Cancel',a]),'Color',
[0.8 0.0 0.1]);
if exist('T2v') == 1
    table_T2{i+1,j} = mean(T2v);
else
    table_T2{i+1,j} = 'NaN';
end
clear row T2v mat_res x2 y2 z2
end
clear pathX nameX extX subj2 x y z mat_T2 mat_lab mat_lab2 subj_lab subj_T2
end

%creates the table
table_T2{1,1} = 'ID/Structures';
filename = [path_label 'T2-relaxometry.xlsx'];
xlswrite(filename,table_T2);

```


ANEXO II

Pacote Estatístico

```

% % % % % ANCOVA
clear all
clc

tNAME = 'CERES_THICK_Menor_pvals.xlsx';

[rawDATA, prawDATA] = uigetfile('*.xlsx','Enter with Raw Data','MultiSelect','on');
rawDATA = [prawDATA rawDATA];

[REG, pREG] = uigetfile('*.xlsx','Enter with Regressors','MultiSelect','on');
REG = [pREG REG];

[GRP, pGRP] = uigetfile('*.xlsx','Enter with Group','MultiSelect','on');
GRP = [pGRP GRP];

[raw,tRAW,~] = xlsread(rawDATA);
[reg,tREG,~] = xlsread(REG);
[grp,tGRP,~] = xlsread(GRP);

report = {};
report = tRAW(1,:);
report{1,1} = 'Structures';
report{1,2} = 'p-value';
report{1,3} = 'Bonferroni';
report{1,4} = 'FDR';

for i=1:size(raw,2)

    Y = raw(:,i);

    [T,p,FANCOVAN,pANCOVAN,stats] = mancovan(Y,grp,reg);

    report{i+1,2} = p(1);
    pval(i,1) = p(1);

    clear Y T p FANCOVAN pANCOVAN stats

end

%Bonferroni Correction
BF = pval*size(pval,1);
BF(BF>1)=1;

BF = num2cell(BF);

report(2:end,3) = BF(:,:);

%FDR Correction
[~,~,~,FDR]=fdr_bh(pval,0.05,'dep','no');
FDR(FDR>1)=1;

FDR = num2cell(FDR);

```

```

report(2:end,4) = FDR(:,:);

%Report Table
xlswrite([pGRP tNAME],report);

%%Kruskal-Wallis
clear all
clc

tNAME = 'kw_pvals.xlsx';

tipo = 'FS'; %T1MA, DTIMA or FS

[DATA, pDATA] = uigetfile('*.xlsx','Enter with Raw Data','MultiSelect','on');
DATA = [pDATA DATA];

[GRP, pGRP] = uigetfile('*.xlsx','Enter with Group','MultiSelect','on');
GRP = [pGRP GRP];

[raw,tRAW,~] = xlsread(DATA);
[grp,tGRP,~] = xlsread(GRP);

report = {};
report = tRAW(1,:);
report{1,1} = 'Structures';
report{1,2} = 'p-value';
report{1,3} = 'Bonferroni';
report{1,4} = 'FDR';

for i=1:size(raw,2)

    Y = raw(:,i);

    [p,tbl,stats] = kruskalwallis(Y,grp,'off');

    report{i+1,2} = p(1);
    pval(i,1) = p(1);

    clear Y p tbl stats

end

%Bonferroni Correction
BF = pval*size(pval,1);
BF(BF>1)=1;

BF = num2cell(BF);

report(2:end,3) = BF(:,:);

%FDR Correction
[~,~,~,FDR]=fdr_bh(pval,0.05,'dep','no');
FDR(FDR>1)=1;

FDR = num2cell(FDR);

```

```

report(2:end,4) = FDR(:,:);

%Report Table
xlswrite([pGRP tNAME],report);

%Image Result

switch tipo

case 'T1MA'
    tb1 = importtp('tp_T1.xlsx');
    tpNAME = 'T1_imageResult.xlsx';

case 'DTIMA'
    tb1 = importtp('tp_DTI.xlsx');
    tpNAME = 'DTI_imageResult.xlsx';

case 'FS'
    msg1 = 'It is no possible to create a table for imageResult script for FS.\n';
    msg2 = 'The program will be closed.';
    disp(msg1)
    disp(msg2)
    return

end

if strcmp(tipo, 'FS') == 0
    % Create Image Result Table
    for i=2:size(report,1)

        stu = report{i,1};

        lin = 2;

        while strcmp(stu,tb1{lin,2}) == 0

            lin = lin + 1;

        end

        tb1{lin,5} = report{i,2};
        tb1{lin,6} = report{i,3};
        tb1{lin,7} = report{i,4};

        clear lin stu
    end

    [x,y] = find(cellfun(@isempty,tb1(:,5)));
    tb1(x,5) = {0};
    tb1(x,6) = {0};
    tb1(x,7) = {0};

    xlswrite([pGRP tpNAME],tb1);

end

```

```

%%% % Remove batch Effect
clear all
clc

[rawDATA, prawDATA] = uigetfile('*.xlsx','Enter with Raw Data','MultiSelect','on');
rawDATA = [prawDATA rawDATA];

[REG, pREG] = uigetfile('*.xlsx','Enter with Regressors','MultiSelect','on');
REG = [pREG REG];

[raw,tRAW,~] = xlsread(rawDATA);
[reg,tREG,~] = xlsread(REG);
cRAW = tRAW;
cDATA = [];

for i=1:size(raw,2)

    Y = raw(:,i);
    m = mean(Y);
    X = [ones(size(Y)) reg];

    b = regress(Y,X);
    w = X*b;

    dataCOR = Y - w;
    dataCOR = dataCOR + m;
    cDATA(:,i) = dataCOR(:,i);
    dataCOR = num2cell(dataCOR);


    cRAW(2:end,i+1) = dataCOR(:,i);

