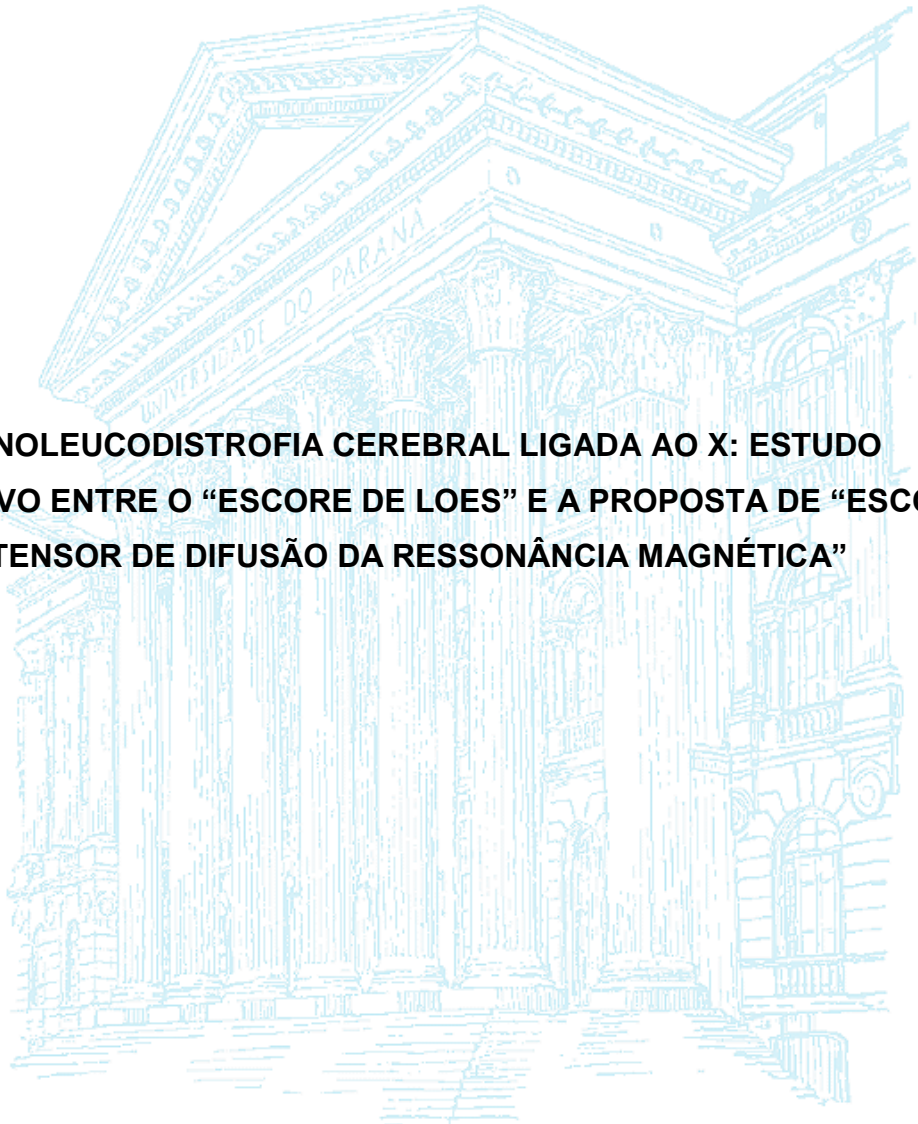


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SERGIO EIJI ONO

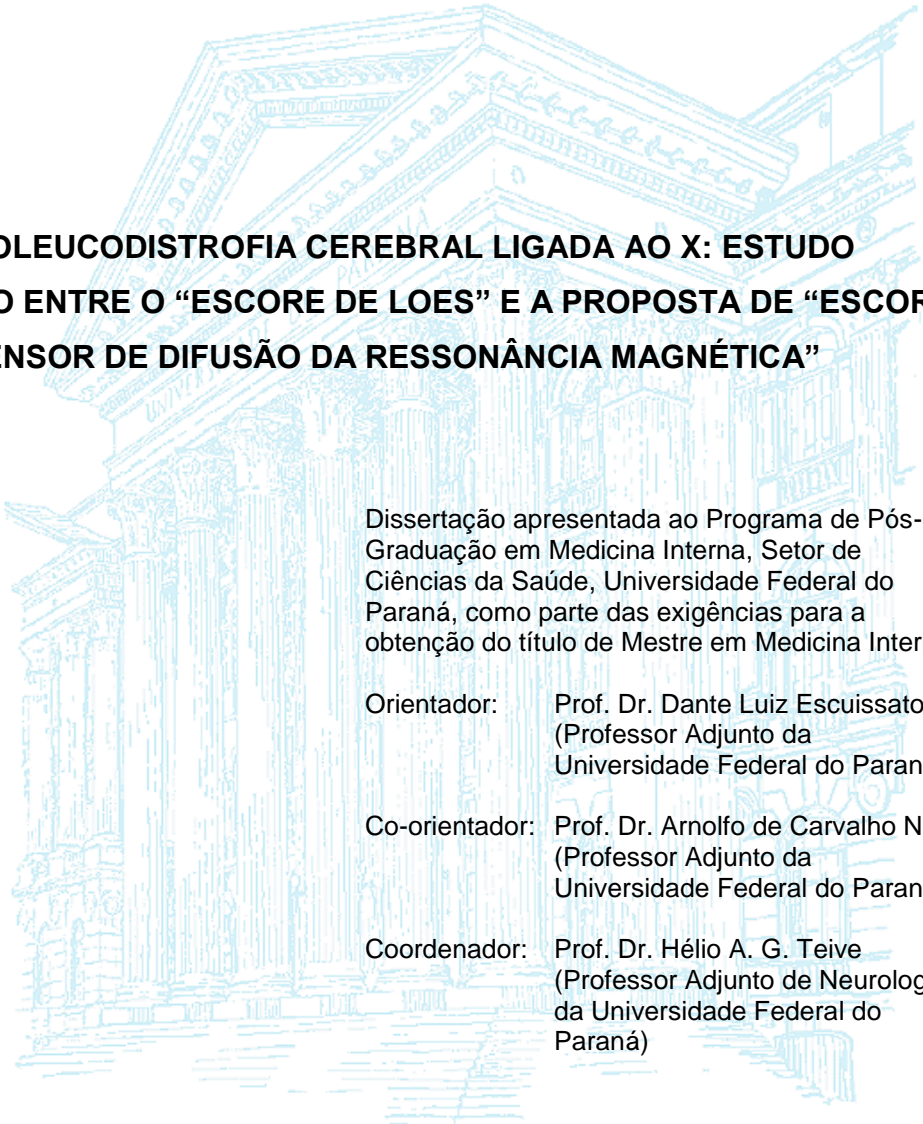


**ADRENOLEUCODISTROFIA CEREBRAL LIGADA AO X: ESTUDO
COMPARATIVO ENTRE O “ESCORE DE LOES” E A PROPOSTA DE “ESCORE
DE TENSOR DE DIFUSÃO DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA”**

CURITIBA

2012

SERGIO EIJI ONO



**ADRENOLEUCODISTROFIA CEREBRAL LIGADA AO X: ESTUDO
COMPARATIVO ENTRE O “ESCORE DE LOES” E A PROPOSTA DE “ESCORE
DE TENSOR DE DIFUSÃO DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Interna.

Orientador: Prof. Dr. Dante Luiz Escuissato
(Professor Adjunto da
Universidade Federal do Paraná)

Co-orientador: Prof. Dr. Arnolfo de Carvalho Neto
(Professor Adjunto da
Universidade Federal do Paraná)

Coordenador: Prof. Dr. Hélio A. G. Teive
(Professor Adjunto de Neurologia
da Universidade Federal do
Paraná)

CURITIBA

2012

Ono, Sergio Eiji

Adrenoleucodistrofia cerebral ligada ao X: estudo comparativo entre o “escore de Loes” e a proposta de “escore de tensor de difusão da ressonância magnética”. Curitiba, 2012.

64 páginas.

Orientador: Prof. Dr. Dante Luiz Escuissato.

Co-orientador: Prof. Dr. Arnolfo de Carvalho Neto.

Dissertação (Mestrado em Medicina Interna) – Setor de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna, Universidade Federal do Paraná.

1. Adrenoleucodistrofia 2. Ressonância Magnética 3. Tensor de Difusão

Dedico este trabalho

Aos amores da minha vida, Ceci, minha esposa, e ao meu filho Lucas.

Aos meus pais, Sheizi e Akiko.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar minha vida e me confortar em todos os momentos, especialmente nos mais difíceis.

A todos os professores e professoras, que ajudaram em minha formação.

Ao professor Arnolfo, pelo apoio, pela orientação, pelas críticas construtivas, pela confiança, pela paciência e pelas várias revisões deste trabalho.

Ao professor Dante, pela oportunidade de realizar este trabalho nesta valiosa e querida instituição, pela orientação e pelo incentivo para terminá-lo.

Ao professor Emerson, pela orientação, incentivo e apoio nas diversas revisões do texto.

Ao Dr. Luiz Otávio, pela paciência e pela importante colaboração nas mensurações, realizadas diversas vezes.

À Dra. Carmem, pelo incentivo e pela colaboração na discussão dos casos clínicos dos pacientes.

Ao Dr. Lisandro, por sua colaboração no encaminhamento dos pacientes e discussão dos casos clínicos.

Ao colega de trabalho e de pós-graduação, Dr. Danny, pela amizade, companheirismo e incentivo para o término deste trabalho.

À Liga das Senhoras Católicas de Curitiba e à dedicação dos funcionários do DAPI, que viabilizaram a realização dos exames, ajudando os pacientes envolvidos no estudo e a realização deste trabalho.

Ao empenho do serviço de TMO do Hospital de Clínicas da UFPR, pelo auxílio para o contato e encaminhamento dos pacientes.

“A tarefa não é tanto ver o que ninguém viu ainda, mas pensar o que ninguém pensou sobre algo que todos vêem”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

OBJETIVO: o padrão-ouro em exames de imagem para avaliar a adrenoleucodistrofia ligada ao X é o escore de Loes, baseado na localização, alterações de sinais e grau de atrofia. Os objetivos deste estudo foram avaliar como os parâmetros do tensor de difusão correlacionam com o escore de Loes e avaliar se poderiam indicar alterações estruturais precoces. **PACIENTES E MÉTODOS:** as medidas do tensor de difusão foram obtidas em 9 locais pré-estabelecidos da substância branca, bilateralmente, em 30 exames de 14 pacientes com adrenoleucodistrofia ligada ao X. Os escores individuais de fração de anisotropia e difusibilidades média, radial e axial foram obtidos como uma simples soma das 18 medidas e estatisticamente correlacionadas com o escore de Loes correspondente. Um grupo controle de 28 pacientes masculinos foi avaliado para estabelecer escores do tensor de difusão pareados por idade. Análises estatísticas intra e interobservador foram feitas. **RESULTADOS:** os escores do tensor de difusão apresentam forte correlação com o escore de Loes segundo o coeficiente de Pearson (r), com valores de -0,86; 0,89; 0,89 e 0,84 para escores de fração de anisotropia e difusibilidades média, radial e axial ($p < 0,01$). A análise estatística intra e interobservador dos escores dos tensores de difusão para pacientes com adrenoleucodistrofia e no grupo controle indicam um método robusto. A análise da mudança nas medidas do tensor de difusão no estágio inicial da doença indica que os valores de difusibilidades média e radial podem ajudar a prever a progressão da doença. **CONCLUSÃO:** os escores de parâmetros do tensor de difusão poderiam ser usados como um adjunto ao escore de Loes, auxiliando no monitoramento da doença e alertando uma possível progressão do escore de Loes na faixa de interesse para decisões terapêuticas.

Palavras-chave: Adrenoleucodistrofia ligada ao X. Ressonância Magnética. Tensor de difusão. Escore de Loes.

ABSTRACT

OBJECTIVE: the gold standard in imaging for scoring X-linked adrenoleukodystrophy is the Loes score based on location, signal alterations and degree of atrophy. The aims of this study were to evaluate how diffusion tensor imaging parameters correlate to Loes score and if they could indicate precocious structural changes.

SUBJECTS AND METHODS: diffusion tensor imaging measurements were obtained in 9 pre-established white matter locations bilaterally in 30 exams of 14 patients with X-linked adrenoleukodystrophy. Individual scores of fractional anisotropy and mean, radial and axial diffusivities were determined as a simple sum of the 18 measurements and statistically correlated to corresponding Loes scores. A control group of 28 male patients was established to derive expected age-matched diffusion tensor imaging scores. Interobserver and intraobserver statistical analysis was also performed.

RESULTS: diffusion tensor imaging scores had strong Pearson correlation coefficients (r) of -0.86 , 0.89 , 0.89 and 0.84 for fractional anisotropy and mean, radial and axial diffusivities scores (all with $p < 0.01$). Interobserver statistical analysis of diffusion tensor imaging scores of controls and adrenoleukodystrophy patients and intraobserver statistical analysis of adrenoleukodystrophy patients' data indicated robustness of the diffusion tensor imaging scores proposed. Analysis of diffusion tensor measurements changes in the early stage of the disease indicates that mean and radial diffusivities may help predict the progression of Loes scores.

CONCLUSION: the proposed DTI scores might be used as an adjunct to the Loes score, helping to monitor the disease and alerting for possible Loes score progression in the range of interest for therapeutic decisions.

Key words: X-linked Adrenoleukodystrophy. Diffusion tensor imaging. Loes score. Magnetic Resonance Imaging.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – EXEMPLOS DE PADRÕES DA ALD NA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA.	28
FIGURA 2 – FORMATO DOS ELIPSOIDES E MATRIZES DOS TENSORES PARA DIFUSÃO ISOTRÓPICA SEM RESTRIÇÃO, DIFUSÃO ISOTRÓPICA COM RESTRIÇÃO E DIFUSÃO ANISOTRÓPICA COM RESTRIÇÃO.	31
FIGURA 3 – ILUSTRAÇÃO DOS ELIPSOIDES DO TENSOR DE DIFUSÃO EM IMAGEM CLÍNICA DO ENCÉFALO.	32
FIGURA 4 – EVOLUÇÃO DA FA COM A IDADE NA FAIXA ETÁRIA DE 0 A 5 ANOS.	34
FIGURA 5 – VARIAÇÃO DAS DIFUSIBILIDADES AXIAL E RADIAL COM A IDADE.	35
FIGURA 6 – ESCOLHA DOS ROIs.	42
FIGURA 7 – ANÁLISE INTRA-OBSERVADOR COM DADOS DE PACIENTES COM ALD.	46
FIGURA 8 – ANÁLISE INTER-OBSERVADOR COM DADOS DE PACIENTES COM ALD.	47
FIGURA 9 – ANÁLISE INTER-OBSERVADOR NO GRUPO CONTROLE.	47
FIGURA 10 – EVOLUÇÃO DOS VALORES DE ESCORES DE DTI COM A IDADE NO GRUPO CONTROLE.	48
FIGURA 11 – ANÁLISE DOS ESCORES DE LOES E DE DTI.	49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – FENÓTIPOS DA ALD.....	20
TABELA 2 – ESCORE DE LOES.....	27
TABELA 3 – DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES SUBMETIDOS AO TMO.	38
TABELA 4 – RESULTADOS DOS ESCORES DE LOES E DE DTI.....	45

LISTA DE SIGLAS

AD	- <i>Axial Diffusivity</i> (difusibilidade axial)
ADC	- <i>Apparent Diffusion Constant</i> (constante de difusão aparente)
ALD	- Adrenoleucodistrofia
AMN	- Adrenomieloneuropatia
DICOM	- <i>Digital Imaging and Communications in Medicine</i>
DTI	- <i>Diffusion Tensor Imaging</i> (imagem por tensor de difusão)
DWI	- <i>Diffusion Weighted Imaging</i> (imagem ponderada em difusão)
FA	- <i>Fractional Anisotropy</i> (fração de anisotropia)
FLAIR	- <i>Fluid Attenuated inversion Recovery</i>
FoV	- <i>Field of View</i> (campo de visão)
MD	- <i>Mean Diffusivity</i> (difusibilidade média)
MRS	- <i>Magnetic Resonance Spectroscopy</i> (espectroscopia pela RM)
PACS	- <i>Picture Archiving and Communication System</i>
RD	- <i>Radial Diffusivity</i> (difusibilidade radial)
RM	- Ressonância Magnética
ROI	- <i>Region of Interest</i> (região de interesse)
TE	- Tempo de eco
TMO	- Transplante de Medula Óssea
TR	- Tempo de repetição
UBO'S	- <i>unidentified bright objects</i> (objetos brilhantes não identificados)
VLCFA	- <i>Very Long Chain Fatty Acid</i> (ácidos graxos de cadeia muito longa)