    clear b dataCOR m w X Y
end

xlswrite([prawDATA 'correct_data.xlsx'],cRAW,1);

```

ANEXO III



UNICAMP

**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

CEP, 08/04/11
(Grupo III)

PARECER CEP: N° 131/2011 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 0090.0.146.000-11

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “AVALIAÇÃO PROSPECTIVA DE NEUROIMAGEM NA ATAXIA DE FRIEDREICH”.
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Cynthia Bonilha da Silva
INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas/UNICAMP
APRESENTAÇÃO AO CEP: 02/03/2011
APRESENTAR RELATÓRIO EM: 08/04/12 (O formulário encontra-se no *site* acima).

II – OBJETIVOS.

Determinar o padrão e a extensão de anormalidades estruturais no sistema nervoso central nos pacientes com Ataxia de Friedreich (FRDA) e correlacionar com a evolução clínica.

III – SUMÁRIO.

O estudo visa Identificar alterações neurodegenerativas na substância branca e cinzenta, quantificar depósitos de ferro em núcleos denteados e correlacionar tais alterações com a disfunção clínica nos pacientes com FRDA, de forma prospectiva. Farão parte da amostra, pacientes com diagnóstico confirmado de FRDA e um grupo controle constituído por pessoas saudáveis. Os pacientes serão submetidos a: a) avaliação clínica-neurológica, com a utilização da escala Friedreich Ataxia Rating Scale - FARS; b) exame de ressonância magnética (RM) no mesmo dia da avaliação clínica. Ambos os procedimentos serão realizados em um momento inicial e após 12 meses. Para o grupo controle, serão considerados indivíduos com histórico negativo para ataxias e neuropatias hereditárias, ausência de sintomatologia neurológica e exame clínico-neurológico normal.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
 Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
 Caixa Postal 6111
 13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
 FAX (019) 3521-7187
 cep@fcm.unicamp.br

- 1 -



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

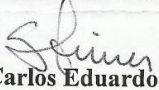
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII- DATA DA REUNIÃO

Homologado na III Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de março de 2011.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

ANEXO IV

Revisão do uso de Técnicas de Relaxometria e Susceptibilidade na Prática Neurológica

(Artigo feito a pedido e submetido à revista Arquivos de Neuropsiquiatria)

CLINICAL USE OF RELAXOMETRY AND SUSCEPTIBILITY-WEIGHTED IMAGING IN NEUROLOGY

Alexandre Motta Mecê^{1*}, Thiago Junqueira Ribeiro de Rezende^{1*}, Marcondes Cavalcante França Júnior¹

¹ Department of Neurology and Neuroimaging Laboratory, School of Medical Sciences, University of Campinas-UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

* Both authors contributed equally to this work

1. ABSTRACT

Introduction: Magnetic Resonance Image (MRI) can be used in many clinical situations, including in the detection of brain iron deposits. To accomplish this objective, T2 relaxometry (RT2) and Susceptibility-Weighted Iron (SWI) can be both used. They have proven useful specially in the assessment of neurodegeneration with brain iron accumulation diseases (NBIA) and other movement disorders. This review aims to summarize the uses of RT2 and SWI in the clinical practice of the neurologist in the detection of brain iron deposits, including a brief explanation of each technique specifications. **Material and Methods:** We revised a total of 90 studies from Pubmed, in the period of 2000-2017, including articles with neurological patients, such as Parkinson's disease (PD), Huntington's disease (HD), NBIA, Friedreich's ataxia (FA), neurovascular diseases. **Results and Discussion:** The SWI technique is mainly used in the detection of microbleeds, with higher sensitivity in the detection of iron (specially used in neurovascular and neurotrauma) and can also be used as a tool for diagnostic and follow up of the disease severity (PD,) and in the determination of differential diagnosis (PD). On the other hand RT2, which has less interference in the deep gray and white brain matter, can be used as a tool for diagnosis (PD, HD, FA,), detection of presymptomatic subjects (PD, HD), determination of differential diagnosis (PD) and help in the follow up of the disease severity (HD, FA, NBIA). **Conclusion:** RT2 and SWI are MRI techniques with great importance in the context of various neurologic diseases, with important correlations between the detection of BID and clinical practice.

2. KEY WORDS

MRI, T2 Relaxometry, SWI, Iron, NBIA

3. INTRODUCTION

Magnetic Resonance Imaging (MRI) is a technique widely used in clinical practice, especially in the evaluation of Central Nervous System (CNS) disorders, since MRI provides better anatomical resolution than other conventional techniques. In this context, MRI can be used in several areas of neurology, including neurovascular (stroke, arteriovenous malformations), neuro-oncology (gliomas, neuroblastomas), neuroinfection (brain abscess, herpes simplex encephalitis, meningoencephalitis) and neurodegenerative diseases (Amyotrophic Lateral Esclerosis, Alzheimer's Disease – AD, Parkinson's Disease – PD).

The ionic iron, like other transitional metals (copper, manganese), can interfere in the tissue contrast, because the iron accumulation changes the relaxation times of each tissue. Iron deposits might reduce transverse relaxation time (T2) and do not interfere on the T1 sequence of MRI, resulting in a correlation of the concentration of iron in the tissue and the T2 value [01-10], as shown on previous post-mortem immunohistochemical studies, which demonstrated higher frequency of iron overload than copper or manganese.

In the category of neurodegenerative diseases, MRI is especially important in the assessment of *Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation Disorders* (NBIA), a group of inherited neurologic disorders in which iron accumulates in the basal ganglia resulting in progressive dystonia, spasticity, parkinsonism, neuropsychiatric abnormalities and optic atrophy or retinal degeneration [42]. Despite that, the precise pathophysiology of iron accumulation in patients with NBIA is not well understood.

There are 2 main MRI-based approaches to assess brain iron concentration: relaxometry (RT2, from the mapping quantification of T2 and T2*) and Susceptibility Weighted Imaging (SWI, with higher sensitivity in the detection of brain iron depositions). Both techniques have been used in the context of neurologic diseases.

In this review, we will briefly report on the clinical use of SWI and RT2, focusing on the neurodegenerative diseases. In each session, we discuss the

current uses in determining the diagnosis, differential diagnosis, prognosis and potential future applications.

4. MATERIALS AND METHODS

For this review, we searched in PubMed, using the keywords “*mri brain relaxometry iron*” and “*mri brain swi iron*”, including articles in English, Portuguese and Spanish published between 2000 until January 2017. From 196 articles, we selected review articles, meta analyses, and clinical reports (case-control studies) with human subjects, including neurologic diseases with MRI analyses with relaxometry and SWI techniques, with minimal 22 subjects. A total of 90 studies were selected considering these inclusion and exclusion criteria.

5. THE SWI AND RT2 TECHNIQUES

5.1 PHYSICAL DIFFERENCES

The T2 relaxometry is a measurement of transverse relaxation (Relaxation T2), which is an intrinsic property of each tissue and provides the image contrast for T2-weighted sequences (Figure 1). Physically, the transverse relaxation time (T2) is related to the rate of decay of the signal due to dephasing caused by interactions among the spins of each atom with its neighbors. In addition, the static magnetic field inhomogeneities lead to spin dephasing and, thereby, to a faster signal decay [11] (Figure 2). In this sense, another measurement emerged - the effective relaxation time, T2*, that takes into account external factors that might affect the T2 signal.

The SWI (Figure 1) uses the concept of magnetic susceptibility to identify iron deposits. The magnetic susceptibility is a measure of the tissue magnetization, i.e., the interaction between magnetic field and the brain tissues. Actually, the SWI provides a qualitative analysis about iron deposition, so that this approach is not recommended. To perform a quantitative analysis, one should use the technique developed by Rochefort et al. (2008) called Quantitative Susceptibility Mapping (QSM) [12]. This technique uses the magnitude and phase images from spin-echo sequences to calculate the quantitative maps.

Both approaches enable the identification of iron in the CNS. In brief, the interference of the iron ion generates a local field inhomogeneity that reduces the local magnetization and, consequently, reduces signal intensity in T2-weighted images or SWI. In addition, the decrease of signal intensity is proportional to the local iron concentration, which enables us to estimate it. However, SWI is less susceptible to the field inhomogeneities caused by the neighborhood [13] and, therefore, it is more sensitive to detect iron depositions. Nevertheless, it is much more laborious and time consuming. In addition, QSM is validated only to assess the basal ganglia, because of the higher risk of artifacts in the cortical regions that usually present higher magnetic susceptibility difference. In contrast, RT2 has a lower sensitivity, but this can be deeply improved through the association with T1-T2 images and might be performed to evaluate the whole brain. Lately, some authors suggested that the concomitant use of both techniques – SWI and RT2 - might be the best strategy to determine more precisely the distribution of brain iron deposition. SWI and RT2 are operator-dependent, and physicians need proper training to accurately interpret the results.

5.2 PRATICAL MEDICAL APPLICATIONS OF RT2

The use of relaxometry to estimate brain iron deposits has been employed for diagnostic purposes. In general, one must select a region of interest and then RT2 values are calculated for that specific region using T2 images with multiple echo times. Figure 3 is an example of this approach, performed with a software developed at the Neuroimaging Laboratory of the University of Campinas (Aftervoxel).

As soon as RT2 values are obtained, one can compare results with normative data adjusted for age for that specific region of interest. On a group level, there are several studies describing the comparison between disease specific groups and matched controls. These reports highlighted several targets of neurodegeneration for selected neurological diseases (Table 1).

5.3 PRATICAL MEDICAL APPLICATIONS OF SWI

The SWI technique is also capable of determining brain iron deposits. Its higher sensitivity to detect the iron ion, makes it especially suitable for use in neurovascular diseases (such as to determine areas of stroke and arteriovenous malformation). This holds true because SWI can detect more accurately the hemoglobin iron component, routinely found in areas of microbleeds. Some situations depicting the clinical use of SWI are listed on Table 02.