LISTA DE ABREVIATURAS

cols.	- colaboradores
ms	- milissegundo
µm	- micrometro

LISTA DE SÍMBOLOS

®	- marca registrada
---	--------------------

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVOS	16
1.1.1	Objetivo principal	16
1.1.2	Objetivos secundários	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	DEFINIÇÃO	18
2.2	HISTÓRIA DA ADRENOLEUCODISTROFIA LIGADA AO X	18
2.3	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E FENÓTIPOS DA ALD-X	19
2.3.1	Doença de Addison	20
2.3.2	Adrenoleucodistrofia forma cerebral (infantil, adolescente e adulto)	21
2.3.3	Adrenomieloneuropatia	22
2.4	TERAPIA	23
2.4.1	Insuficiência adrenal	23
2.4.2	Terapia com dieta	23
2.4.3	TMO	24
2.4.4	Imunossupressão	25
2.4.5	Terapia genética	25
2.5	ESCORE DE LOES	25
2.6	PADRÕES DA ALD-X CEREBRAL NA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA	27
2.7	O TENSOR DE DIFUSÃO	29
2.7.1	Difusão	29
2.7.2	Isotropia, anisotropia e invariância à rotação	30
2.7.3	O tensor de difusão e seus parâmetros	30
2.8	VARIAÇÃO DOS PARÂMETROS DO TENSOR DE DIFUSÃO COM A IDADE	33

2.9	ESTUDOS DE DOENÇAS DESMIELINIZANTES UTILIZANDO O TENSOR DE DIFUSÃO	35
3	PACIENTES E METODOLOGIA	37
3.1	PACIENTES CASOS	37
3.2	PACIENTES CONTROLES	39
3.3	AQUISIÇÃO DAS IMAGENS	39
3.4	LEITURA E PROCESSAMENTO DE DADOS	39
3.5	ESCORES DO TENSOR DE DIFUSÃO	41
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
4	ANÁLISE DOS RESULTADOS	44
5	DISCUSSÃO	50
6	CONCLUSÃO	53
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
8	ANEXOS	62

1 INTRODUÇÃO

A adrenoleucodistrofia ligada ao X (ALD-X), registrada na biblioteca OMIM® – *Online Mendelian Inheritance in Man*® da Universidade de Johns Hopkins – com a referência #300100, é uma doença secundária à mutação no gene *ABCD1* e resulta no defeito da beta oxidação peroxissomal e acúmulo de ácidos graxos saturados de cadeia muito longa (VLCFA) em todos os tecidos do corpo. É determinada geneticamente com herança recessiva ligada ao cromossomo X. As manifestações da doença ocorrem primariamente no córtex adrenal, na mielina do sistema nervoso central e nas células de Leydig nos testículos. O teste diagnóstico mais comumente utilizado é a demonstração do excesso dos VLCFA no plasma (MOSER et al., 1999; MOSER; RAYMOND; DUBEY, 2005). É importante avaliar com cuidado o fenótipo do paciente, que frequentemente muda com o tempo (MOSER, 2006).

Cerca de 50% dos pacientes com o defeito genético da ALD-X desenvolvem a forma cerebral inflamatória em algum estágio da vida, mais comumente na infância, entre 4 e 8 anos de vida. O desenvolvimento neurológico e a função cognitiva no início são normais. Alterações na ressonância magnética (RM) do encéfalo antecedem os sintomas (MOSER; BARKER, 2005), com relatos de alterações na espectroscopia de prótons da RM (MRS) antecedendo alterações na RM convencional (EICHLER; BARKER; et al., 2002; EICHLER; ITOH; et al., 2002; POUWELS et al., 1998). Em cerca de 80 a 85% destes pacientes, as lesões iniciais e mais graves envolvem as regiões parieto-occipitais. O acúmulo anormal de VLCFA na substância branca tem papel importante na cascata de destruição da mielina e do axônio que ocorre neste fenótipo.

Três zonas distintas são identificadas nas áreas das lesões de substância branca. O centro da lesão corresponde a uma zona totalmente desmielinizada (*burned-out zone*). Ao redor desta área, observa-se uma zona intermediária, na qual o realce pelo contraste é frequente, mas nem sempre observado, correspondendo à zona de inflamação. Na periferia identifica-se uma zona de desmielinização ativa (PATAY, 2005).

O padrão-ouro para avaliar a progressão da doença na ALD-X foi proposto por Loes em 1994 (LOES et al., 1994), em uma escala de gravidade na RM de 34 pontos usando um sistema de pontuação baseado na localização e extensão do envolvimento e avaliação de presença de atrofia local ou global. As localizações

selecionadas para o escore de gravidade são as substâncias brancas parieto-occipital, temporal anterior e frontal, corpo caloso, vias visuais e auditivas, fibras de projeção, cerebelo e gânglios da base. O escore de gravidade auxilia na determinação da extensão do dano na mielina no encéfalo. Considera-se um estágio bastante precoce se os escores forem menores que 4, um estágio precoce é considerado com escores entre 4 e 8, um estágio tardio é entre 9 e 13 e um estágio muito tardio se os escores forem maiores que 13. Esta escala é usada por neurorradiologistas que trabalham com grupos de estudo na X-ALD (MOSER; DUBEY; FATEMI, 2004) e sistemas de escores semelhantes baseados neste sistema também são usadas em outras doenças desmielinizantes, como leucodistrofia de células globóides (LOES; PETERS; KRIVIT, 1999), leucodistrofia metacromática (EICHLER et al., 2009) e doença de Krabbe (PROVENZALE et al., 2009). O escore de Loes apresenta algumas limitações, por exemplo, um determinado paciente pode apresentar alterações de sinais sem necessariamente ter alterações no escore, o sistema não considera pequenas diferenças na gravidade da doença (PROVENZALE et al., 2009). O sistema de pontos de gravidade na RM foi elaborado para considerar mudanças como “tudo ou nada”. Esta característica de pequenas mudanças não resultarem em mudança no escore já tinha sido enfatizada no estudo original de Loes (LOES et al., 1994).

O escore de Loes é um dos parâmetros usados no seguimento e orienta decisões terapêuticas para o transplante de células hematopoiéticas (TMO). A progressão das alterações na RM na ALD-X depende da idade do paciente, escore inicial ao diagnóstico e localização anatômica das lesões (padrão da RM). Quando estes dados são interpretados em conjunto, auxiliam a prever o curso da doença e a seleção de candidatos para o TMO (LOES et al., 2003). Peters et al. (PETERS et al., 2004) sugere que o paciente com escore de Loes menor que 9 pode se beneficiar do TMO, mas opiniões mais recentes sugerem que até mesmo escores menores (< 4) podem ser melhores na seleção de candidatos para o TMO (WARREN et al., 2007). O TMO não pode ser justificado na ausência de evidências de desmielinização (i.e., escore de Loes igual a zero) porque 60 a 85% dos meninos não desenvolverão a doença cerebral durante a infância (PETERS et al., 2004). O TMO é o único tratamento que pode interromper o processo de desmielinização de pacientes com ALD-X e resultar em uma boa qualidade de vida a longo prazo, desde que o procedimento seja feito no estágio inicial da doença (CARTIER; AUBOURG,

2010), mostrando uma sobrevida de 5 anos de 89 a 95% contra uma probabilidade de sobrevida de 45 a 54% em pacientes não tratados com o TMO (MAHMOOD et al., 2007; MILLER et al., 2011; PETERS et al., 2004), mas uma cura definitiva ainda não existe (MOSER; RAYMOND; DUBEY, 2005). Considerando que o diagnóstico precoce e o transplante no momento certo são essenciais para que os resultados sejam otimizados, nós esperamos que o uso das técnicas avançadas de RM possam auxiliar nas decisões terapêuticas.

A difusão anisotrópica da água nas fibras nervosas são a base da utilização do tensor de difusão (DTI) para estabelecer o trajeto das fibras nervosas. O fato de que a difusão da água é sensível à microestrutura do tecido subjacente, fornece um método para avaliar a orientação e integridade destas fibras nervosas, que pode ser útil na avaliação de várias doenças neurológicas (BEAULIEU, 2002). O uso do DTI tem várias aplicações e a alteração da anisotropia em doenças desmielinizantes, principalmente na esclerose múltipla, tem sido demonstrado por vários grupos (CASTRIOTA-SCANDERBEG et al., 2003; FILIPPI et al., 2001; NUCIFORA et al., 2007; ROYCHOWDHURY; MALDJIAN; GROSSMAN, 2000). Outros artigos mostraram que os parâmetros de imagem da RM correlacionam com parâmetros histopatológicos na substância branca de forma confiável usando medidas do DTI (SEEWANN et al., 2009; VAN DER VOORN et al., 2011).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo principal

Avaliar como parâmetros do DTI se correlacionam com o escore de Loes. A hipótese é que os parâmetros de DTI têm uma correlação com o grau de desmielinização e com a gravidade da doença e, portanto, deveriam ter uma forte correlação com o escore de Loes.

1.1.2 Objetivos secundários

- Avaliar a reprodutibilidade, intra e interobservador, do método proposto para determinação dos escores de DTI.

- Avaliar o comportamento dos parâmetros do DTI na faixa etária de interesse do estudo.
- Determinar valores de referência para os escores de DTI propostos, na faixa etária dos pacientes do estudo.
- Analisar se os parâmetros de DTI poderiam ajudar a prever mudanças estruturais precoces e, portanto, antecipar mudanças no escore de Loes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DEFINIÇÃO

A ALD-X é uma doença metabólica rara, com estimativa de incidência de 1 em 17.000 nascimentos (BEZMAN; MOSER, 1998), sendo a doença peroxissomal mais comum. É caracterizada por dano na beta-oxidação peroxissomal de ácidos graxos de cadeias muito longas (VLCFA, com mais de 22 carbonos). É causada por defeito no gene *ABCD1*, localizado no cromossomo X, mapeado ao X-q28. O isolamento do gene mostrou que a proteína ALD aparenta ser um membro da superfamília de transportador ABC e é uma proteína de membrana peroxissomal (MOSSER et al., 1993), causando ausência ou disfunção da proteína transmembrana peroxissomal ALDP, que transporta ésteres VLCFacyl-CoA do citosol para o peroxissomo (MOSER et al., 2005). Conseqüentemente, há acúmulo de VLCFA (IGARASHI et al., 1976) no plasma e em todos os tecidos, incluindo a substância branca cerebral, a medula espinhal e o córtex adrenal.

2.2 HISTÓRIA DA ADRENOLEUCODISTROFIA LIGADA AO X

Retrospectivamente, os primeiros casos de ALD-X foram provavelmente descritos no final do século XIX. Em 1897, Heubner descreveu um menino com doença neurológica rapidamente progressiva compatível com ALD-X, classificado como “esclerose difusa” na autópsia (HEUBNER, 1897), citado por Engelen (2012). Casos de “esclerose difusa” que assemelham ALD-X foram também descritos em 1899 por Ceni (CENI, 1899), citado por Engelen (2012), e em 1910 por Heberfeld e Spieler (HABERFELD; SPIELER, 1910), citado por Moser (1997).

Haberfeld e Spieler descreveram um menino previamente hígido, que desenvolveu distúrbios no movimento ocular e na visão com 6 anos de idade, tornou-se apático e o desempenho escolar deteriorou. Quatro meses depois seu andar tornou-se espástico e progrediu para invalidez para andar. Foi hospitalizado aos 7 anos de idade. Foi percebido que a pele estava escurecida, mas esta observação não foi valorizada. Ele tinha paraparesia espástica, apatia grave alternando com irritabilidade, não se comunicava e ficou incontinente. Morreu aos 8 anos de idade. Um irmão mais velho morreu de doença semelhante aos 8,5 anos de

idade. O encéfalo *post-mortem* foi estudado por Paul Schilder e foi relatado como o segundo de três casos referidos como ‘encephalitis periaxialis diffusa’ (SCHILDER, 1912, 1913, 1924), citados por Engelen (2012), caracterizada por envolvimento difuso dos hemisférios cerebrais em crianças com perda severa da mielina, que lembrava a esclerose múltipla por causa da relativa preservação dos axônios e acúmulo de linfócitos, fagócitos carregados de gordura e células gliais.

Schilder sugeriu que o termo “esclerose difusa”, designado na época para qualquer doença da substância branca que causasse enrijecimento do tecido, era muito vago e propôs uma classificação patológica mais detalhada para leucodistrofias. A síndrome de desmielinização cerebral rapidamente progressiva tornou-se conhecida como doença de Schilder. Outros casos foram relatados nos anos seguintes (HOEFNAGEL; VAN DEN NOORT; INGBAR, 1962), citado por Moser (1997). Estudos subsequentes mostraram que o que foi referido como doença de Schilder é heterogêneo e inclui uma variedade de entidades em adição à ALD-X. Siemerling e Creutzfeldt foram os primeiros a relatarem a associação de desmielinização cerebral aguda com sinais clínicos e patológicos da doença de Addison (SIEMERLING; CREUTZFELDT, 1923), citado por Engelen (2012). O nome adrenoleucodistrofia foi estabelecido por Blaw em 1970 (BLAW, 1970), citado por Moser (2005).

2.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E FENÓTIPOS DA ALD-X

Segundo Moser (MOSER et al., 2000, 2005) são descritos quatro fenótipos principais na ALD: (1) a forma cerebral rapidamente progressiva (infantil, adolescente e adulta), sendo a mais comum a forma infantil, e associada a desmielinização inflamatória; (2) a adrenomieloneuropatia, uma axonopatia distal não inflamatória lentamente progressiva; (3) a insuficiência adrenocortical (Addison) sem doença neurológica; e (4) a forma assintomática sem anormalidades endocrinológicas ou endócrinas evidentes. A tabela 1 resume as características principais destes fenótipos.

TABELA 1 – FENÓTIPOS DA ALD.

	ALD cerebral infantil	ALD cerebral adolescente	ALD cerebral adulto	AMN sem doença cerebral	AMN com doença cerebral	Doença de Addison
Frequência (%)	31 - 35	4 - 7	2 - 5	40 - 46	20% do pacientes com AMN durante um período de 10 anos (*)	Diminui com a idade
Idade inicial	2,5 - 10	10 - 21	> 21	> 18	> 18	> 2
Mielopatia	-	Possível em estágio pré-clínico	+ / -	+	+	-
Lesões de substância branca na RM	Extensas	Extensas	Extensas	Degeneração Walleriana dos tratos corticoespinhais no cérebro e tronco, ponte e cápsulas internas	Parieto-occipital, frontal ou envolvendo o centro semioval	-
Alteração cognitiva e comportamental	+	+	+	-	+	-
Neuropatia periférica	-	Raro	Possível	Sensório-motor, maioria axonal, raramente desmielinizante	Sensório-motor, maioria axonal	-
Alteração endócrina	Frequentemente doença de Addison	Frequentemente doença de Addison	Frequentemente doença de Addison	Frequentemente doença de Addison e insuficiência testicular	Frequentemente e doença de Addison e insuficiência testicular	Doença de Addison
Progressão	rápida	rápida	rápida	lenta	rápida	-

FONTE: adaptado de Engelen et al. (2012).

(*): (VAN GEEL et al., 2001).

NOTA: + = presente, - = ausente.

A apresentação clínica da ALD pode variar na mesma família, por exemplo, um paciente pode ter a forma infantil e seu irmão pode apresentar a forma adulta. Aparentemente nem a mutação genética nem o nível da anormalidade bioquímica podem prever a apresentação fenotípica.

2.3.1 Doença de Addison

A insuficiência adrenocortical pode ser o sintoma de apresentação da ALD-X em homens e crianças, anos ou mesmo décadas antes do início dos sintomas neurológicos. A ALD-X é uma causa frequente de doença de Addison em meninos e homens, particularmente quando autoanticorpos adrenocorticais estão ausentes.