6 CLINICAL APPLICATIONS

5.2 PARKINSON'S DISEASE (PD)

Most MRI-based studies using the techniques of SWI and RT2 include patients with Parkinson's disease (PD) as subjects. These reports have shown increased iron deposits in the thalami and basal ganglia (specially substantia nigra) [11-14]. In a meta-analysis of 33 articles, Wang *et al* [12] found that both RT2 and SWI were capable of identifying iron deposits in brain in vivo when compared with post-mortem studies. Other regions of the brain also have signs of pathological iron deposition in PD, such as the red nucleus, caudate nucleus, pallidum, thalamus and putamen, but evidence is not as strong [15, 16, 18]. Finding a pattern of BID may be helpful as a diagnostic tool for PD.

Also, recent articles have demonstrated that iron deposition in the substantia nigra already takes place in preclinical forms of the disease; RT2 values are abnormal both in presymptomatic and symptomatic forms. Pyatigorskaya *et al* 2015 have demonstrated that the deposition occurs in the early phases of the disease. In their study, 60 subjects, including 20 with Parkinson's disease (four symptomatic and two asymptomatic Parkin subjects, nine symptomatic and five asymptomatic LRRK2 subjects), 20 patients with idiopathic PD and 20 healthy subjects, were selected and RT2 values obtained. The results revealed higher iron deposits in the groups with idiopathic and LRRK2-related PD compared to healthy controls. Since this pattern also occurred in asymptomatic subjects, this finding suggests that substantia nigra RT2 may assist in the earlier diagnosis of PD, even before the onset of motor manifestations [13, 14].

Aquino *et al* [19] selected symptomatic patients and correlated BID with time since diagnosis; patients were classified into recent PD (3-5 years, n = 22)

and late PD (6 – 10 years, n = 20) and then compared against the healthy control group (n = 20). There was no difference between recent and late PD regarding brain iron deposition, however, monogenic forms of PD were not taken into account. Comparing SWI and RT2, the SWI (because of its higher sensitivity) is a better MRI technique to detect BID in the context of evaluation of disease severity. Wu et al. [16] demonstrated a direct correlation between the clinical Hoehn-Yahr severity scale with BID in pallidum and substantia nigra. Previous studies also reported a significant correlation between Unified Parkinson's Disease Rating Scale with BID in substantia nigra [21]. Although these studies are recent, they suggest that these MRI-based techniques can be used as follow-up tools for PD. It remains to be clarified whether quantification of brain iron in substantia nigra correlates with progression, prognosis and levodopa response of PD [22].

Relaxometry and SWI techniques have also been used to determine BID patterns in atypical parkinsonian disorders, like progressive supranuclear palsy (red nucleus, pallidum, thalamus and dentate nuclei) and multiple system atrophy (putamen) [15, 24-25], compared to PD. Also, other articles compare the patterns of both progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy parkinsonian predominant type, analyzing thalamus, red nucleus, substantia nigra, pallidum and putamen [26], showing predominant higher iron content in putamen and pulvinar of thalamus in multiple system atrophy, while progressive supranuclear palsy has different iron deposition patterns (including higher deposits in dentate nucleus, putamen, thalamus and globus pallidus), because of its various forms of neuropathological processes [16].

In conclusion, relaxometry is an important technique that can be used as a tool to help in the diagnosis of Parkinson Disease and detection of presymptomatic patients. SWI may also help in the diagnosis of the disease, but also can be used to determine patterns to help on differential diagnosis and in the follow up of the disease progression.

5.3 Huntington's Disease (HD)

Di Paola et al [27] used T2 relaxometry to show that brain iron deposits at the corpus callosum are higher among symptomatic HD patients compared to

pre-symptomatic subjects. In this study, authors selected 50 individuals with molecular confirmation of HD, including 25 presymptomatic subjects and 25 already symptomatic patients in the early disease stages (I and II), and 50 healthy control subjects. In another study [28], 77 mutation carriers (CAG repeats > 38, including 19 pre-symptomatic, 8 with mild symptoms and 50 symptomatic on stages I and II) were compared to 73 healthy age and gender-matched control subjects. Authors demonstrated higher BID in the caudate nuclei in the pre-symptomatic individuals (remaining relatively stable along diseases stages), while putamen and pallidum showed higher BID levels only in the individuals with more CAG repeats and advanced stages of the disease. In conclusion, HD is also associated with abnormal BID, beginning already in the presymptomatic stages (restricted to the caudate nuclei) and then progressing to other regions as long as disease progresses (pallidum and putamen in symptomatic patients).

5.4 Friedreich's Ataxia (FA)