2.3.2 Adrenoleucodistrofia forma cerebral (infantil, adolescente e adulto)

São estes fenótipos os que apresentam progressão mais rápida. Mais frequentemente apresentam-se na infância, contudo nunca antes de dois anos e meio de idade (VAN GEEL et al., 1997). Até que fosse possível o diagnóstico bioquímico, a forma cerebral infantil era a única forma da doença reconhecida como adrenoleucodistrofia. O início é insidioso, com déficits nas habilidades cognitivas que envolvem funções visuais espaciais e motoras ou atenção e raciocínio. Em meninos e adolescentes, inicialmente resulta em um declínio do desempenho escolar, sendo frequentemente confundido como transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), atrasando o diagnóstico da ALD-X. Com a progressão da doença, mais déficits neurológicos tornam-se aparentes, com progressão rápida, chegando a necessitar de suporte e supervisão. Geralmente a morte ocorre de 2 a 4 anos após o início dos sintomas, ou com cuidados adequados, podem permanecer em estado aparentemente vegetativo por vários anos.

O declínio neurológico rápido é causado por um processo inflamatório desmielinizante grave afetando primariamente os hemisférios cerebrais. Exames histopatológicos *post-mortem* do tecido cerebral mostram extensa desmielinização com infiltração perivascular de linfócitos e macrófagos, semelhantes, até certo ponto, às lesões desmielinizantes vistas na esclerose múltipla (POWERS et al., 1992). Em cerca de 80% dos pacientes, a lesão desmielinizante inicial está localizada no esplênio do corpo caloso e progride para envolver a substância branca parieto-occipital adjacente. Outra possibilidade é que as lesões desmielinizantes iniciais possam ocorrer no joelho do corpo caloso e progredir de forma simétrica ou assimétrica para a substância branca dos lobos frontais. As lesões podem também envolver inicialmente os tratos piramidais na ponte ou nas cápsulas internas e então estender para a substância branca dos centros semiovais (VAN DER KNAAP; VALK, 2005). Padrões assimétricos também foram descritos (WANG; WU; CHENG, 2006). Na ressonância magnética há aumento de sinal na ponderação em T2 e diminuição na ponderação em T1. Inicialmente as lesões desmielinizantes não mostram realce pelo gadolínio, o que ocorre em uma segunda fase, quando a doença começa a progredir rapidamente, refletindo inflamação grave e quebra da barreira hematoencefálica. Esta transição para um estágio neuroinflamatório rapidamente progressivo pode ocorrer a qualquer momento, em uma fase precoce, quando a

doença está restrita aos tratos piramidais ou ao corpo caloso, ou tardiamente, quando as lesões desmielinizantes já tenham se estendido para a substância branca dos hemisférios cerebrais. Na falta de marcadores biológicos que possam prever a evolução da doença, a RM permanece ainda como o único recurso para detectar precocemente esta evolução, sendo utilizado o escore de Loes para graduar as anormalidades na RM.

Cerca de 10% das formas infantil e adolescente da ALD cerebral podem não desenvolver a forma neuroinflamatória rapidamente progressiva da doença. O mesmo pode ocorrer nas formas adulta e em pacientes com AMN. Estes pacientes são denominados de ALD-X cerebral crônica, podendo ficar estáveis por vários anos, até mais de uma década.

Recomenda-se que o seguimento com RM do encéfalo seja feito a cada 6 meses em meninos com idade entre 3 e 12 anos para rastreamento de sinais precoces da doença cerebral. Após os 12 anos de idade, a incidência da doença cerebral diminui, e os exames podem ser anuais, exceto se houver aparecimento de novos sintomas. Em caso de alteração no exame, mesmo que pequenas alterações no esplênio ou joelho do corpo caloso, o exame deve ser repetido em 3 meses para avaliar evolução da doença, particularmente em busca de realce pelo contraste (gadólíneo) nas lesões (ENGELEN et al., 2012).

2.3.3 Adrenomieloneuropatia

Quase todos os pacientes com ALD-X que atingem a idade adulta desenvolvem a forma AMN, geralmente na terceira ou quarta década de vida. Os sintomas iniciais estão limitados à medula espinhal e aos nervos periféricos. No passado os pacientes com AMN eram frequentemente diagnosticados erroneamente como esclerose múltipla ou paraparesia espástica hereditária. A patologia da AMN é uma axonopatia distal não-inflamatória, que acomete tratos longos na medula espinhal e em menor extensão, nos nervos periféricos (POWERS et al., 2000). A RM do encéfalo é normal ou pode mostrar discretas alterações como aumento de sinal nos tratos piramidais no tronco, ponte e cápsulas internas, que se assemelham com a degeneração Walleriana, e não são consideradas manifestações de doença cerebral da ALD, a não ser que seja observada extensão do sinal para a substância

branca nos centros semiovais. Alterações na medula espinhal são descritas quando utilizadas sequências com transferência de magnetização ou baseadas no tensor de difusão (DUBEY et al., 2005; FATEMI et al., 2005; SMITH et al., 2009).

2.4 TERAPIA

As estratégias terapêuticas da ALD incluem dietas enriquecidas com ácidos graxos monoinsaturados, que competem com ácidos graxos saturados no sistema microssomal de alongamento dos ácidos graxos, levando à diminuição na síntese de VLCFA e sendo mais efetivo em reduzir o nível sanguíneo de VLCFA. O uso do popularmente conhecido óleo de Lorenzo (LERNER, 2009), uma mistura 4:1 de glicerol trioleato e glicerol trierucato, é considerado um tratamento preventivo, sendo associado à diminuição do risco de desenvolver anormalidades na RM, sendo recomendado em meninos assintomáticos com ALD-X, que têm exames de RM normais (MOSER et al., 2005). Outro ponto importante no tratamento da ALD cerebral é o transplante de medula óssea, sendo que o resultado é altamente dependente do grau de envolvimento cerebral no momento do transplante. Se realizado no início do curso da doença, o TMO pode prevenir a deterioração e pode levar à melhora das lesões cerebrais vistas na RM.

2.4.1 Insuficiência adrenal

A insuficiência adrenal responde rapidamente à terapia de reposição de esteroides, mas infelizmente pode não ser reconhecida, sendo um erro grave, uma vez que a insuficiência adrenal tem sido a causa da morte de vários pacientes que tinham poucos ou nenhum sintoma neurológico.

2.4.2 Terapia com dieta

O achado de Kishimoto et al. (KISHIMOTO et al., 1980), de que os VLCFAs no cérebro na ALD-X são ao menos em parte de origem da dieta, levou à elaboração de dietas que restringem a ingestão de ácidos VLCFA saturados. A terapia com

dieta para reduzir os níveis de VLCFA foi introduzida em 1981 (BROWN et al., 1982), porém a dieta restritiva de VLCFA saturados não alterou o nível plasmático do ácido hexacosanóico (C26:0), sugerindo que a ingestão de VLCFA não é a principal fonte que leva ao acúmulo do mesmo na ALD, levando à procura de tentativas de reduzir a síntese endógena. Em 1986, foi demonstrado que a adição de ácido oleico monoinsaturado reduziu os níveis e a taxa de síntese de VLCFA saturados em cultura de fibroblastos de pacientes com ALD (RIZZO et al., 1986) e a administração oral de glicerol trioleato por um período de 3 a 4 meses baixou o nível plasmático do C26:0 em cerca de 50% (RIZZO et al., 1987). Em 1989, foi introduzida a terapia com ácido erúxico, levando ao uso do óleo de Lorenzo (ODONE; ODONE, 1989). Há consenso que o seu uso é preventivo em pacientes assintomáticos, porém não altera a progressão significativamente em pacientes que já tenham sintomas neurológicos (RIZZO; LESHNER; ODONE, 1990).

2.4.3 TMO

O primeiro TMO para um paciente com ALD-X foi relatado em 1984 (MOSER et al., 1984). O raciocínio foi baseado na demonstração de que células derivadas de medula óssea normal podem degradar VLCFA e que esta capacidade está deficiente em pacientes com ALD-X (SINGH et al., 1984). Este procedimento não é recomendado em pacientes assintomáticos com RM normal porque estes pacientes têm probabilidade superior a 50% de não desenvolver a forma grave da doença, e, portanto não deveriam ser submetidos ao risco do procedimento. A indicação principal é em pacientes com evidência precoce de envolvimento cerebral com base na RM e testes neuropsicológicos (KRIVIT et al., 1995). Também não se recomenda para pacientes da forma addisoniana, para o fenótipo AMN ou para aqueles com doença cerebral avançada (PETERS et al., 2004). Para detectar o surgimento de anormalidades em uma fase precoce da doença cerebral, quando o TMO é mais efetivo, recomenda-se que o rastreamento com RM seja feito nos pacientes assintomáticos em um intervalo entre 6 a 12 meses (MOSER, 1997). Mesmo após o transplante, as lesões desmielinizantes continuam a progredir geralmente durante um período de 12 a 18 meses e então param de progredir. Esta demora na resposta é aparentemente devido à lenta substituição da micróglia cerebral das células

derivadas do TMO. O mecanismo como ocorre esta suposta correção é desconhecido.

2.4.4 Imunossupressão

A imunossupressão é feita para abolir ou reduzir a resposta inflamatória no cérebro, que está associada com a forma cerebral rapidamente progressiva. O objetivo é converter a forma grave da doença na forma leve da adrenomieloneurpatia.

2.4.5 Terapia genética

A ALD-X é um candidato promissor para a terapia genética, uma vez que a condição pode ser diagnosticada anos antes que os danos neurológicos ocorram. O gene tem sido isolado e tem sido mostrado que sua presença corrige o defeito no metabolismo do VLCFA em células (CARTIER et al., 1995). A terapia genética com células-tronco hematopoiéticas para o sistema nervoso central (SNC) é baseada na possibilidade de corrigir um subconjunto de células gliais, a micróglia, que corresponde a cerca de 20% das células gliais e estão distribuídas de forma ubíqua no SNC. Os resultados ainda são preliminares (BIFFI; AUBOURG; CARTIER, 2011).

2.5 ESCORE DE LOES

O método atual de fazer controle evolutivo por imagem em pacientes com adrenoleucodistrofia foi proposto por Loes em 1994 (LOES et al., 1994), em um trabalho envolvendo várias instituições, avaliando 175 exames de ressonância magnética de 83 pacientes masculinos com menos de 20 anos de idade com diagnóstico de ALD. O sistema, apresentado na tabela 2, observa alterações de sinais em locais determinados (substância branca parieto-occipital, substância branca temporal anterior, substância branca frontal, corpo caloso, vias visuais, vias auditivas, fibras de projeção, cerebelo e gânglios da base) e observa atrofia, global e local. No caso da avaliação da substância branca dos hemisférios cerebrais, o autor deste sistema justifica que a escolha da substância branca parieto-occipital inclui a substância branca temporal posterior e que a ALD tende a estar localizada

na junção destes três lobos (parietal, occipital e temporal). A pontuação varia de 0 a 34 e cada item avaliado pontua como “tudo” ou “nada”, sendo observadas alterações de hipersinal na ponderação em T2 ou hipossinal em T1 ou realce pelo contraste. No entanto, algumas regras são adicionadas, uma delas refere-se ao acometimento questionável, com valor de 0,5. O envolvimento unilateral também tem o valor de meio ponto, valendo 1 quando bilateral. Não são consideradas na pontuação as alterações de sinais conhecidas como “objetos brilhantes não identificados”, os UBO’S da literatura inglesa, considerados incomuns na população pediátrica e raramente atribuídos à ALD. Os autores ressaltam também que o escore foi idealizado para comparar exames de RM seriados em um paciente e enfatizam que mudanças sutis geralmente não resultam em mudança no escore. Um escore de 0 ou 0,5 é considerado normal, enquanto que escore maior ou igual a 14 é considerado grave. Pacientes com escore de até 8 ou 9 pontos podem ser considerados candidatos ao TMO.

TABELA 2 – ESCORE DE LOES.

Escala de gravidade na RM	
Substância branca parieto-occipital	– máximo de 4 pontos
Substância branca temporal anterior	– máximo de 4 pontos
Substância branca frontal	– máximo de 4 pontos
	Periventricular
	Central
	Subcortical
	Atrofia local
Corpo caloso	– máximo de 5 pontos
	Esplênio
	Corpo
	Joelho
	Atrofia do esplênio
	Atrofia do joelho
Vias visuais	– máximo de 4 pontos
	Radiações ópticas
	Loop de Meyer
	Corpo geniculado lateral
	Trato óptico
Vias auditivas	– máximo de 4 pontos
	Corpo geniculado medial
	Braço do colículo inferior
	Lemnisco lateral
	Ponte
Fibras de projeção	– máximo de 2 pontos
	Cápsula interna
	Tronco cerebral
Cerebelo	– máximo de 2 pontos
	Substância branca
	Atrofia
Gânglios da base	– máximo de 1 ponto
Atrofia global	– máximo de 4 pontos
	Leve
	Moderada
	Severa
	Tronco

Escala de gravidade da RM específica para a adrenoleucodistrofia ligada ao X. Atribui-se 0 se normal, 0,5 para acometimento unilateral e 1 se bilateral. O valor máximo é 34. Escore maior ou igual a 1 é considerado anormal.

FONTE: Loes (1994).

2.6 PADRÕES DA ALD-X CEREBRAL NA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

O estudo de Loes e cols. (LOES et al., 2003) avaliou o quanto o padrão de distribuição das lesões da ALD pode prever a evolução da progressão da doença, sendo avaliados 206 pacientes masculinos sem TMO. Os padrões foram divididos em 5 grupos baseado na localização anatômica das hiperintensidades de sinal na ponderação em T2 (padrão 1: parieto-occipital, padrão 2: frontal, padrão 3: trato corticoespinal, padrão 4: cerebelo e padrão 5: acometimento concomitante parieto-occipital e frontal). O padrão 1 tem progressão rápida se tiver realce pelo contraste e a manifestação na RM tiver sido precoce. O padrão 2 também tem progressão

rápida se tiver manifestação precoce na RM. A progressão foi muito mais lenta para padrões 3 e 4. O padrão 5 foi o mais incomum, porém mais rápido que qualquer outro padrão. A figura 1 ilustra casos do trabalho realizado, sendo que foram observados padrões 1, 3 e 5.

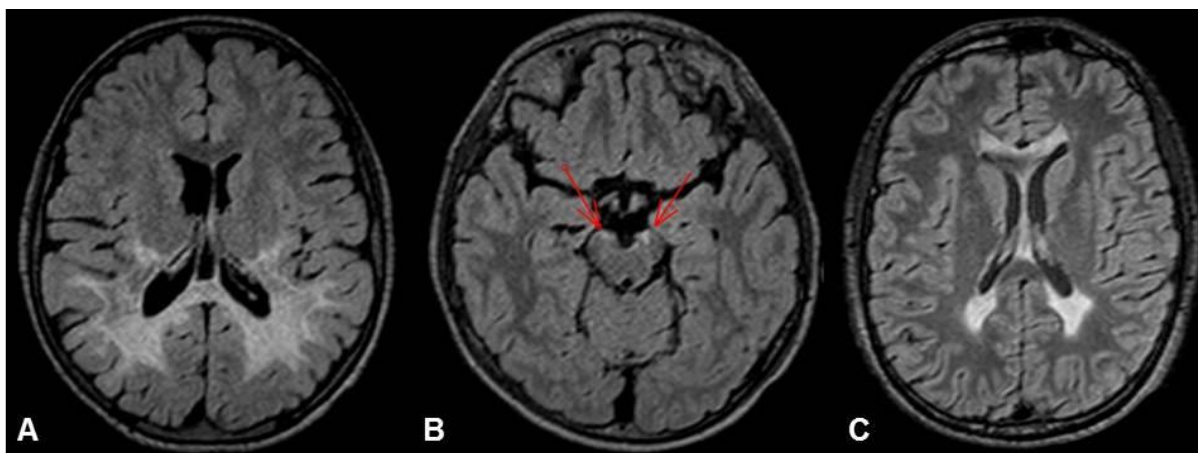


FIGURA 1 – EXEMPLOS DE PADRÕES DA ALD NA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA.

Estas imagens ponderadas em T2 (FLAIR) ilustram os três padrões que foram observados neste estudo. A: padrão 1 = substância branca parieto-occipital; B: padrão 3 = trato corticoespinal (indicado com setas, ao nível dos pedúnculos cerebrais); padrão 5 = acometimento simultâneo da substância branca parieto-occipital e frontal.

FONTE: O autor (2012).

Para pacientes com lesões parieto-occipitais (padrão 1) a predição da progressão do escore de Loes em 1 ano é dada pela fórmula a seguir:

$$2,28 \times \text{realce} - 0,07 \text{ idade inicial em anos} + 1,05 \text{ escore inicial} + 0,87$$

Realce é considerado 1 quando há realce perilesional pelo gadolínio e considerado 0 quando não há.