Silva et al, demonstrated that BID levels in the dentate nuclei are abnormal in FA, progress over time and correlate with ataxia severity. She assessed 35 FA patients and 44 healthy control subjects, and followed them for one year using RT2. In that study, authors also found that higher BID levels were associated to the length of the GAA expansion at the first intron of the *FXN* gene. These results suggest that dentate nuclei T2 relaxometry might be an interesting imaging marker to follow patients with FA [06].

5.5 Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation (NBIA) Disorders

NBIAs is a group of inherited neurologic disorders in which iron accumulates in the basal ganglia resulting in progressive dystonia, spasticity, parkinsonism, neuropsychiatric abnormalities and optic atrophy or retinal degeneration. There are ten different diseases included in this group, including aceruloplasminemia, beta-propeller protein-associated neurodegeneration, fatty acid hydroxylase-associated neurodegeneration, Kufor-Rakeb syndrome, neuroferritinopathy, mitochondrial membrane protein-associated neurodegeneration and PKAN1-associated neurodegeneration [41].

The MRI technique is an important tool in the diagnosis of these diseases, with virtually pathognomonic findings, such as eye-of-the-tiger sign in Pantothenate Kinase-Associated Neurodegeneration. Both Relaxometry and SWI techniques showed higher levels of iron in the pallidum in these subjects [42, 43, 44]. Interestingly, there was also reduction in the iron content of the same structure (associated with stabilization of the motor symptoms) in 6 patients treated with deferiprone, as mentioned by Cossu et al [45] and Zorzi et al [46].

Takano et al [47], in a case report, demonstrated that the SWI technique could be used as a tool for diagnosis of the beta-propeller protein-associated neurodegeneration by detecting higher brain iron levels in the pallidum and substantia nigra.

Lobel et al [48] demonstrated, in a case report, that the RT2 technique was a useful tool in the follow up of a patient with mitochondrial membrane protein-associated neurodegeneration under iron-chelating therapy, with reduction of the iron levels in the pallidum and stability in substantia nigra.

Keogh et al [49] in an article including 10 patients with neuroferritinopathy and 10 age-matched controls demonstrated, using relaxometry, correlations between the severity of iron deposition (in caudate head and pallidus) and the score of the Unified Dystonia Rating Scale (determining severity of the disease).

These imaging techniques have been also employed in the setting of clinical trials of iron chelators or NBIA, such as Deferiprone [46]. Some authors argue in favor of these non-invasive methods to monitor the improvement of abnormal BID in these patients.

5.6 Neurovascular

Since the SWI technique has a great capacity of detecting focus of microhemorrhages and hemosiderin deposits, it is widely used in Neurology, especially to localize small microbleeds, such as Cerebral Amyloid Angiopathy (CAA).

CAA is an age-related disease characterized by the progressive deposition of amyloid- β in the walls of small arteries in the cerebral cortex, resulting in microhemorrhages (due the fragility of the vessels) in a lobar (cortical-subcortical)

distribution, paralleling the topography of the underlying vascular pathology. This condition is clinically related to dementia and cognition impairments [37]. SWI has been used as the best tool on the identification and brain mapping of these cerebral microbleeds, as confirmed from previous literature [01, 04, 17, 34, 38, 39, 56]. Nandigam et al [12x], for example, demonstrated that SWI was better than gradient recalled-echo magnetic resonance images in a study including a group of 14 subjects with probable CAA. Once the microbleeds are not an exclusive finding of CAA, the determination of differential diagnosis which show similar SWI patterns (like arterial hypertension, stroke and coagulation intravascular dissemination) is also an important topic discussed in previous studies [23, 33, 37] and must be considered in its clinical practice.

Other examples of clinical use in the setting of neurovascular disorders follow:

- **Arteriovenous Malformation:** surgical planning, disease follow up, which is described as the best technique to characterize the lesions [35, 36, 51-55, 57].
- **Intracranial Hemorrhage:** to identify the focus of the bleeding (subdural, subarachnoid, vasculitis, microthrombus) [58, 59].
- **Traumatology:** post-trauma lesions, correlated with prognosis (sequels and neurorehabilitation planning) [51, 53, 58, 60-66]
- **Brain Aneurysm:** surgical planning [67].
- **Strokes:** determine the areas of penumbra, microbleeding, arterial thrombi, reperfusion post thrombolysis, atherosclerosis carotid plaques, pediatric hypoxic-ischemic lesions, venous thrombi, brain death [51-53, 58, 59, 61, 68].
- **Carotid dissection:** described in children and adults [52, 57].
- **Cerebral Amyloid Angiopathy:** diagnosis and determine the cognitive impairment of the disease [53, 69].
- **Hypertensive Encephalopathy:** microbleeding in basal ganglia and subcortical region [53].

6. Discussion

It is not yet known whether iron deposition is a cause or a consequence of neurodegeneration, but the abnormal deposits are correlated with many clinical

aspects. The RT2 and SWI techniques are important methods in the determination of BID, used as tools in the diagnosis, prognosis and follow up of patients with neurodegenerative disorders. Both techniques, SWI with higher sensitivity in the detection of iron and RT2 with higher anatomical definition, can be used as complementary techniques in the evaluation of several diseases, including Parkinson's disease, Huntington's disease, and Multiple Sclerosis, Friedreich's Ataxia, NBIA's and neurovascular diseases.