Para pacientes com lesões frontais (padrão 2) a predição da progressão do escore de Loes em 1 ano é dada pela fórmula:

$$2,1 \text{ escore inicial} - 4,4 \text{ subgrupo idade} - 0,48$$

Sendo que subgrupo idade vale 0 para pacientes com menos de 13 anos e 1 para pacientes com 13 anos ou mais.

Para pacientes com padrão 3 (envolvimento do trato corticoespinal) o aumento médio do escore de Loes em 1 ano é de $0,44 \pm 0,16$.

2.7 O TENSOR DE DIFUSÃO

2.7.1 Difusão

A difusão na RM do encéfalo foi adotada para uso clínico na neurorradiologia nos anos de 1990 e teve utilidade imediata na avaliação de lesão isquêmica aguda. A difusão refere-se ao movimento molecular randômico devido ao calor, conhecido como “movimento Browniano”. A uma temperatura fixa, a taxa de difusão pode ser descrita pela equação de Einstein:

$$\langle r^2 \rangle = 6Dt ,$$

onde $\langle r^2 \rangle$ refere-se ao deslocamento quadrático médio das moléculas, t é o tempo de difusão, e D é uma constante de difusão para uma substância em particular. No caso de imagens para uso clínico, interessa a difusão da água, significando o movimento de moléculas de água em um meio composto basicamente de água. A constante de difusão, tipicamente expressa em unidades de milímetros quadrados por segundo, relaciona o deslocamento médio da molécula em uma área durante um tempo de observação, sendo que valores altos desta constante indicam mais moléculas de água móveis. O coeficiente de difusão aparente (ADC) reflete as limitações que a difusão *in vivo* não permite distinguir, como transporte ativo, gradientes de pressão e mudanças da permeabilidade da membrana.

A avaliação da difusão da água permite estudar propriedades microestruturais em tecidos biológicos. Tempos de difusão típicos para uso clínico são em torno de 10 a 50 ms, correspondendo a deslocamentos moleculares médios da ordem de 10 μm , na faixa das dimensões celulares. Isto tem sido explorado para a detecção de isquemia cerebral aguda (CHIEN et al., 1992; GONZÁLEZ et al., 1999), distinguir edema vasogênico do citotóxico (EBISU et al., 1993), identificação de focos de lesão axonal decorrentes de trauma (ARFANAKIS et al., 2002), caracterização de celularidade de tumores cerebrais (CHENEVERT; SUNDGREN; ROSS, 2006; KONO et al., 2001; KRABBE et al., 1997), distinguir gliomas de

metástases (LU et al., 2003), distinguir recidivas tumorais de lesões pós-operatórias (SMITH et al., 2005), diferenciar abscesso piogênico de tumores (KIM et al., 1998) e para mapeamento da conectividade na substância branca (MORI et al., 1999; PIERPAOLI et al., 1996).

2.7.2 Isotropia, anisotropia e invariância à rotação

Na difusão isotrópica o movimento molecular é igual em todas as direções. No cérebro a difusão é isotrópica nos espaços contendo líquido cefalorraquidiano, exceto em regiões de alto fluxo, por exemplo, nos forames de Monro ou no aqueduto cerebral. Devido à complexa microestrutura, a substância cinzenta da córtex cerebral também é considerada como apresentando difusão isotrópica. Na difusão isotrópica a sequência de pulso da aquisição na RM pode ser baseada em apenas uma direção de gradiente, pois os valores de ADC são idênticos em todas as direções.

Na difusão anisotrópica, a mobilidade molecular não é a mesma em todas as direções. A substância branca, com feixes de fibras nervosas, dificulta o deslocamento das moléculas de água perpendicularmente à direção das fibras, resultando em valores de ADC maiores no eixo paralelo às fibras. Portanto, é necessário aquisição com mais direções de gradiente. Se a aquisição fosse baseada em apenas uma direção, a interpretação seria complicada pela variação do sinal ao longo dos feixes de fibras nervosas e também por mudanças na posição do paciente. Para contornar este problema os parâmetros são computados através da propriedade da invariância à rotação, a partir dos dados originais da difusão, de forma que, matematicamente elimina-se qualquer dependência direcional que poderia confundir a interpretação clínica (MUKHERJEE; BERMAN; et al., 2008).

2.7.3 O tensor de difusão e seus parâmetros

O tensor de difusão D , uma matriz de vetores, é um modelo matemático de um padrão tridimensional da difusão anisotrópica nos feixes de substância branca. Para facilitar o entendimento dos conceitos apresentados até agora, a figura 2 ilustra a relação dos trajetos das moléculas, o formato do elipsoide correspondente e a matriz matemática do tensor de difusão. Para difusão isotrópica, o elipsoide de

difusão é uma esfera, pois os coeficientes de difusão aparente são iguais em qualquer direção. A difusão anisotrópica tem como modelo um elipsoide alongado, indicando a maior difusão média no maior eixo do elipsoide. Os elementos do tensor acima da diagonal são iguais aos abaixo da diagonal (vide matriz na figura 2), uma característica denominada “simetria conjugada”, que reflete a simetria antipodal do movimento Browniano. A figura 3 ilustra uma imagem obtida a partir da sequência DTI, com elipsoides representando a difusão anisotrópica na substância branca do encéfalo, sendo que cada elipsoide representa um *voxel* e está relacionado a características microestruturais locais.

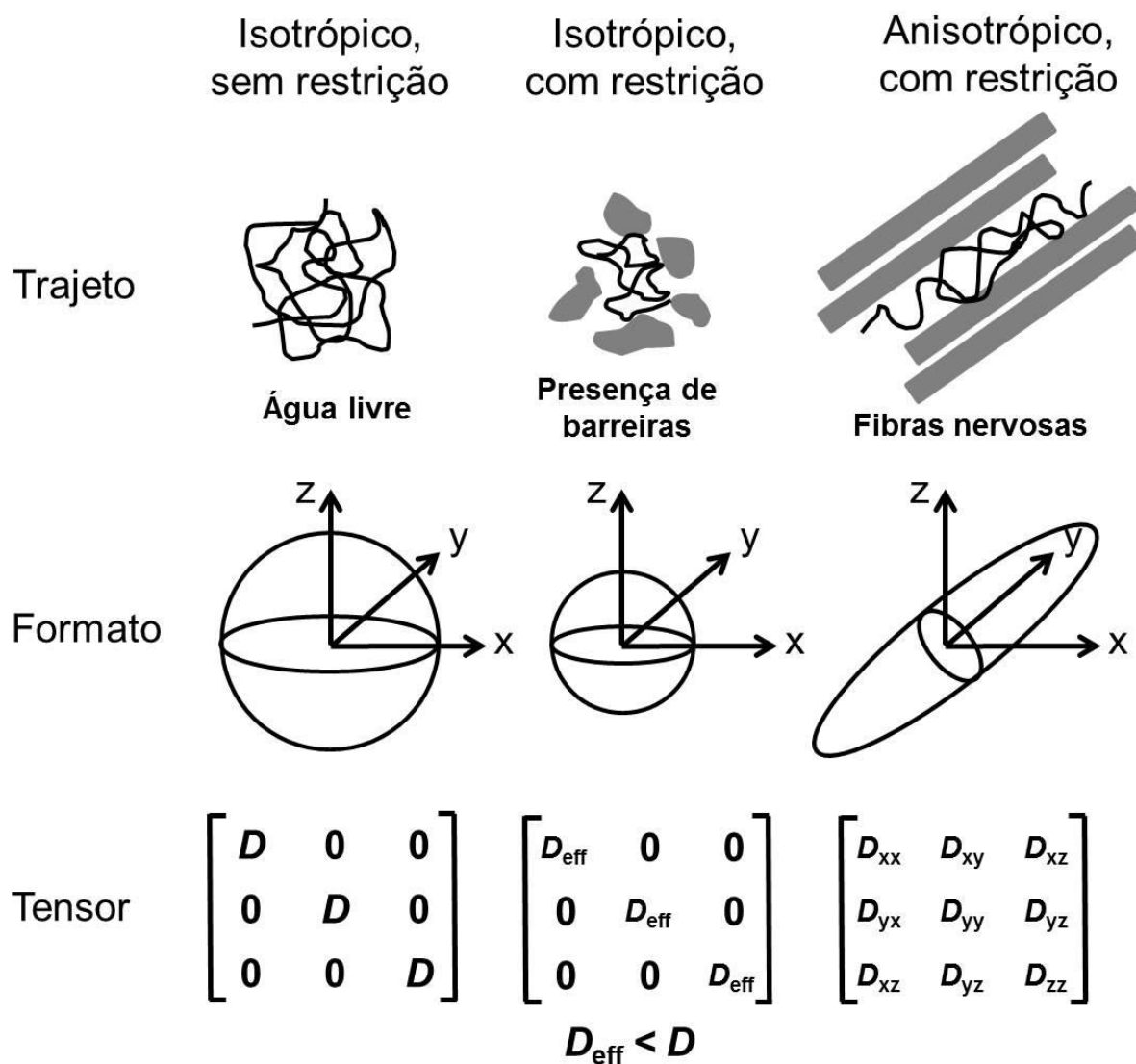


FIGURA 2 – FORMATO DOS ELIPSOIDES E MATRIZES DOS TENSORES PARA DIFUSÃO ISOTRÓPICA SEM RESTRIÇÃO, DIFUSÃO ISOTRÓPICA COM RESTRIÇÃO E DIFUSÃO ANISOTRÓPICA COM RESTRIÇÃO.

FONTE: O autor (2012), adaptado de Mukherjee et al. (2008) (MUKHERJEE; BERMAN; et al., 2008).

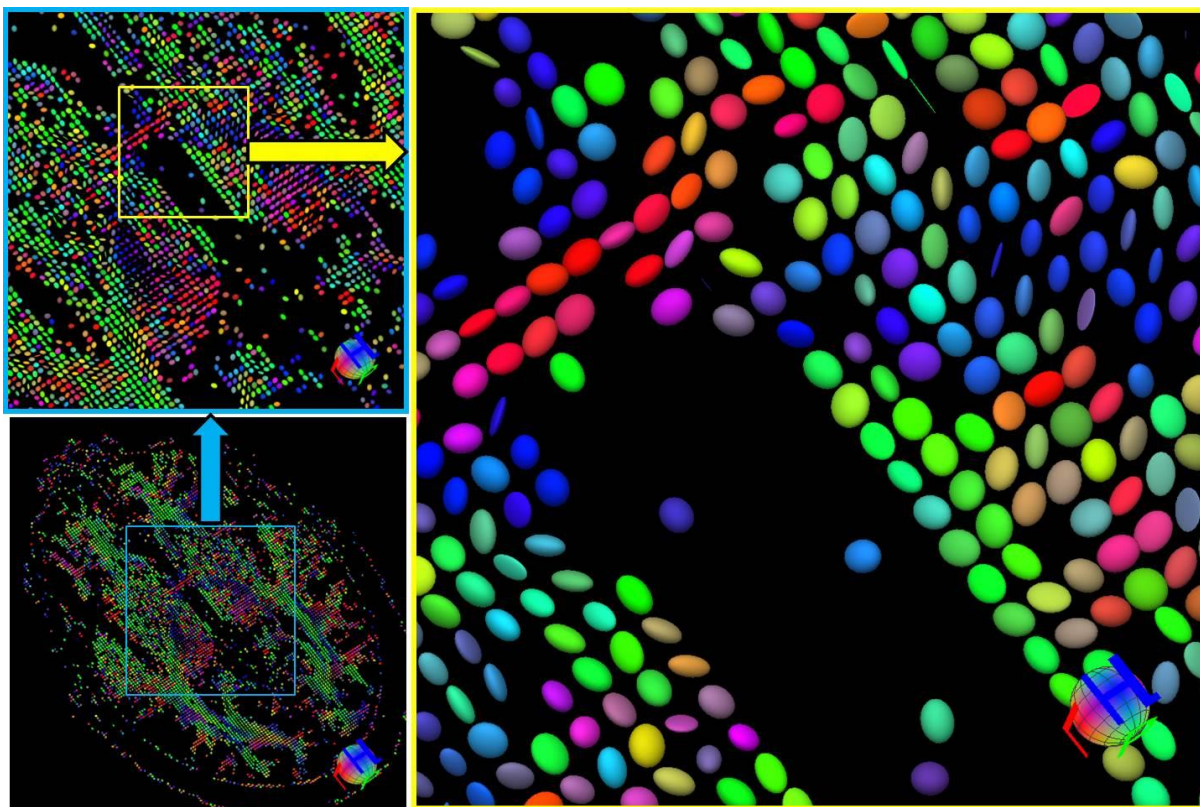


FIGURA 3 – ILUSTRAÇÃO DOS ELIPSOIDES DO TENSOR DE DIFUSÃO EM IMAGEM CLÍNICA DO ENCÉFALO.

As cores codificam a direção, sendo que tons avermelhados indicam direção transversa, tons esverdeados indicam direção longitudinal (anteroposterior) e tons azulados indicam direção vertical (craniocaudal).

FONTE: O autor (2012).

Através de diagonalização da matriz de difusão D pode-se calcular os principais eixos do tensor de difusão na matriz diagonalizada Λ , chamados de *eigenvectors*, e os valores com invariância à rotação λ_1 , λ_2 e λ_3 , chamados de *eigenvalues*, descrevendo assim a direção (vetores) e magnitude (valores) dos três eixos do elipsoide, em ordem decrescente de tamanho.

$$\Lambda = \begin{bmatrix} \lambda_1 & 0 & 0 \\ 0 & \lambda_2 & 0 \\ 0 & 0 & \lambda_3 \end{bmatrix} = R \cdot D \cdot R^T$$

O maior *eigenvector* (*eigenvector* principal) e o respectivo *eigenvalue* λ_1 fornecem a direção e magnitude da maior difusão da água, sendo importantes nos algoritmos de tratografia porque indicam a orientação dos feixes de fibras nervosas. O *eigenvalue* λ_1 também é denominado de difusibilidade longitudinal ou axial (AD).

$$AD = \lambda_1$$

Os *eigenvalues* λ_2 e λ_3 fornecem a magnitude da difusão no plano transversal, e a média destes valores é conhecida como difusibilidade radial (RD).

$$RD = \frac{\lambda_2 + \lambda_3}{2}$$

Outro valor que é utilizado para caracterizar o elipsoide é a difusibilidade média (MD), que é a média dos 3 *eigenvalues*:

$$MD = \frac{\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3}{3} = \frac{\text{trace}(D)}{3}$$

O traço (*trace*) da matriz, que é a soma dos elementos da diagonal principal, é a soma dos 3 *eigenvalues*.

A fração de anisotropia FA mede o “grau de direcionalidade” da difusibilidade intravoxel, com valores variando de zero, no caso de difusão isotrópica, a 1, indicando difusão perfeitamente linear, apenas no eixo do *eigenvector* principal:

$$FA = \frac{\sqrt{(\lambda_1 - \lambda_2)^2 + (\lambda_2 - \lambda_3)^2 + (\lambda_3 - \lambda_1)^2}}{\sqrt{2} \sqrt{\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2}}$$

O estudo da difusão da água, paralela (AD) e perpendicularmente (RD) aos axônios, tem sido usado para estudar o estado da integridade axonal e das alterações na mielina, respectivamente (KUMAR et al., 2012). Estudo experimental no corpo caloso de ratos demonstrou que a difusibilidade radial reflete a gravidade da desmielinização (SONG et al., 2005).

2.8 VARIAÇÃO DOS PARÂMETROS DO TENSOR DE DIFUSÃO COM A IDADE

Um estudo com 30 indivíduos e pacientes pediátricos com idades entre 0 e 54 meses avaliou medidas a partir do tensor de difusão, sendo medidos a FA, o

ADC, e nb0 (intensidade de sinal normalizado de b0). A evolução da FA pode ser dividida em três fases: uma fase com rápidas mudanças nos primeiros 12 meses, seguida de mudanças lentas no segundo ano de vida e relativa estabilidade após os 24 meses de vida (HERMOYE et al., 2006) (figura 4).