The clinical aspects related to these techniques can be described as in 6 groups: diagnosis, detection of presymptomatic subjects (DPSS), follow up of the disease severity (FDS), determination of differential diagnosis (DDD), therapy follow up (TF) and prognosis, as listed in the Table 3. Both techniques have relevant applications in each of these areas, but it depends on the studied disease. These data ultimately help neurologists in the proper management of these patients, as well as in the prognosis estimation. Table 3 summarizes the clinical uses of each technique in the diseases/areas of neurology mentioned in this article.

7. Conclusions

RT2 and SWI are MRI-based techniques with potential usefulness in the clinical practice of various neurologic diseases, mainly because of their capacity of detecting BID in the CNS. Such detection may help in the diagnosis, prognosis, surgical planning, follow up of the disease and treatment, depending on the specific disease evaluated.

8. References

1. Mittal S, Wu J. Susceptibility-weighted imaging: technical aspects and clinical applications, part 2. *American Journal of Neuroradiology*, 2009; 30 (2): 232-52.
2. Gerlach M, Ben-Shachar D, Riederer P, *et al.* Altered Brain Metabolism of Iron as a Cause of Neurodegenerative Disease? *Journal of Neurochemistry* 1994; 63 (3): 793-807.
3. Wayne Martin WR. Quantitative Estimation of Regional Brain Iron with Magnetic Resonance Imaging. *Parkinsonism and Related Disorders* 2009; 15: 215-8.
4. Niwa A, Li Y, Shindo A, *et al.* Comparative Analysis of Cortical Microinfarcts and Microbleeds using 3.0-Tesla Postmortem Magnetic Resonance Images and Histopathology. *J. Alzheimers Dis*, 2017; 59(3): 951-9.
5. Hikita T, Abe K, Sadoka S, *et al.* Determination of Transverse Relaxation Rate for Estimating Iron Deposits in Central Nervous System. *Neuroscience Research* 2005; 51: 67-71.
6. Silva CB, Bergo FPG, D'Abreu A, *et al.* Dentate Nuclei T2 Relaxometry is a Reliable Neuroimaging Marker in Friedreich's Ataxia. *European Journal of Neurology* 2014; 21 (8): 1131-6.
7. Schenck JF. Magnetic Resonance Imaging of Brain Iron. *Journal of Neurological Sciences* 2003; 207: 99-102.
8. Wang D, Li Y, Luo J, *et al.* Age-related Iron Deposition in the Basal Ganglia of Controls and Alzheimer Disease Patients Quantified Using Susceptibility Weighted Imaging. *Archives of Gerontology and Geriatrics* 2014; 59: 439-49.
9. Winblad B, Amouyel P, Andrieu S, *et al.* Defeating Alzheimer's disease and other dementias: a priority for European Science and society. *Lancet Neurol* 2016, 15: 455-532.
10. Pedroso JL, França MC, Braga-Neto P, *et al.* Nonmotor and Extracerebellar Features in Machado-Joseph Disease: a Review. *Movement Disorders*, 2013; 28 (9): 1200-8.
11. Bozzoni V, Pansarasa O, Nosari G, *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis and environmental factors. *Functional Neurology*, 2016; 31(1): 7-19.

12. Guan X, Xuan M, Gu Q, *et al.* Regionally progressive accumulation of iron in Parkinson's disease as measured by quantitative susceptibility mapping. *NMR Biomed*, 2017; 30 (4): 1002/nbm.3489.
13. Wang JY, Zhuang QG, Zhu LB, *et al.* Meta-analysis of brain iron levels of Parkinson's disease patients determined by postmortem and MRI measurements. *Sci Rep*, 2016; 6: 10.1038/srep36669.
14. Pyatigorskaya N, Sharman M, Corvol JC, *et al.* High nigral iron deposition in LRRK2 and Parkin mutation carriers using R2* relaxometry. *Mov Disord*, 2015; 30(8): 1077-84.
15. Pyatigorskaya N, Galle C, Garcia-Lorenzo D, *et al.* A review of the use of magnetic resonance imaging in Parkinson's disease. *The Adv Neurol Disord*, 2014; 7(4): 206-20.
16. Wang Z, Lou XG, Gao C. Utility of susceptibility-weighted imaging in Parkinson's disease and atypical Parkinsonian disorders. *Translational Neurodegeneration*, 2016; 5:17 e Collection.
17. Renard D, Wacogne A, Floch AL, *et al.* Vicinity of FLAIR Hiperintensity and SWI Microbleeds in Cerebral Amyloid Angipathy-Related Inflammation. *Eur Neurol*, 2016; 75(5-6): 223-4.
18. Hingwala DR, Kesavadas C, Thomas B, *et al.* Suscetibility weighted imaging in the evaluation of movements disorders. *Clin Radiol*, 2013; 68(6): e338-48.
19. Zhang W, Sun SG, YH Jiang, *et al.* Determination of brain iron content in patients with Parkinson's disease using magnetic susceptibility imaging. *Neurosci Bull*, 2009; 25(6): 353-60.
20. Aquino D, Contarino V, Albanese A, *et al.* Substantia nigra in Parkinson's disease: a multimodal MRI comparasion between early and advanced stages of the disease. *Neurol Sci*, 2014; 35: 753-8.
21. Guan X, Xuan M, Gu Q, *et al.* Influence of regional iron on the motor impairments of Parkinson's disease: a quantitative susceptibility mapping study. *J Magn Reson Imaging*, 2017; 45(5): 1335-42.
22. Zhang J, Zhang Y, Wang J, *et al.* Characterizing iron deposition in Parkinson's disease using susceptibility-weighted imaging: a in vivo MR study. *Brain Res*, 2010; 1330: 124-30.

23. Trevino-Peinado C, Zubieta JL, Fernández MM. Subcortical microbleeds in disseminated intravascular coagulation mimicking amyloide angiopathy. *Journal of Neuroimaging*, 2015; 24(4), 660-1.
24. Wang Y, Butros RS, Shuai X, *et al.* Different iron-deposition patterns of multiple system atrophy with predominant parkinsonism and idiopathic Parkinson diseases demonstrated by phase-corrected susceptibility-weighted imaging. *Am J Neuroradiol*, 2012; 33(2): 266-73.
25. Lee JH, Baik SK. Putaminal Hypointensity in the parkinsonian variant of multiple system atrophy: simple visual assessment using susceptibility-weighted imaging. *J Mov Disord*, 2011; 4(2): 60-3.
26. Huang XM, Sun B, Xue YJ, *et al.* Susceptibility-weighted imaging in detecting brain iron accumulation of Parkinson's disease. *Zhouqhua Yi Xue Za Zhi*, 2010; 90(43): 3054-8.
27. Han YH, Lee JH, Kang BM, *et al.* Topographical differences of brain iron depositions between progressive supranuclear palsy and parkinsonian variant multiples system atrophy. *J Neurol Sci*, 2013; 325 (1-2): 29-35.
28. Di Paola M, Phillips OR, Sanchez-Castaneda C, Di Pardo A, *et al.* MRI Measures of Corpus Callosum Iron and Myelin in Early Huntington's Disease. *Human Brain Mapping*, 2014; 35: 3143-51.
29. Sanchez-Castaneda, Squitieri F, Di Paola M, *et al.* The role of iron in gray matter degeneration in Huntington's disease: a magnetic resonance imaging study. *Human Brain Mapping*, 2015; 36: 50-66.
30. Prell T, Hartung V, Tietz F, *et al.* Susceptibility-weighted imaging provides insight into white matter damage in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*, 2015; 10(06): e0131114.
31. Adachi Y, Sato N, Saito Y, *et al.* Usefulness of SWI for the detection of iron in the motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroimaging*, 2015; 25(3): 443-51.
32. Sheelakumari R, Madhusoodanan M, Radhakrishnan, *et al.* A potential biomarker in amyotrophic lateral sclerosis: can assessment of brain iron deposition with SWI and corticostpinal tract degeneration with DTI help? *American Journal of Neuroradiology*, 2016; 37(2): 252-8.

33. Yates PA, Villemagne VL, Ellis KA, et al. Cerebral microbleeds: a review of clinical, genetic, and neuroimaging associations. *Front Neurol*, 2014; 4:205.
34. Cheng AL, Batool S, McCreary CR, et al. Susceptibility-Weighted Imaging is more reliable than T2*-weighted gradient-recalled echo MRI for detecting microbleeds. *Stroke*, 2013; 44(10): 2782-6.
35. Zivadinov R, Heininen-Brown M, Schirda CV, et al. Abnormal subcortical deep-gray matter susceptibility-weighted imaging filtered phase measurements in patients with multiple sclerosis: a case-control study. *Neuroimage*, 2012; 59(1): 331-9.
36. Reichenbach JR, Schweser F, Serres B, et al. Quantitative Susceptibility Mapping: Concepts and Applications. *Clin Neuroradiol*, 2015; 2: 225-30.
37. Charidimou A, Jäger HR, Werring DJ. Cerebral microbleed detection and mapping: principles, methodological aspects and rationale in vascular dementia. *Exp Gerontol*, 2012; 47(11): 843-52.
38. Scharg M, McAuley G, Pomakian J, et al. Correlation of hypointensities in susceptibility-weighted images to tissue histology in dementia patients with cerebral amyloid angiopathy: a postmortem MRI study. *Acta Neuropathol*, 2010; 119(3): 291-302.
39. Santhosh K, Kesavadas C, Thomas B. Susceptibility-weighted imaging: a new tool in magnetic resonance imaging of stroke. *Clinical Radiology*, 2009; 64(1): 74-83.
40. Nandigam, RN, Viswanathan A, Delgado P, et al. MR Imaging detection of cerebral microbleeds: effect of susceptibility-weighted imaging, section thickness, and field strength; *American Journal of Neuroradiology*, 2009; 30(2): 338-43.
41. Margariti PN, Astrakas LG, Tsouli SG, et al. Investigation of Unmedicated Early Onset Restless Syndrome by Voxel-Based Morphometry, T2 Relaxometry, and Functional MR Imaging during the Night-Time Hours. *Am J Neuroradiol*, 2012; 33: 667-72.
42. Gregory A, Hayflick S. Neurodegeneration with brain iron accumulation disorders overview. *GeneReviews* [internet], 2013.

43. Dezortova M, Herynek V, Krssak M, *et al.* Two forms of iron as an intrinsic contrast agent in the basal ganglia of PKAN patients. *Contrast Media Mol Imaging*, 2012; 7(6): 509-15.
44. Hajek M, Adamovicova M, Herynek V, *et al.* MR relaxometry and 1H MR spectroscopy for the determination of iron and metabolite concentrations in PKAN patients. *Eur Radiol*, 2005; 15(5): 1060-8.
45. Vinod Desai, Bindu PS, Ravishankar S, *et al.* Relaxation and susceptibility MRI characteristics in Hallervorden-Spatz syndrome. *J Magn Reson Imaging*, 2007; 25(4): 715-20.
46. Cossu G, Abbruzzese G, Matta G, *et al.* Efficacy and safety of deferiprone for the treatment of pantothenate kinase-associated neurodegeneration (PKAN) and neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA): results from a four years follow-up. *Parkinsonism Relat Disord*, 2014; 20(6): 651-4.
47. Zorzi G, Zibordi F, Chiapparini L, *et al.* Iron-related MRI images in patients with pantothenate kinase-associated neurodegeneration (PNAN) treated with deferiprone: results of a phase II pilot trial. *Mov Disord*, 2011; 26(9): 1756-9.
48. Takano K, Shiba N, Wakui K, *et al.* Elevation of neuron specific enolase and brain iron deposition on susceptibility-weighted imaging as diagnostic clues for beta-propeller protein-associated neurodegeneration in early childhood: additional case report and review of the literature. *Am J Med Genet A*, 2016; 170A(2): 322-8.
49. Lobel U, Schweser F, Nickel M, *et al.* Brain iron quantification by MRI in mitochondrial membrane protein-associated neurodegeneration under iron-chelating therapy. *Ann Clin Transl Neurol*, 2014; 1(12): 1041-6.
50. Keogh MJ, Aribisala BS, He J, *et al.* Voxel-based analysis in neuroferritinopathy expands the phenotype and determines radiological correlates of disease severity. *J Neurol*, 2015; 262(10): 2232-40.