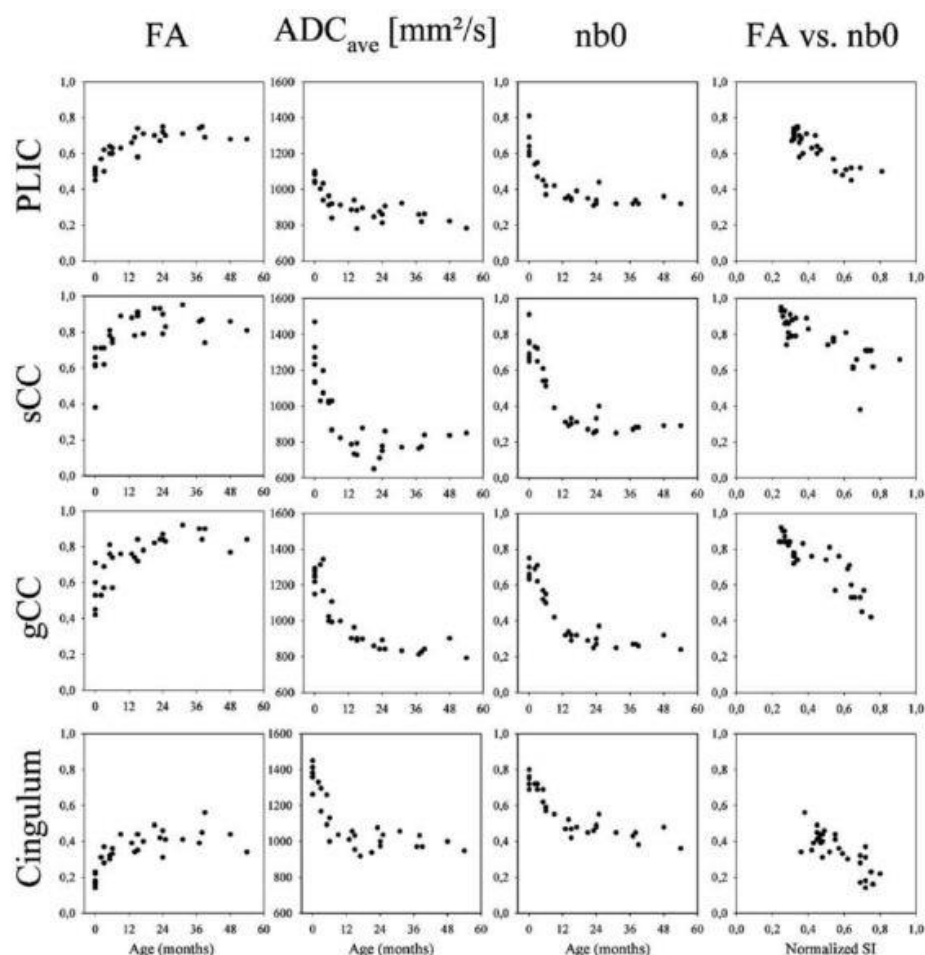


FIGURA 4 – EVOLUÇÃO DA FA COM A IDADE NA FAIXA ETÁRIA DE 0 A 5 ANOS.

Os gráficos ilustram alguns dados do estudo de Hermoye e cols., podendo-se observar a fase de alterações rápidas no primeiro ano de vida, a fase de alterações lentas no segundo ano de vida e posteriormente a relativa estabilização. PLIC = perna posterior da cápsula interna, sCC = esplênio do corpo caloso, gCC = joelho do corpo caloso.

FONTE: extraído de Hermoye et cols. (2006) (HERMOYE et al., 2006).

O estudo de Kumar e cols. (KUMAR et al., 2012) (figura 5) avaliou as difusibilidades axial e radial em vários locais no encéfalo, em 30 indivíduos na faixa etária de 8 a 24 anos de idade, para avaliar mudanças durante o desenvolvimento cerebral. O estudo mostrou correlações (r) negativas de RD e AD com a idade em múltiplas áreas. A redução da difusibilidade radial com a idade foi atribuída à mielinização.

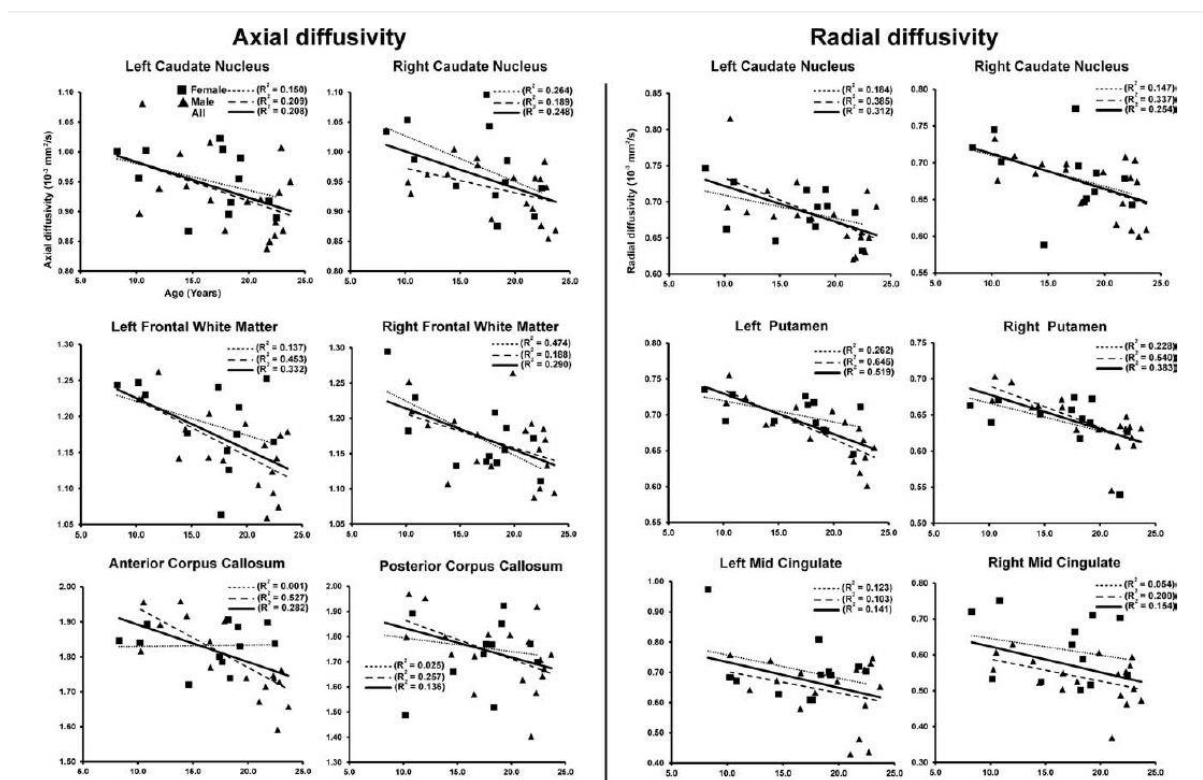


FIGURA 5 – VARIAÇÃO DAS DIFUSIBILIDADES AXIAL E RADIAL COM A IDADE.

Os gráficos ilustram algumas das regiões avaliadas no estudo de Kumar e cols., sendo observada a diminuição dos valores de AD e RD com a idade.

FONTE: extraído de Kumar e cols. (2012) (KUMAR et al., 2012).

2.9 ESTUDOS DE DOENÇAS DESMIELINIZANTES UTILIZANDO O TENSOR DE DIFUSÃO

Estudos avaliando alterações da anisotropia em doenças desmielinizantes, principalmente na esclerose múltipla, foram realizados por vários grupos (CASTRIOTA-SCANDERBEG et al., 2003; FILIPPI et al., 2001; NUCIFORA et al., 2007; ROYCHOWDHURY; MALDJIAN; GROSSMAN, 2000).

Para o estudo da ALD, Ito e cols. (ITO et al., 2001) avaliaram 11 pacientes masculinos e mediram a FA em áreas com alterações de sinais, mostrando a redução deste valor comparado a áreas aparentemente normais. Um artigo de Schneider e cols. de 2003 (SCHNEIDER et al., 2003) avaliou a FA em 3 pacientes, observou a redução da FA comparado a 7 controles, sugerindo a FA como indicador de desmielinização em áreas consideradas normais no exame de RM convencional. Devido ao pequeno número de observações sugeriu-se avaliações em séries maiores. Dubey e cols. (DUBEY et al., 2005) avaliaram o uso da FA em pacientes

com adrenomieloneuropatia e observaram redução destes valores em pacientes com exame convencional de RM do encéfalo normal. Foram avaliados neste estudo os tratos corticoespinhais e o joelho do corpo caloso. Não há na literatura estudos que avaliem a ALD através da metodologia e dos escores propostos no presente trabalho.

3 PACIENTES E METODOLOGIA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC/UFPR), que está credenciado junto à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Ministério da Saúde. O estudo está registrado no CONEP com número de identificação 0333.0.031.208-10.

3.1 PACIENTES CASOS

Foram avaliados exames de ressonância magnética de 14 pacientes masculinos com diagnóstico de ALD, com idade variando entre 4 e 20 anos, sendo que 9 foram submetidos ao TMO. Os dados clínicos dos 9 pacientes submetidos ao TMO estão listados na tabela 3. Os exames compreendem um período de 5 anos e 3 meses, entre março de 2007 e junho de 2012.

O trabalho é retrospectivo, avaliando exames de rotina de ressonância magnética em pacientes portadores de ALD, realizados na clínica de diagnóstico por imagem DAPI (Diagnóstico Avançado por Imagem), Curitiba – PR. Os pacientes avaliados são acompanhados pelo serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Dentre as sequências obtidas na avaliação deste pacientes está incluída rotineiramente a aquisição de tensor de difusão (DTI). A partir desta sequência foram calculados os parâmetros do tensor de difusão.

TABELA 3 – DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES SUBMETIDOS AO TMO.

Paciente	Idade no transplante (anos)	Regime preparatório	Protocolo DECH	Tipo de doador	Compatibilidade HLA	Total de células infundidas	Mucosite	Pega do enxerto	DECH aguda	DECH crônica	Último seguimento
2	4,5	BU+CY+ATG	CS+steds	Não relacionado	5/6 SCU	$5,1 \times 10^7$ /kg	grau III	Não	Não avaliável	Não avaliável	Morreu no dia D+617 após um Segundo transplante. Rejeição e infecção.
3	6,6	BU+CY+ATG	CS+MTX	Não relacionado	4/6 SCU	$4,3 \times 10^7$ /kg	zero	Não	Não avaliável	Não avaliável	Morreu no dia D+283 após transplante. Rejeição. Recebeu um segundo transplante de sangue de cordão umbilical mas morreu por causa de infecção e insuficiência de múltiplos órgãos.
5	18,3	BU+CY+ATG	CS+MTX	Não relacionado	10/10 MO	$4,64 \times 10^8$ /kg	grau III	Sim	grau III	Extenso e grave	Morreu no dia D+744 pós-transplante. DECH crônica e aspergilose pulmonar.
6	8,9	BU+CY+ATG	CS+MTX	Primo	9/10 MO	$7,35 \times 10^8$ /kg	grau I	Sim	grau IV	Limitado	Vivo e bem, sem deterioração neurológica.
9	19,2	BU+CY+ATG	CS+MTX	Não relacionado	9/10 MO	$3,42 \times 10^8$ /kg	grau III	Sim	grau III	Limitado	Vivo e bem, sem deterioração neurológica.
10	11,9	BU+CY+ATG	CS+MTX	Não relacionado	8/10 MO	$2,32 \times 10^8$ /kg	grau III	Sim	Não	Não	Vivo e bem, sem deterioração neurológica.
11	7,9	BU+CY+ATG	CS+MTX	Não relacionado	10/10 MO	$2,55 \times 10^8$ /kg	grau III	Sim	Não	Não	Vivo e bem, sem deterioração neurológica.
12	9,6	BU+CY+ATG	CS+MTX	Não relacionado	9/10 MO	$4,15 \times 10^8$ /kg	grau III	Sim	Não	Não	Deterioração neurológica lenta. Perda da visão. Necessita de atenção e cuidados especiais.
14	10,7	BU+CY	CS+MTX	irmão	10/10 MO	$3,25 \times 10^8$ /kg	grau I	Sim	Não	Não	Deterioração lenta, mas progressiva. Frequenta a escola, pratica esporte (futebol). Perda visual leve.

FONTE: Serviço de TMO do Hospital de Clínicas da UFPR, Bonfim (2012).

NOTA: DECH = doença do enxerto contra o hospedeiro, HLA = *Human Leukocyte Antigen*, BU = Busulfano, CY = Ciclofosfamida, ATG = Globulina anti-timócito, CS = Ciclosporina, MTX = metotrexato, steds = esteroides, CB = sangue de cordão umbilical, BM = medula óssea.

3.2 PACIENTES CONTROLES

Foram realizadas medidas dos escores propostos em um grupo controle formado por 28 pacientes masculinos, com idades entre 4 e 20 anos, que tinham queixas clínicas não atribuídas a doenças de substância branca (investigação de cefaléias, patologias dos ouvidos internos, regiões das órbitas e sela turca e estudo de lesões extra-axiais – cistos aracnoidais) e com resultados normais no estudo de RM convencional.

3.3 AQUISIÇÃO DAS IMAGENS

Os exames dos pacientes com ALD foram realizados em aparelho de RM de alto campo magnético, de 1,5 Tesla (Siemens MAGNETOM® Avanto, AG, Erlangen, Germany), com duas aquisições de RM: uma sequência FLAIR (imagens no plano sagital, TR de 7.000ms, TE de 384ms, TI de 2.500ms, espessura de corte de 1mm, matriz 424x512 e FoV de 230x280mm) para avaliação convencional das alterações morfológicas e de sinais das lesões, determinando-se o escore de Loes, e a sequência objeto deste estudo, a sequência do tensor de difusão – DTI (plano axial, TR de 4.900ms, TE de 103ms, espessura de corte de 3mm, matriz 192x192, FoV de 230x230mm, 12 direções). Ressalte-se que a sequência DTI não se trata de sequência adicional, mas sim uma sequência realizada de rotina em todos os exames de avaliação do encéfalo, com o objetivo primário de obter mapas de difusão da água (prótons) – DWI. Os dados são armazenados no PACS da clínica, no formato DICOM.

Os exames do grupo controle foram realizados no mesmo aparelho, com parâmetros da sequência DTI ajustados para exames clínicos: TR, 3.100ms; TE, 95ms; espessura de corte, 5mm; matriz 148x148, FoV 230x230mm, 12 direções.

3.4 LEITURA E PROCESSAMENTO DE DADOS

Dois radiologistas, Sergio Eiji Ono (observador 1) e Luiz Otávio de Mattos Coelho (observador 2), com mais de cinco anos de experiência em neurorradiologia realizaram a interpretação das imagens convencionais (FLAIR) para o escore de

Loes e as leituras dos parâmetros DTI. A interpretação das imagens FLAIR foi de forma independente e no caso de discrepâncias o escore de Loes foi através de consenso.

As leituras dos parâmetros DTI foram obtidas de forma independente para avaliação de concordância intra e interobservador.

A leitura, interpretação e o cálculo do escore de Loes foram obtidas de forma direta, por análise das imagens da sequência FLAIR, utilizando-se visualizador de arquivos DICOM (Kodak Carestream PACS Cliente Suite).

Já o processamento do DTI deriva várias medidas, sendo que as de interesse são FA, MD, RD e AD. Isto foi obtido com o software de uso público DTI-Studio, versão 3.0.3, setembro de 2010, H. Jiang e S. Mori, do departamento de radiologia da Universidade Johns Hopkins, Baltimore – EUA (<https://www.mristudio.org>).

Com os mapas dos parâmetros obtidos, fizeram-se as medidas de FA, *trace* e RD das regiões de interesse (ROIs) pré-determinadas, baseados nos locais do estudo de Schneider, sobre medidas de FA em pacientes com ALD. Foram 9 locais bilateralmente, totalizando 18 medidas, nas seguintes localizações: pernas anterior e posterior da cápsula interna, centro semioval, substância branca parietal, substância branca occipital, substância branca temporal anterior, substância branca frontal e joelho e esplênio do corpo caloso. Para esta leitura foi utilizado o próprio DTI-Studio. A medida do parâmetro MD foi derivada da medida *trace* (traço da matriz de difusão diagonalizada) através da fórmula:

$$MD = \frac{trace}{3}$$

E o parâmetro AD foi obtido através da fórmula:

$$AD = trace - 2 \times RD$$

Os escores finais são obtidos de forma análoga ao escore de Loes, simplesmente somando-se os valores os parâmetros dos locais pré-determinados.

O escore de Loes varia em uma escala de 0, considerado RM normal, a 34, valor máximo para esta escala. No escore de FA espera-se uma correlação negativa, com diminuição do FA, e nos escores de MD, RD e AD espera-se uma correlação positiva dos valores.

3.5 ESCORES DO TENSOR DE DIFUSÃO

O presente estudo propõe “escores de tensor de difusão”. As medidas dos parâmetros são feitas nos locais propostos por Schneider (SCHNEIDER et al., 2003): (1) perna posterior da cápsula interna (PPCI); (2) centro semioval (CSO); (3) substância branca do lobo frontal (SBLF); (4) substância branca do lobo parietal (SBLP); (5) substância branca do lobo temporal (SBLT); (6) substância branca do lobo occipital (SBLO); (7) joelho do corpo caloso (JCC); (8) esplênio do corpo caloso (ECC) e (9) perna anterior da cápsula interna (PACI). A figura 6 mostra os locais referidos em um exame padrão.

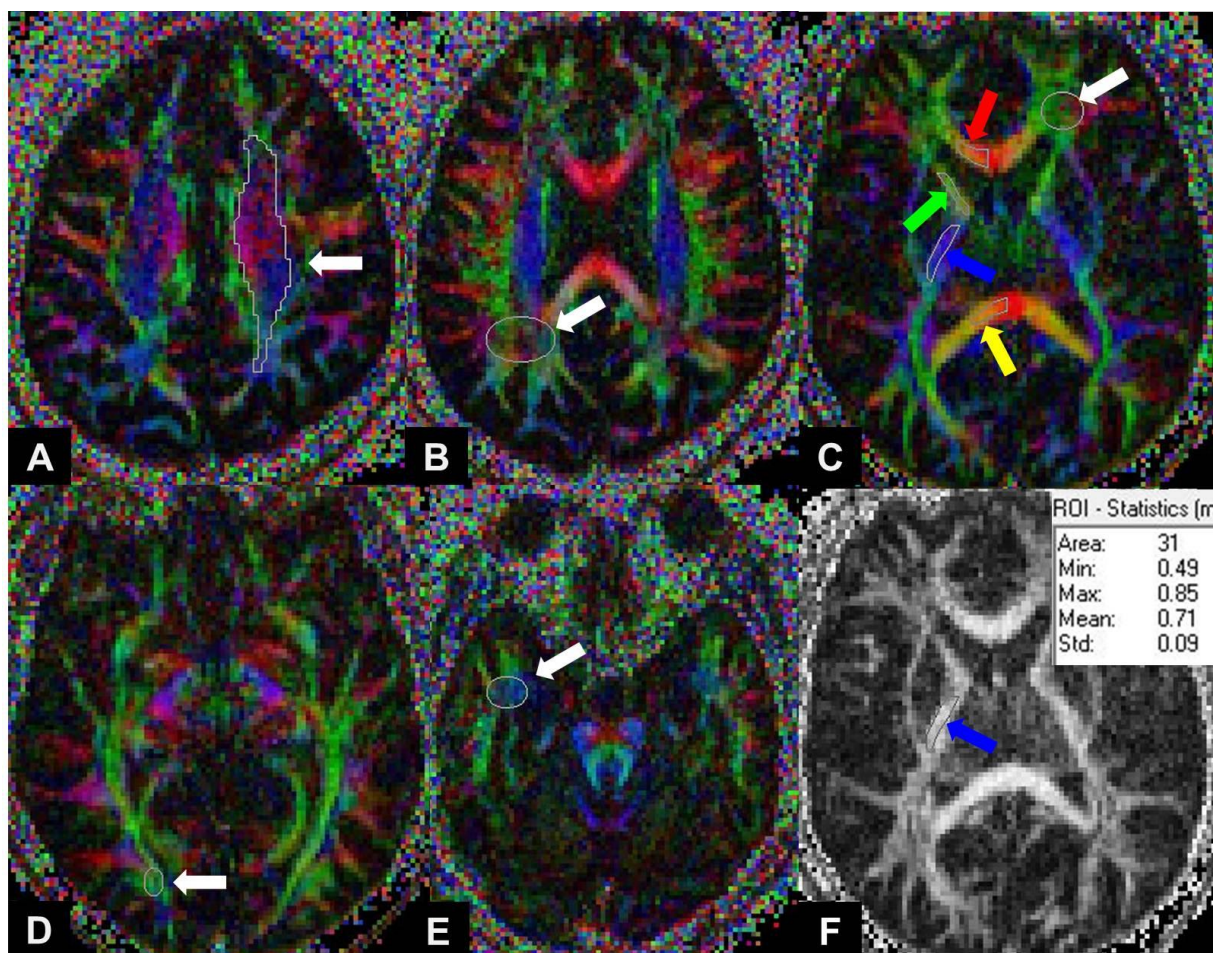


FIGURA 6 – ESCOLHA DOS ROIs.

ROIs propostos nos mapas de FA colorido (A a D) com as cores conforme convenção universal, sendo o azul indicando de fibras na direção crânio-caudal (comumente fibras nervosas de projeção), o vermelho indicando fibras na direção látero-lateral (comumente fibras comissurais, relacionadas entre hemisférios cerebrais) e o verde indicando fibras na direção ântero-posterior (comumente fibras de associação, relacionando conexões entre lobos do mesmo hemisfério cerebral). A – Centro semioval (esquerdo). B – Substância branca no lobo parietal (direito). C – Substância branca no lobo frontal (esquerdo) apontada com seta branca, joelho do corpo caloso (porção direita) apontada com seta vermelha, perna anterior da cápsula interna (direita) apontada com seta verde, perna posterior da cápsula interna (direita) apontada com seta azul, esplênio do corpo caloso (porção direita) apontada com seta amarela. D – Substância branca no lobo occipital (direito). E – Lobo temporal (direito). F - A imagem em tons de cinza representa o mapa de FA, correspondente ao mapa colorido em C. A seta azul aponta o ROI na perna posterior da cápsula interna (PPCI) direita. O quadro mostra valores obtidos na leitura deste ROI, com média de 0,71.

FONTE: O autor (2012).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados coletados foi baseada nos coeficientes de correlação de Pearson (r), com nível de significância estatística dependente no tamanho dos grupos comparados. Valores de p menores que 0,05 indicam

significância estatística. Uma correlação forte foi considerada para valores de coeficientes (r) acima de 0,7.

A análise dos escores de DTI de pacientes do grupo controle (pareados por idade) foi feita para obter escores de DTI estimados com valores médios e desvios padrões dos escores de FA, MD, RD e AD.

A análise intraobservador foi feita com dados coletados pelo observador 1 com os dados dos pacientes com ALD, com medidas dos parâmetros de DTI tomados com 1 semana de intervalo. A análise interobservador de dados dos pacientes com ALD comparou resultados do observador 1 (média das duas medidas usadas na análise intraobservador) e medidas do observador 2 (medida única). A análise interobservador dos dados do grupo controle comparou dados coletados pelos observadores 1 e 2.

Os escores de DTI usados para correlação com o escore de Loes foi a média dos resultados obtidos pelo observador 1 (média de duas medidas) e pelo observador 2 (medida única).

4 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados dos 30 exames dos 14 pacientes com ALD estão tabulados na tabela 4. Sessenta e dois por cento (8/13) dos pacientes tinham o padrão tipo 1 (LOES et al., 2003) de envolvimento cerebral da ALD.

TABELA 4 – RESULTADOS DOS ESCORES DE LOES E DE DTI.

Paciente	Idade ao exame	Dia do TMO	ALD-DRS	Padrão da RM	Escore de Loes	FA	MD	RD	AD
1	6,9	n.a.	0	n.a.	0,0	10,36	13,99	9,03	23,92
2	4,4	-18	0	1	0,5	10,46	14,89	9,62	25,44
	4,8	130	0		0,5	9,89	15,73	10,66	25,89
3	6,4	-70	0	1	1,0	9,89	14,99	9,95	25,06
	6,9	133	0		4,0	9,02	15,68	11,14	24,77
4	9,3	n.a.	0	3	1,5	10,10	14,66	9,58	24,80
5	17,3	-375	0	5	2,0	10,14	14,84	9,68	25,15
	18,3	-11	0		2,5	10,44	14,53	9,44	24,71
	19,0	227	0		2,5	10,47	14,60	9,50	24,81
6	8,0	-326	0	3	2,5	9,98	14,72	9,67	24,82
	8,6	-123	0		2,5	9,93	15,34	10,11	25,80
	8,9	-4	0		2,5	9,84	15,57	10,54	25,62
	10,0	402	0		3,5	9,29	15,37	10,42	25,28
7	10,2	n.a.	0	1	3,0	10,42	14,21	8,97	24,68
8	8,5	n.a.	0	1	3,5	10,36	14,36	9,47	24,16
9	17,7	-535	0	5	5,0	8,98	17,12	12,36	26,64
	18,1	-375	0		5,0	9,19	16,90	12,15	26,41
	19,1	-32	0		5,0	9,06	18,03	13,19	27,71
	19,8	241	0		5,0	9,03	18,22	13,36	27,95
10	12,1	58	I	1	6,0	8,32	19,38	14,71	28,73
	12,4	170	I		6,0	8,40	18,52	13,93	27,72
11	8,2	94	0	5	6,0	8,71	16,93	12,27	26,24
	8,5	206	0		6,0	8,48	17,15	12,65	26,16
	8,9	360	0		7,5	8,58	17,81	13,11	27,21
12	9,6	-12	I	1	6,5	9,28	16,14	11,29	25,84
	9,9	94	I		6,5	8,45	16,84	12,25	26,04
	10,1	167	I		9,0	7,51	18,31	13,93	27,08
13	8,6	n.a.	III	1	12,5	7,99	18,59	13,90	27,97
14	13,3	938	I	1	13,5	7,83	22,35	17,60	31,84
	15,0	1568	I		13,5	8,11	21,83	16,15	33,19

FONTE: O autor (2012).

NOTA: na coluna dos escores de Loes os valores com fundo cinza claro são ≥ 1 . Para os valores dos escores de DTI o fundo cinza claro indica valores entre 1 a 2 desvios padrões da média e fundo cinza escuro indica mais do que 2 desvios padrões da média, comparados com valores dos controles. n.a. = não se aplica. ALD-DRS = escala de invalidez (0 = sem limitações ou dificuldades no aprendizado ou coordenação devido à ALD; I = dificuldades de aprendizado ou coordenação leves devido à ALD, não necessitando de suporte ou intervenção; II = dificuldades de coordenação ou aprendizagem moderadas devido à ALD, requer suporte ou intervenção em algumas áreas; III = dificuldades graves na coordenação ou na aprendizagem devido à ALD, requer suporte ou intervenção em muitas áreas; IV = perda de habilidades cognitivas com desorientação devido à ALD, requerendo constante supervisão). Padrão da RM: 1 = substância branca parieto-occipital; 2 = substância branca frontal; 3 = trato corticoespinhal; 4 = substância branca cerebelar; 5 = acometimento simultâneo de substância branca parieto-occipital e frontal.

A análise estatística intraobservador dos escores de DTI dos exames dos pacientes com ALD mostrou coeficientes de Pearson de 0,96, 0,96, 0,95 e 0,80 para os escores de FA, MD, RD e AD respectivamente, todos com nível de significância $p < 0,01$ (figura 7).

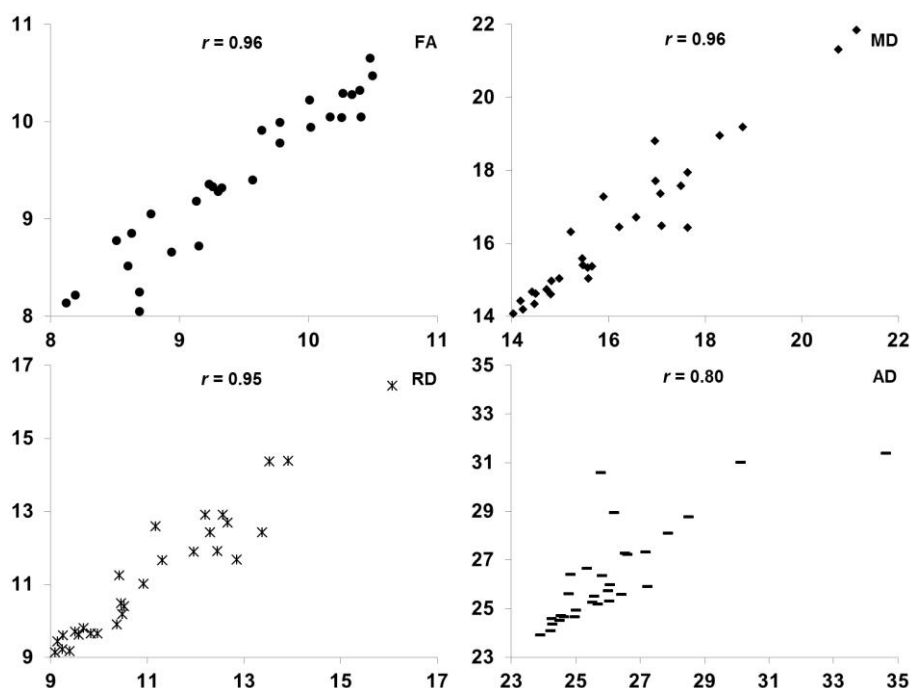


FIGURA 7 – ANÁLISE INTRAOBSERVADOR COM DADOS DE PACIENTES COM ALD.

FONTE: O autor (2012).

A análise estatística interobservador com dados de pacientes com ALD apresentou coeficientes de Pearson de 0,97 para escores de FA, MD e RD e 0,94 para escore de AD ($p < 0,01$) (figura 8).

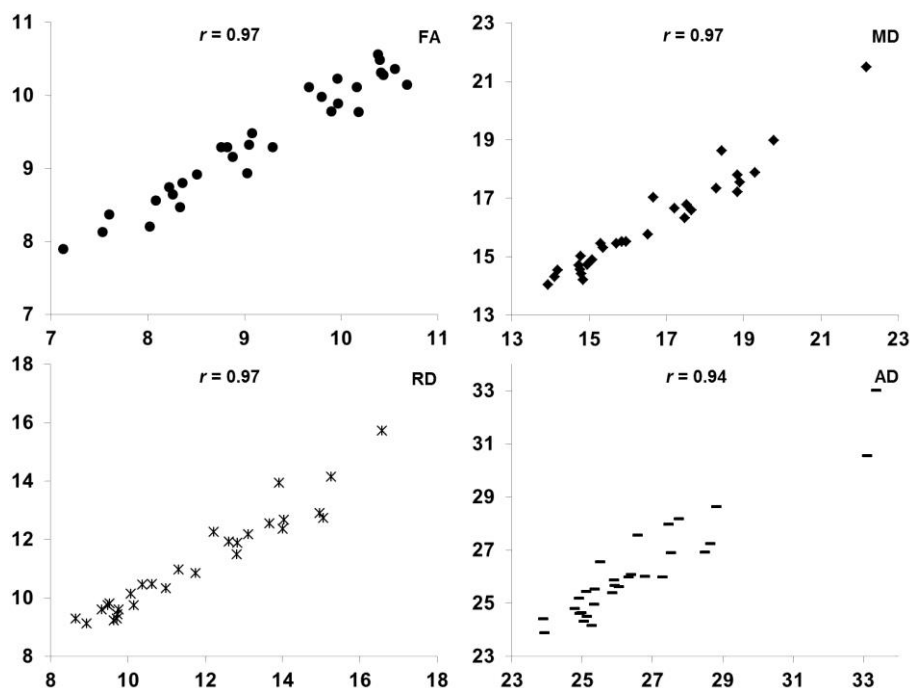


FIGURA 8 – ANÁLISE INTEROBSERVADOR COM DADOS DE PACIENTES COM ALD.

FONTE: O autor (2012).

A correlação interobservador para o grupo controle mostrou coeficientes de 0,77, 0,97, 0,95 e 0,65 ($p < 0,01$) para escores de FA, MD, RD e AD respectivamente (figura 9).