51. Herynek V, Wagnerova D, Malucelli A, *et al.* Alterations in the basal ganglia in patients with brain tumors may be due to excessive iron deposition. *Oncology letters*, 2015; 9: 43-6.

52. Di Leva A, Lam T, Alcaide-Leon P, *et al.* Magnetic resonance susceptibility weighted imaging in neurosurgery: current applications and future perspectives. *J Neurosurg*, 2015; 123(6): 1463-75.
53. Bosemani T, Poretti A and Huisman TA. Susceptibility-weighted imaging in pediatric neuroimaging. *J Magn Reson Imaging*, 2014; 40(3): 530-44.
54. Gasparotti R, Pinelli L and Liserre R. New MR sequences in daily practice: susceptibility weighted imaging. A pictorial essay. *Insights Imaging*, 2011; 2(3): 335-47.
55. Girard R, Fam MD, Zeineddine HA, *et al.* Vascular permeability and iron deposition biomarkers in longitudinal follow-up of cerebral cavernous malformation. *J Neurosurg*, 2016; 5: 1-9.
56. Switzer AR, McCreary C, Batool S, *et al.* Longitudinal decrease in blood oxygenation level dependent response in cerebral amyloid angiopathy. *Neuroimage Clin*, 2016; 11: 461-7.
57. George U, Jolappara M, Kesavadas C, *et al.* Susceptibility-weighted imaging in the evaluation of brain arteriovenous malformations. *Neurol India*, 2010; 58(4): 608-14.
58. Tsui YK, Tsai FY, Hasso AN, Greensite F, *et al.* Susceptibility-weighted imaging for differential diagnosis of cerebral vascular pathology: a pictorial review. *J Neurol Sci*, 2009; 287(1-2): 7-16.
59. Robinson RJ, Bhuta S. Susceptibility-weighted imaging of the brain: current utility and potential applications. *J Neuroimaging*, 2011; 21(4): e189-204.
60. Thomas B, Somasundaram S, Thamraj K, *et al.* Clinical applications of susceptibility weighted MR imaging of the brain. *Neuroradiology*, 2008; 50(2): 105-16.
61. Buch S, Cheng YN, Hu J, *et al.* Determination of detection sensitivity for cerebral microbleeds using susceptibility-weighted imaging. *NMR Biomed*, 2017; 39(4): doi 10.1002/nbm.3551.
62. Liu S, Buch S, Chen Y, *et al.* Susceptibility-weighted imaging: current status and future directions. *NMR Biomed*, 2017; 30(4): doi 10.1002/nbm.3552.

63. Lu L, Cao H, Wei X, *et al.* Iron deposition is positively related to cognitive impairment in patients with chronic mild traumatic brain injury: assessment with susceptibility weighted imaging. *Biomed Res Int*, 2015; 2015: 470676.
64. Toth A. Magnetic resonance imaging application in the area of mild and acute traumatic brain injury: implication for diagnostic markers? In: Kobeissy FH, editor. *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2015. Chapter 24. *Frontiers in Neuroengineering*.
65. Reinchenbach JR, Schweser F, Serres B, *et al.* Quantitative Susceptibility Mapping: Concepts and Applications. *Clin Neuroradiol*, 2015; 25 Suppl 2: 225-30.
66. Tsai FY, Shih YY, Chan WP, *et al.* Practical aspects of shortening acquisition time in brain MR susceptibility-weighted imaging. *Neuroradiol J*, 2012; 25(6): 649-56.
67. Benson RR, Gattu R, Sewick B, *et al.* Detection of hemorrhagic and axonal pathology in mild traumatic brain injury using advanced MRI: implications of neurorehabilitation. *Neurorehabilitation*, 2012; 31(3): 261-79.
68. Matsushige T, Chen B, Ringelstein A, *et al.* Giant Intracranial Aneurysms at 7T MRI. *ANJR Am J Neuroradiol*, 2016; 37(4): 636-41.
69. Meoded A, Poretti A, Northington FJ, *et al.* Susceptibility weighted imaging of the neonatal brain. *Clin Radiol*, 2012; 67(8): 793-801.

TABLES

Tabela 24: Estudo 4 - **Table 1** – Disease-specific brain regions with higher BID revealed by relaxometry studies.

Diseases	Brain Regions
Parkinson's Disease [12-16, 18-22, 24-27]	Basal ganglia (substantia nigra)
Huntington's Disease [28-32]	Corpus callosum, putamen and pallidum
Friedreich's Ataxia [06]	Dentate nucleus

Tabela 25: Estudo 4 - **Table 2** – Area of Neurology and its respectable diseases.

Neurology Area	Pathologies
Neurodegenerative [12-17, 18-22, 24-27, 42-50]	NBIAs Parkinson's Disease
Neurovascular [04, 17, 54-69]	Arteriovenous malformation Intracranial bleed Cerebral Aneurysm Stroke Carotid dissection
	Post traumatic cerebral lesions Cerebral Amyloid Angiopathy

Tabela 26: Estudo 4 - **Table 3** – Neurological diseases and the potential clinical application of SWI and RT2 techniques correlation with diagnosis, detection of presymptomatic subjects (DPSS), follow up of the diseases severity (FDS), determination of differential diagnosis (DDD), therapy follow up (TF) and prognosis with the SWI and RT2 techniques. * Areas of neurology with recent evidences, not well-established.

Condition/Clinical aspect	Diagnosis	DPSS	FDS	DDD	TF	Prognosis
Parkinson's Disease [12 -16, 18-22, 24--27]	RT2/SWI	RT2	SWI	SWI/RT2	--	--
Huntington's Disease [28-32]	RT2	RT2	RT2	--	--	--
Friedreich's Ataxia [06]	RT2	--	RT2	--	--	--
NBIAs [42,50]	RT2	--	RT2	--	--	--
Neurovascular [04, 17, 54-69]	SWI	--	SWI	SWI	SWI	SWI

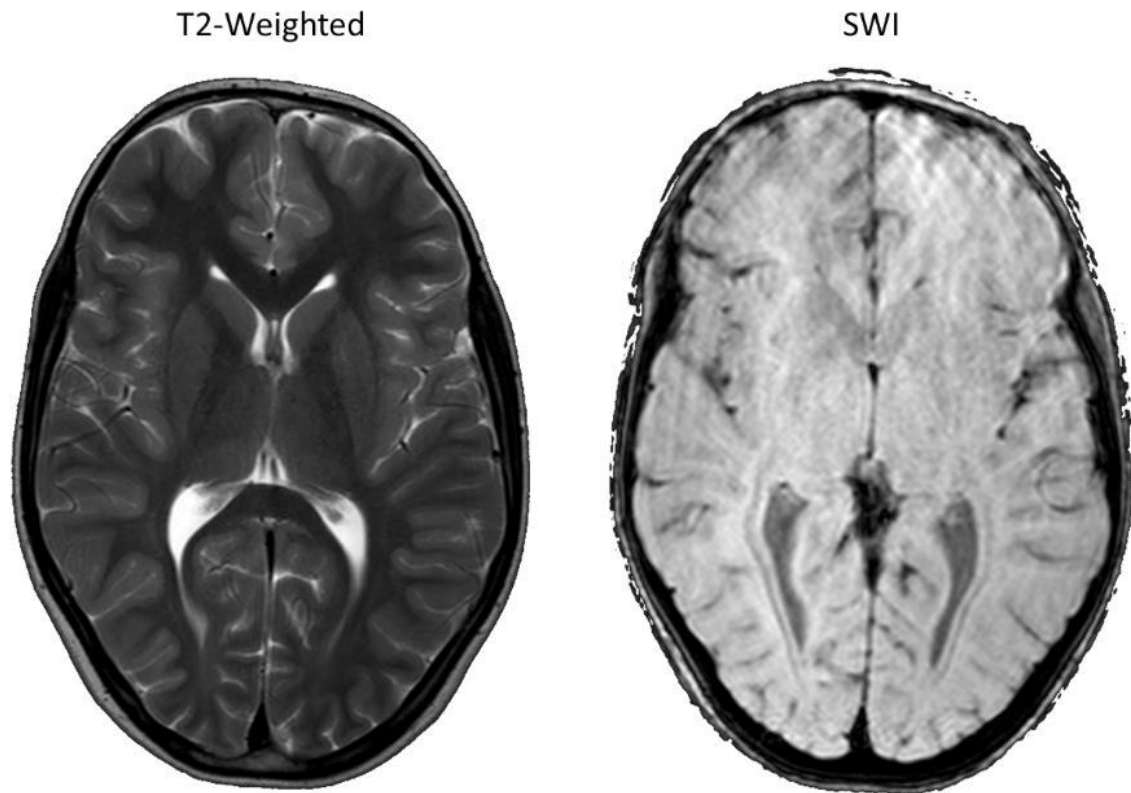
FIGURE

Figura 28: Estudo 4 - **Figure 1:** Example of T2-weighted and SWI-weighted images.

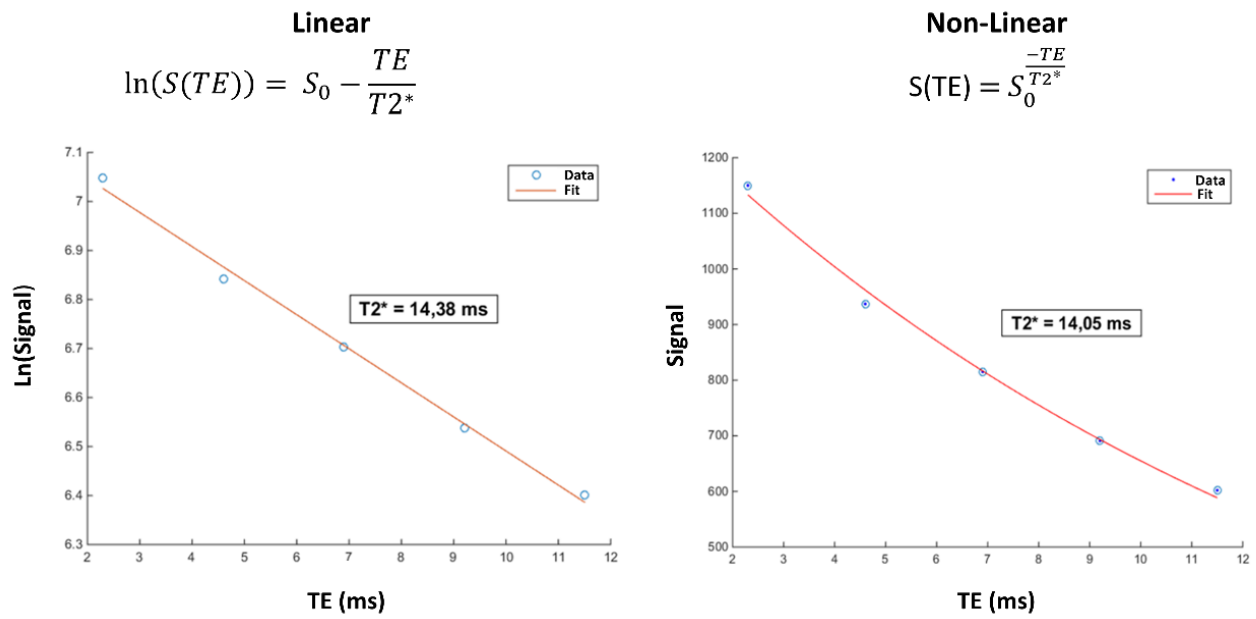


Figura 29: Estudo 4 - Figure 2: Example of a fitting to calculate the T2 time using the relaxometry technique. (a) Linear fitting; (b) Non-linear fitting

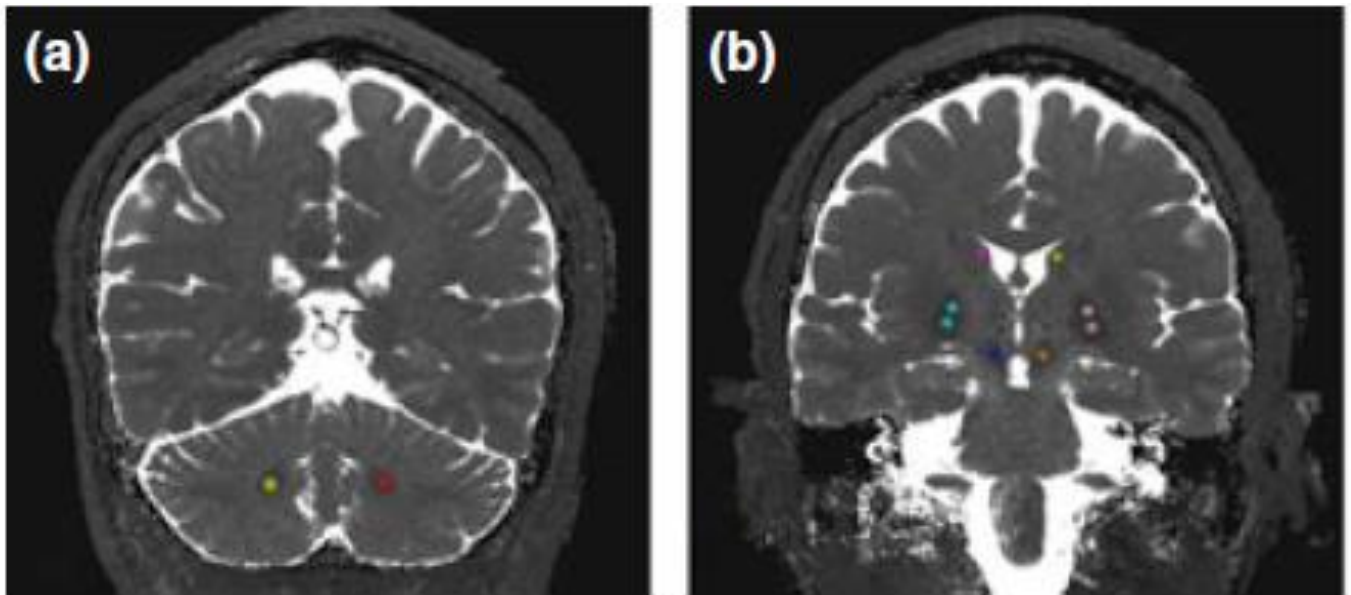


Figura 30: Estudo 4 - **Figure 3:** Coronal T2 weighted MRI slices showing selected regions of interest amenable to calculation of RT2 values: (a) Dentate nuclei (red and yellow circles), (b) substantia nigra (dark blue and Orange circles), putamina (light blue and light pink circles) e caudate nuclei (light green and pink circles).