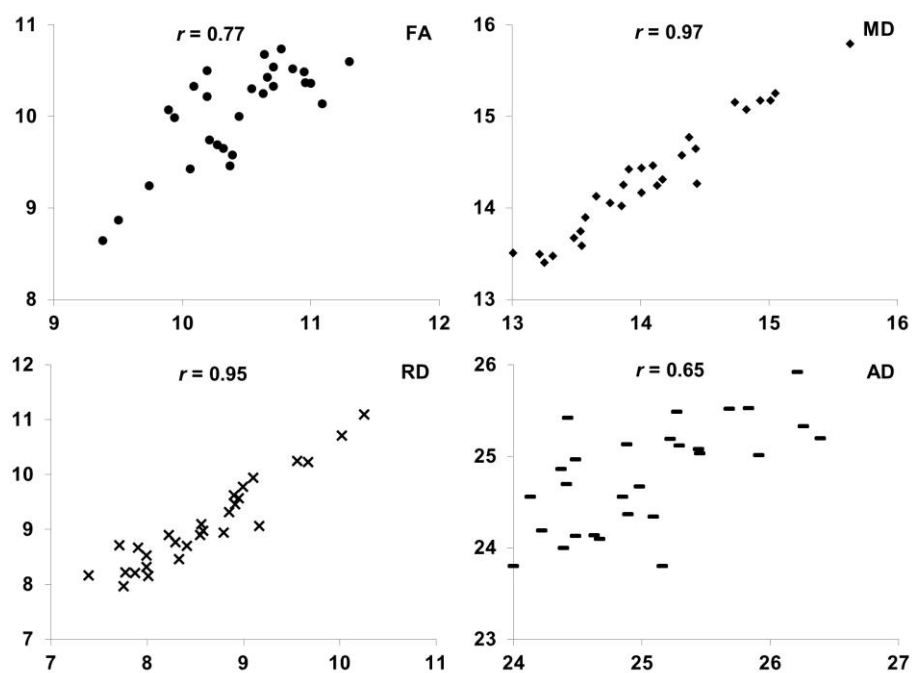


FIGURA 9 – ANÁLISE INTEROBSERVADOR NO GRUPO CONTROLE.

FONTE: O autor (2012).

Os escores de DTI do grupo controle apresentados na figura 10, sugerem que mudanças decorrentes do desenvolvimento ainda ocorrem na faixa etária dos 4 aos 20 anos de idade. Linhas de tendência mostram tendência de diminuição dos escores de MD, RD e AD e aumento do escore de FA. Considerando que o grupo controle é pequeno e que o coeficiente de correlação de Pearson em relação à idade mostra nenhuma a pouca correlação, a amostra de 28 pacientes do grupo controle foi usada para obter os valores de médias e desvios padrões para esta faixa etária (FA = $10,23 \pm 0,48$; MD = $14,20 \pm 0,63$; RD = $8,84 \pm 0,76$ e AD = $24,91 \pm 0,57$).

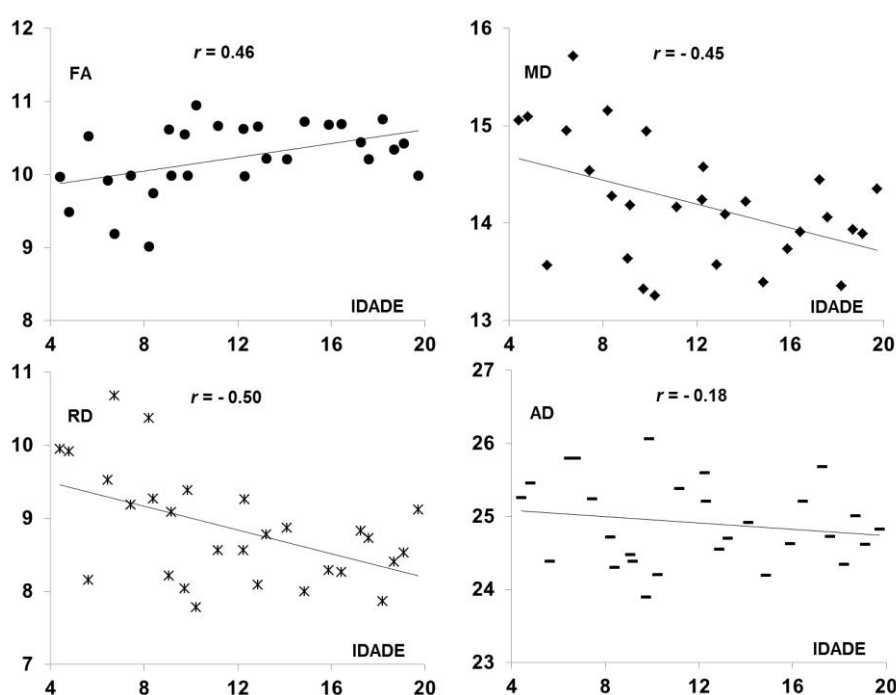


FIGURA 10 – EVOLUÇÃO DOS VALORES DE ESCORES DE DTI COM A IDADE NO GRUPO CONTROLE.

FONTE: O autor (2012).

A análise estatística da correlação entre escores de DTI e escores de Loes nos pacientes com ALD obteve coeficientes de correlação de -0,86; 0,89; 0,89 e 0,84 para escores de FA, MD, RD e AD, todos com $p < 0,01$ (figura 11).

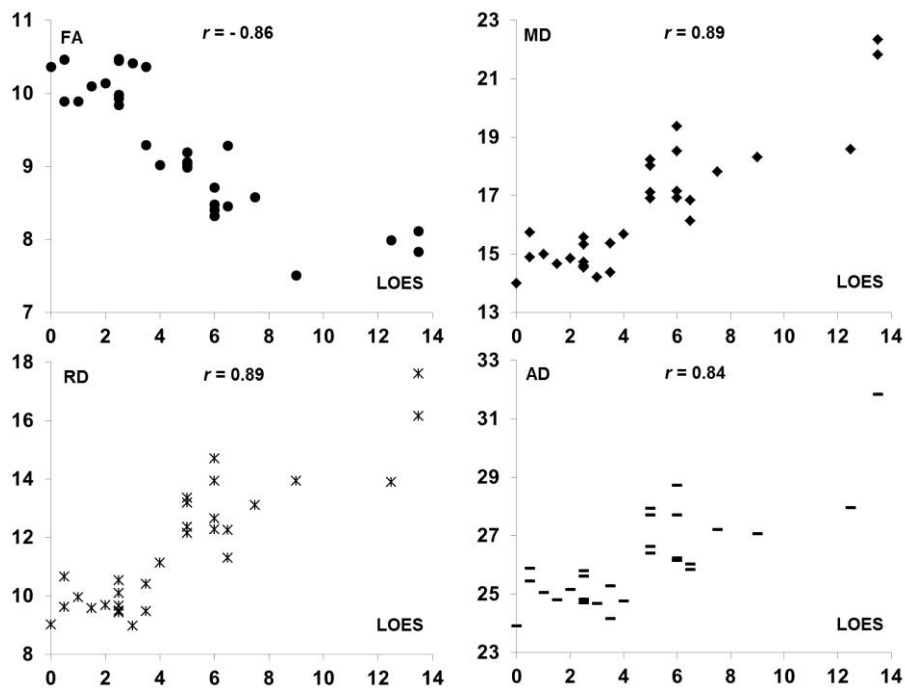


FIGURA 11 – ANÁLISE DOS ESCORES DE LOES E DE DTI.

FONTE: O autor (2012).

5 DISCUSSÃO

A ressonância magnética do encéfalo de pacientes com ALD-X é importante para mostrar a progressão de lesões (GASPARETTO et al., 2006). O exame convencional de RM tem uma alta sensibilidade para a detecção de anormalidades na substância branca, mas baixa especificidade. Achados patológicos relacionados com estas alterações de sinais são altamente variáveis e incluem hipomielinização, desmielinização, perda axonal, gliose, edema intersticial e degeneração cística da substância branca (VAN DER VOORN et al., 2011). Técnicas avançadas de RM como espectroscopia de prótons e em particular imagens ponderadas em difusão parecem melhorar a sensibilidade e especificidade da avaliação pela RM através de identificação e diferenciação mais acurada destes processos patológicos (BIZZI et al., 2008; PATAY, 2005). A hipótese é que os parâmetros de DTI correlacionam-se com o grau de desmielinização e gravidade da doença. A análise estatística mostrou forte correlação entre parâmetros de DTI, usando os escores de DTI propostos, e os escores de Loes, com coeficientes de correlação de Pearson acima de 0,84, em valores absolutos ($p < 0,01$), comprovando a hipótese.

Para avaliar o modelo de escore de DTI não há dados na literatura e foi necessário obter valores de referência (controles) pareados com os casos do estudo. Os parâmetros de DTI são considerados relativamente estáveis após os 24 meses de vida (HERMOYE et al., 2006), mas mudanças ainda ocorrem após este período, durante o desenvolvimento cerebral (KUMAR et al., 2012). Isto foi observado no grupo controle, com escores de DTI indicando uma tendência de aumento do FA e diminuição nos escores de MD, RD e AD, considerando as contribuições totais da substância branca amostrada, apesar de nenhuma a pouca correlação em relação à idade. Este fato foi considerado para obter os valores médios e desvios padrões dos escores de DTI na faixa etária dos controles. Outro problema que surgiu na elaboração do modelo de escore de DTI foi a preocupação em relação à subjetividade, mas os resultados da análise intraobservador e interobservador mostraram que o método é robusto, com coeficientes de correlação demonstrando forte correlação, exceto na avaliação dos escores de AD.

Apesar do escore de Loes permitir avaliar várias possíveis alterações, com escores variando de 0 a 34 pontos, o artigo original mostrou que o grupo estudado tinha uma média de escores de 9 pontos, com valores variando de 0,5 a 25, em uma

amostra de 83 pacientes (LOES et al., 1994). Nossa amostra tem pacientes com escores de Loes variando de 0 a 13,5 (inclui pacientes nos estágios muito precoce, precoce e tardio), uma limitação relativa considerando o objetivo de correlacionar escores, mas na realidade com escores na faixa de interesse para a decisão de TMO – valores de escores mais altos (estágio muito tardio) não são considerados para TMO.

Outra limitação está relacionada aos parâmetros de aquisição, focado na redução do tempo de aquisição para minimizar artefatos de movimento. A aquisição do DTI usou 12 direções, enquanto estudos de simulação indicam que pelo menos 20 direções são necessárias para uma estimativa robusta da anisotropia e pelo menos 30 direções para uma estimativa robusta do tensor (MUKHERJEE; CHUNG; et al., 2008). Outro problema é a seleção da região de interesse (ROI), que é operador dependente. Uma vez que os ROIs propostos são fixos, podem não incluir regiões com alterações, e no caso áreas com substância branca com aspecto aparentemente normal e áreas alteradas, pode causar dificuldades na seleção dos limites do ROI.

Conforme mencionado anteriormente, uma limitação da escala de gravidade proposto por Loes é que mudanças sutis na RM convencional podem não ser refletidas em um aumento do escore, dando alguma incerteza na progressão da doença considerando a interpretação das imagens convencionais. Considerando que o paciente pode se beneficiar do TMO antes que os déficits neurológicos se tornem evidentes, é importante identificar a desmielinização precoce. Analisando os escores de DTI dos pacientes 1 a 8 (tabela 4) percebemos algumas tendências que já foram sugeridas por Schneider et al. (SCHNEIDER et al., 2003). O paciente número 2 demonstrou alterações nos escores de MD e RD apesar de baixos escores de Loes. O paciente número 3 tinha escores de MD e RD alterados (mais de 1 desvio padrão) com escore de Loes de 1 e na sequência foi observada mudança significativa nestes escores (mais de 2 desvios padrões) e uma mudança súbita no escore de Loes. O paciente 5 mostrou doença estável após o TMO e os escores de DTI apresentaram poucas mudanças. O paciente 6 mostrou alterações progressivas nos escores de DTI apesar de escores de Loes sem alterações no pré-TMO. Estes pacientes não apresentaram mudanças significativas nos escores de FA. Isto está, de certa forma, de acordo com o que Schneider et al. observaram no estudo deles, sendo que valores de MD mostraram alterações patológicas mais pronunciadas do

que os valores de FA na substância branca aparentemente normal (SCHNEIDER et al., 2003). O número pequeno de pacientes coloca limitações na análise estatística, mas nós consideramos importante a observação deste sinal de tendência de alterações nos escore de DTI apesar de escores de Loes sem alterações, particularmente na faixa de escores entre 0 e 4, que é considerado a faixa de interesse na qual os pacientes com ALD teriam maior benefício.

Apenas o transplante de células hematopoiéticas alogênico pode levar à estabilização da doença a longo prazo e aumentar a sobrevida (MILLER et al., 2011). O TMO é recomendado no estágio inicial da ALD, necessitando parâmetros clínicos e exames complementares confiáveis para aumentar a chance de um resultado positivo, e o estudo tem a intenção de fornecer um método adicional para ajudar o seguimento de pacientes com ALD. Os escores de DTI propostos foram testados em relação ao bias intra e interobservador com boa reprodutibilidade e os escores de DTI mostraram boa correlação com o padrão-ouro escore de Loes. Uma análise mais detalhada dos escores de DTI na faixa de escore de gravidade de 0 a 4 mostrou uma tendência de mudança nos parâmetros de DTI apesar de sem alterações no escore de Loes. Indicando que os escores de MD e RD podem potencialmente ser úteis nos estágios muito precoce e precoce da doença, e poderiam ser utilizados como parâmetros de seguimento como adjunto ao escore de Loes, mas investigações adicionais com séries maiores de pacientes podem ser necessárias para validar o método proposto para uso clínico.

6 CONCLUSÃO

A análise e a interpretação dos resultados obtidos dos exames de pacientes com ALD-X e do grupo controle deste estudo permite concluir que:

1. Há forte correlação entre os escores de Loes e os escores de DTI propostos.
2. A metodologia empregada mostrou-se robusta analisando-se mensurações intra e interobservador.
3. Há alterações nos valores dos escores de DTI na faixa etária de 4 a 20 anos, observado no grupo controle, decorrentes do desenvolvimento cerebral, porém com variações relativamente pequenas e com fraca correlação com a idade.
4. Há indícios de que os escores de MD e RD podem indicar e antecipar alterações microestruturais antes de mudanças no escore de Loes, porém, devido ao pequeno tamanho da amostra, sugere-se que sejam feitos estudos adicionais com mais pacientes. A valorização destas alterações pode ser mais importante nas fases muito precoce e precoce da ALD cerebral.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARFANAKIS, K. et al. Diffusion tensor MR imaging in diffuse axonal injury. *AJNR Am J Neuroradiol*, v. 23, n. 5, p. 794-802, 2002.

BEAULIEU, C. The basis of anisotropic water diffusion in the nervous system - a technical review. *NMR Biomed*, v. 15, n. 7-8, p. 435-455, 2002.

BEZMAN, L.; MOSER, H. W. Incidence of X-linked adrenoleukodystrophy and the relative frequency of its phenotypes. *Am J Med Genet*, v. 76, n. 5, p. 415-419, 1998.

BIFFI, A.; AUBOURG, P.; CARTIER, N. Gene therapy for leukodystrophies. *Hum Mol Genet*, v. 20, n. R1, p. R42-53, 2011.

BIZZI, A. et al. Classification of childhood white matter disorders using proton MR spectroscopic imaging. *AJNR Am J Neuroradiol*, v. 29, n. 7, p. 1270-1275, 2008.

BLAW, M. Melanodermic type leukodystrophy (adreno-leukodystrophy). In: VINKEN, P.; BRUYN, C. (Eds.). *Handbook of Clinical Neurology*. New York: American Elsevier, 1970. p. 128-133 *apud* MOSER, 2005.

BROWN, F. R. et al. Adrenoleukodystrophy: effects of dietary restriction of very long chain fatty acids and of administration of carnitine and clofibrate on clinical status and plasma fatty acids. *Johns Hopkins Med J*, v. 151, n. 4, p. 164-172, 1982.

CARTIER, N. et al. Retroviral-mediated gene transfer corrects very-long-chain fatty acid metabolism in adrenoleukodystrophy fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 92, n. 5, p. 1674-1678, 1995.

CARTIER, N.; AUBOURG, P. Hematopoietic stem cell transplantation and hematopoietic stem cell gene therapy in X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain Pathol*, v. 20, n. 4, p. 857-862, 2010.

CASTRIOTA-SCANDERBEG, A. et al. Coefficient D(av) is more sensitive than fractional anisotropy in monitoring progression of irreversible tissue damage in focal nonactive multiple sclerosis lesions. *AJNR Am J Neuroradiol*, v. 24, n. 4, p. 663-670, 2003.

CENI, C. Über einen interessanten fall von gliomatöser Infiltration bei der Großhirnhemisphäre. *Arch Psychiatr Nervenkr*, v. 31, p. 809-819, 1899 *apud* ENGELEN, 2012.

CHENEVERT, T. L.; SUNDGREN, P. C.; ROSS, B. D. Diffusion imaging: insight to cell status and cytoarchitecture. *Neuroimaging Clin N Am*, v. 16, n. 4, p. 619-632, viii-ix, 2006.

CHIEN, D. et al. MR diffusion imaging of cerebral infarction in humans. *AJNR Am J Neuroradiol*, v. 13, n. 4, p. 1097-1102; discussion 1103-1105, 1992.

DUBEY, P. et al. Diffusion tensor-based imaging reveals occult abnormalities in adrenomyeloneuropathy. *Ann Neurol*, v. 58, n. 5, p. 758-766, 2005.

EBISU, T. et al. Discrimination between different types of white matter edema with diffusion-weighted MR imaging. *J Magn Reson Imaging*, v. 3, n. 6, p. 863-868, 1993.

EICHLER, F. et al. Metachromatic leukodystrophy: a scoring system for brain MR imaging observations. *AJNR Am J Neuroradiol*, v. 30, n. 10, p. 1893-1897, 2009.

EICHLER, F. S.; BARKER, P. B. et al. Proton MR spectroscopic imaging predicts lesion progression on MRI in X-linked adrenoleukodystrophy. *Neurology*, v. 58, n. 6, p. 901-907, 2002.

EICHLER, F. S.; ITOH, R. et al. Proton MR spectroscopic and diffusion tensor brain MR imaging in X-linked adrenoleukodystrophy: initial experience. *Radiology*, v. 225, n. 1, p. 245-252, 2002.

ENGELEN, M. et al. X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD): clinical presentation and guidelines for diagnosis, follow-up and management. *Orphanet journal of rare diseases*, v. 7, n. 1, p. 51, 2012.

FATEMI, A. et al. Magnetization transfer MRI demonstrates spinal cord abnormalities in adrenomyeloneuropathy. *Neurology*, v. 64, n. 10, p. 1739-1745, 2005.

FILIPPI, M. et al. Diffusion tensor magnetic resonance imaging in multiple sclerosis. *Neurology*, v. 56, n. 3, p. 304-311, 2001.

GASPARETTO, E. L. et al. Cerebral X-linked adrenoleukodystrophy: follow-up with magnetic resonance imaging. *Arq Neuropsiquiatr*, v. 64, n. 4, p. 1033-1035, 2006.

GONZÁLEZ, R. G. et al. Diffusion-weighted MR imaging: diagnostic accuracy in patients imaged within 6 hours of stroke symptom onset. *Radiology*, v. 210, n. 1, p. 155-162, 1999.

HABERFELD, W.; SPIELER, F. Zur diffusen Hirn-Rückenmarksklerose im Kindesalter. *Dt Z Nervheilk*, v. 40, n. 436-463, 1910 *apud* MOSER, 1997.

HERMOYE, L. et al. Pediatric diffusion tensor imaging: normal database and observation of the white matter maturation in early childhood. *Neuroimage*, v. 29, n. 2, p. 493-504, 2006.

HEUBNER, O. Über diffuse Hirnsclerose. *Charité Ann*, v. 22, p. 298-310, 1897 *apud* ENGELEN, 2012.

HOEFNAGEL, D.; VAN DEN NOORT, S.; INGBAR, S. Diffuse cerebral sclerosis with endocrine abnormalities in young males. *Brain*, v. 85, p. 553-568, 1962 *apud* MOSER, 1997.

IGARASHI, M. et al. Fatty acid abnormality in adrenoleukodystrophy. *J Neurochem*, v. 26, n. 4, p. 851-860, 1976.

ITO, R. et al. Diffusion tensor brain MR imaging in X-linked cerebral adrenoleukodystrophy. *Neurology*, v. 56, n. 4, p. 544-547, 2001.

KIM, Y. J. et al. Brain abscess and necrotic or cystic brain tumor: discrimination with signal intensity on diffusion-weighted MR imaging. *AJR Am J Roentgenol*, v. 171, n. 6, p. 1487-1490, 1998.

KISHIMOTO, Y. et al. Adrenoleukodystrophy: evidence that abnormal very long chain fatty acids of brain cholesterol esters are of exogenous origin. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 96, n. 1, p. 69-76, 1980.

KONO, K. et al. The role of diffusion-weighted imaging in patients with brain tumors. *AJNR Am J Neuroradiol*, v. 22, n. 6, p. 1081-1088, 2001.

KRABBE, K. et al. MR diffusion imaging of human intracranial tumours. *Neuroradiology*, v. 39, n. 7, p. 483-9, 1997.

KRIVIT, W. et al. The future for treatment by bone marrow transplantation for adrenoleukodystrophy, metachromatic leukodystrophy, globoid cell leukodystrophy and Hurler syndrome. *J Inherit Metab Dis*, v. 18, n. 4, p. 398-412, 1995.

KUMAR, R. et al. Regional brain axial and radial diffusivity changes during development. *J Neurosci Res*, v. 90, n. 2, p. 346-355, 2012.

LERNER, B. H. Complicated lessons: Lorenzo Odone and medical miracles. *Lancet*, v. 373, n. 9667, p. 888-889, 2009.

LOES, D. J. et al. Adrenoleukodystrophy: a scoring method for brain MR observations. *AJNR Am J Neuroradiol*, v. 15, n. 9, p. 1761-1766, 1994.

LOES, D. J. et al. Analysis of MRI patterns aids prediction of progression in X-linked adrenoleukodystrophy. *Neurology*, v. 61, n. 3, p. 369-374, 2003.

LOES, D. J.; PETERS, C.; KRIVIT, W. Globoid cell leukodystrophy: distinguishing early-onset from late-onset disease using a brain MR imaging scoring method. *AJNR Am J Neuroradiol*, v. 20, n. 2, p. 316-323, 1999.

LU, S. et al. Peritumoral diffusion tensor imaging of high-grade gliomas and metastatic brain tumors. *AJNR Am J Neuroradiol*, v. 24, n. 5, p. 937-941, 2003.

MAHMOOD, A. et al. Survival analysis of haematopoietic cell transplantation for childhood cerebral X-linked adrenoleukodystrophy: a comparison study. *Lancet Neurol*, v. 6, n. 8, p. 687-692, 2007.

MILLER, W. P. et al. Outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation for childhood cerebral adrenoleukodystrophy: the largest single-institution cohort report. *Blood*, v. 118, n. 7, p. 1971-1978, 2011.

MORI, S. et al. Three-dimensional tracking of axonal projections in the brain by magnetic resonance imaging. *Ann Neurol*, v. 45, n. 2, p. 265-269, 1999.

MOSER, A. B. et al. Plasma very long chain fatty acids in 3,000 peroxisome disease patients and 29,000 controls. *Ann Neurol*, v. 45, n. 1, p. 100-110, 1999.

MOSER, H.; DUBEY, P.; FATEMI, A. Progress in X-linked adrenoleukodystrophy. *Curr Opin Neurol*, v. 17, n. 3, p. 263-269, 2004.

MOSER, H. W. et al. Bone marrow transplant in adrenoleukodystrophy. *Neurology*, v. 34, n. 11, p. 1410-1417, 1984.

MOSER, H. W. Adrenoleukodystrophy: phenotype, genetics, pathogenesis and therapy. *Brain*, v. 120 (Pt 8, p. 1485-1508, 1997.

MOSER, H. W. et al. X-Linked adrenoleukodystrophy: overview and prognosis as a function of age and brain magnetic resonance imaging abnormality. A study involving 372 patients. *Neuropediatrics*, v. 31, n. 5, p. 227-239, 2000.

MOSER, H. W. et al. Follow-up of 89 asymptomatic patients with adrenoleukodystrophy treated with Lorenzo's oil. *Arch Neurol*, v. 62, n. 7, p. 1073-1080, 2005.

MOSER, H. W. Therapy of X-linked adrenoleukodystrophy. *NeuroRx*, v. 3, n. 2, p. 246-253, 2006.

MOSER, H. W.; BARKER, P. B. Magnetic resonance spectroscopy: a new guide for the therapy of adrenoleukodystrophy. *Neurology*, v. 64, n. 3, p. 406-407, 2005.

MOSER, H. W.; RAYMOND, G. V.; DUBEY, P. Adrenoleukodystrophy: new approaches to a neurodegenerative disease. *JAMA*, v. 294, n. 24, p. 3131-3134, 2005.

MOSSER, J. et al. Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature*, v. 361, n. 6414, p. 726-730, 1993.

MUKHERJEE, P.; BERMAN, J. I. et al. Diffusion tensor MR imaging and fiber tractography: theoretic underpinnings. *AJNR Am J Neuroradiol*, v. 29, n. 4, p. 632-641, 2008.

MUKHERJEE, P.; CHUNG, S. W. et al. Diffusion tensor MR imaging and fiber tractography: technical considerations. *AJNR Am J Neuroradiol*, v. 29, n. 5, p. 843-852, 2008.

NUCIFORA, P. G. P. et al. Diffusion-tensor MR imaging and tractography: exploring brain microstructure and connectivity. *Radiology*, v. 245, n. 2, p. 367-384, 2007.

ODONE, A.; ODONE, M. Lorenzo's oil: a new treatment for adrenoleukodystrophy. *J Pediatr Neurosci*, v. 5, p. 55-61, 1989.

PATAY, Z. Diffusion-weighted MR imaging in leukodystrophies. *Eur Radiol*, v. 15, n. 11, p. 2284-2303, 2005.

PETERS, C. et al. Cerebral X-linked adrenoleukodystrophy: the international hematopoietic cell transplantation experience from 1982 to 1999. *Blood*, v. 104, n. 3, p. 881-888, 2004.

PIERPAOLI, C. et al. Diffusion tensor MR imaging of the human brain. *Radiology*, v. 201, n. 3, p. 637-648, 1996.

POUWELS, P. J. et al. Quantitative proton magnetic resonance spectroscopy of childhood adrenoleukodystrophy. *Neuropediatrics*, v. 29, n. 5, p. 254-264, 1998.

POWERS, J. M. et al. The inflammatory myelinopathy of adreno-leukodystrophy: cells, effector molecules, and pathogenetic implications. *J Neuropathol Exp Neurol*, v. 51, n. 6, p. 630-643, 1992.

POWERS, J. M. et al. Adrenomyeloneuropathy: a neuropathologic review featuring its noninflammatory myelopathy. *J Neuropathol Exp Neurol*, v. 59, n. 2, p. 89-102, 2000.

PROVENZALE, J. M. et al. Correlation of neurodevelopmental features and MRI findings in infantile Krabbe's disease. *AJR Am J Roentgenol*, v. 192, n. 1, p. 59-65, 2009.

RIZZO, W. B. et al. Adrenoleukodystrophy: oleic acid lowers fibroblast saturated C22-26 fatty acids. *Neurology*, v. 36, n. 3, p. 357-361, 1986.

RIZZO, W. B. et al. Adrenoleukodystrophy: dietary oleic acid lowers hexacosanoate levels. *Ann Neurol*, v. 21, n. 3, p. 232-239, 1987.

RIZZO, W.; LESHNER, R.; ODONE, A. X-linked adrenoleukodystrophy: biochemical and clinical efficacy of dietary erucic acid therapy. In: UZIEL, G.; WANDERS, R.; CAPPA, M. (Eds.). *Adrenoleukodystrophy and Other Peroxisomal Disorders*. Amsterdam, Holanda: Excerpta Medica, 1990. p. 149-162.

ROYCHOWDHURY, S.; MALDJIAN, J. A; GROSSMAN, R. I. Multiple sclerosis: comparison of trace apparent diffusion coefficients with MR enhancement pattern of lesions. *AJNR Am J Neuroradiol*, v. 21, n. 5, p. 869-874, 2000.

SCHILDER, P. Zur Kenntnis der sogenannten diffusen Sklerose (über Encephalitis periaxialis diffusa). *Z Gesamte Neurol Psychiatr*, v. 10, p. 1-60, 1912 *apud* ENGELEN, 2012.

SCHILDER, P. Zur Frage der Encephalitis periaxialis diffusa (sogenannten diffusen Sklerose). *Z Gesamte Neurol Psychiatr*, v. 15, p. 359-376, 1913 *apud* ENGELEN, 2012.

SCHILDER, P. Die encephalitis periaxialis diffusa (nebst Bemerkungen über die Apraxie des Lidschlusses). *Arch Psychiatr Nervenkr*, v. 71, p. 327-356, 1924 *apud* ENGELEN, 2012.

SCHNEIDER, J. F. L. et al. Diffusion tensor imaging in cases of adrenoleukodystrophy: preliminary experience as a marker for early demyelination? *AJNR Am J Neuroradiol*, v. 24, n. 5, p. 819-824, 2003.

SEEWANN, A. et al. Diffusely abnormal white matter in chronic multiple sclerosis: imaging and histopathologic analysis. *Arch Neurol*, v. 66, n. 5, p. 601-609, 2009.

SIEMERLING, E.; CREUTZFELDT, H. Bronzekrankheit und sklerosierende Enzephalomyelitis. *Arch Psychiatr Nervenkr*, v. 68, p. 217-244, 1923 *apud* ENGELEN, 2012.

SINGH, I. et al. Lignoceric acid is oxidized in the peroxisome: implications for the Zellweger cerebro-hepato-renal syndrome and adrenoleukodystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 81, n. 13, p. 4203-4207, 1984.

SMITH, J. S. et al. Serial diffusion-weighted magnetic resonance imaging in cases of glioma: distinguishing tumor recurrence from postresection injury. *J Neurosurg*, v. 103, n. 3, p. 428-438, 2005.

SMITH, S. A. et al. Quantitative magnetization transfer characteristics of the human cervical spinal cord in vivo: application to adrenomyeloneuropathy. *Magn Reson Med*, v. 61, n. 1, p. 22-27, 2009.

SONG, S.-K. et al. Demyelination increases radial diffusivity in corpus callosum of mouse brain. *Neuroimage*, v. 26, n. 1, p. 132-140, 2005.

VAN DER KNAAP, M.; VALK, J. X-linked adrenoleukodystrophy. In: HEILMANN, U. (Ed.). *Magnetic Resonance of Myelination and Myelin Disorders*. 3rd. ed. Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 2005. p. 176-190.

VAN DER VOORN, J. P. et al. Correlating quantitative MR imaging with histopathology in X-linked adrenoleukodystrophy. *AJNR Am J Neuroradiol*, v. 32, n. 3, p. 481-489, 2011.

VAN GEEL, B. M. et al. X linked adrenoleukodystrophy: clinical presentation, diagnosis, and therapy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, v. 63, n. 1, p. 4-14, 1997.

VAN GEEL, B. M. et al. Evolution of phenotypes in adult male patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Ann Neurol*, v. 49, n. 2, p. 186-194, 2001.

WANG, S.; WU, J.-M.; CHENG, Y.-S. Asymmetric cerebral lesion pattern in X-linked adrenoleukodystrophy. *J Chin Med Assoc*, v. 69, n. 8, p. 383-386, 2006.

WARREN, D. J. et al. Magnetic resonance spectroscopy changes following haemopoietic stem cell transplantation in children with cerebral adrenoleukodystrophy. *Dev Med Child Neurol*, v. 49, n. 2, p. 135-139, 2007.

8 ANEXOS

• CEP Responsável - Hospital de Clínicas - Universidade Federal do Paraná - UFPR	
Título do Projeto de Pesquisa	
CONTROLE EVOLUTIVO DE PACIENTES COM ADRENOLEUCODISTROFIA CEREBRAL LIGADA AO X UTILIZANDO MEDIDAS DE FRAÇÃO DE ANISOTROPIA PELA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA e ESTUDO COMPARATIVO ENTRE O eSCORE DE LOES e PROPOSTA DE eSCORE DE FRAÇÃO DE ANISOTROPIA e	
Número Folha de Rosto.	Nome do CEP Responsavel
388543	Hospital de Clínicas - Universidade Federal do Paraná - UFPR

Andamento do projeto - CAAE - 0333.0.208.000-10				
Título do Projeto de Pesquisa				
CONTROLE EVOLUTIVO DE PACIENTES COM ADRENOLEUCODISTROFIA CEREBRAL LIGADA AO X UTILIZANDO MEDIDAS DE FRAÇÃO DE ANISOTROPIA PELA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA E ESTUDO COMPARATIVO ENTRE O ΔSCORE DE LOES E PROPOSTA DE ΔSCORE DE FRAÇÃO DE ANISOTROPIAΔ				
Situação	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP	Data Inicial na CONEP	Data Final na CONEP
Aprovado no CEP	23/11/2010 11:06:45	01/03/2011 09:56:45		
Descrição	Data	Documento	Nº do Doc	Origem
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	23/11/2010 11:06:45	Folha de Rosto	0333.0.208.000-10	CEP
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	20/11/2010 09:00:34	Folha de Rosto	FR388543	Pesquisador
3 - Protocolo Aprovado no CEP	01/03/2011 09:56:45	Folha de Rosto	0333.0.208.000-10	CEP