UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

MARCEL KOENIGKAM SANTOS

**Alterações neurorradiológicas em pacientes com Síndrome de
Kallmann: estudos por Ressonância Magnética.**

Ribeirão Preto
2009

MARCEL KOENIGKAM SANTOS

**Alterações neurorradiológicas em pacientes com Síndrome de
Kallmann: estudos por Ressonância Magnética.**

Tese apresentada ao Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de concentração: Clínica Médica

Orientadora: Prof^a Dra Margaret de Castro

Ribeirão Preto
2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de Ribeirão Preto / USP

Koenigkam-Santos, Marcel.

Alterações neurorradiológicas em pacientes com Síndrome de Kallmann: estudos por Ressonância Magnética. Marcel Koenigkam Santos, orientadora: Margaret de Castro

Ribeirão Preto, 2009.

92 p. : 35 il. ; 30cm

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de doutor em Clínica Médica, subárea de investigação biomédica.

Orientadora: Castro, Margaret de.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marcel Koenigkam Santos

Alterações neurorradiológicas em pacientes com Síndrome de Kallmann: estudos por Ressonância Magnética.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Clínica Médica -
Investigação Biomédica.

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIAS

Aos meus pais, Waldenir e Ana Mara, que me incentivaram nos estudos desde o início e foram essenciais para o meu sucesso profissional, além do amor e carinho dedicados incondicionalmente.

A toda minha família, especialmente ao meu irmão Mauricio e minha avó Cida, que compartilharam comigo de muitos bons momentos, compartilho agora mais esta conquista.

À Maria Fernanda, que a cada dia demonstra ser uma pessoa mais especial, carinhosa, companheira e inspiradora.

Aos grandes amigos Edwin e Luiz, pelo companheirismo fraterno e incentivador de tantos anos.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Prof^a. Dr^a. Margaret de Castro, que tenho como exemplo não somente de profissional competente e perspicaz, mas também de pessoa brilhante e vencedora, agradeço pela amizade, apoio, paciência e ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos dos Santos, pelos ensinamentos durante a residência médica e orientação na pós graduação.

Aos professores da gloriosa Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelo aprendizado e formação profissional, especialmente aos amigos da Radiologia: Prof. Dr. Jorge Elias Junior, Prof. Dr. Valdair Francisco Muglia, Prof. Dr. Marcello Henrique Nogueira Barbosa, Prof. Dr. Clóvis Simão Trad e Prof^a. Dr^a. Angela Delete Bellucci.

Aos demais professores que acrescentaram valiosa contribuição para o desenvolvimento deste trabalho: Prof. Dr. Jaime Eduardo Cecílio Hallak, Prof. Dr. Jose Alexandre de Souza Crippa, Prof^a. Dr^a. Lucila Leico K. Elias, Prof. Dr. Ayrton Custódio Moreira e Prof. Dr. Sonir Roberto Rauber Antonini.

Aos colegas que foram de grande importância para a conclusão deste projeto: Thiago Borduqui, Paula Rejane B. Diniz, Beatriz R. Versiani e Fernando Colbari do Amaral.

Ao Prof. Dr. Diego R. Martin, da Emory University em Atlanta, por me receber de forma acolhedora e por todos os ensinamentos valiosíssimos em ressonância magnética.

Aos funcionários do Centro de Ciências das Imagens e Física Médica e funcionários do laboratório de Endocrinologia, que em algum momento auxiliaram no desenvolver do trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de doutorado e apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Aos pacientes, sujeito e propósito de toda pesquisa científica em medicina.

"A sabedoria não nos é dada. É preciso descobri-la por nós mesmos, depois de uma viagem que ninguém nos pode poupar ou fazer por nós".

Marcel Proust

RESUMO

Koenigkam-Santos, M. **Alterações neurorradiológicas em pacientes com Síndrome de Kallmann: estudos por Ressonância Magnética.** 2009. 92f. Dissertação (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

A Síndrome de Kallmann (SK), associação entre hipogonadismo hipogonadotrófico e distúrbio olfatório (hiposmia ou anosmia), é causada por uma deficiência da migração neuronal que envolve as células produtoras do hormônio liberador de gonadotrofinas e os neurônios olfatórios, com origem embriológica comum. O primeiro gene descrito, *KALI*, codifica uma proteína chamada anosmina, que possui homologia com moléculas de adesão axonal envolvidas na migração neuronal. Dentre as anormalidades fenotípicas descritas na SK, destacam-se a malformação das estruturas do rinencéfalo (bulbos e sulcos olfatórios) e a presença, em parte dos pacientes, de uma alteração neurológica específica, os movimentos em espelho (ME). No presente trabalho estudamos 21 pacientes com SK, comparando com um grupo controle (n=16), utilizando técnicas qualitativas e quantitativas de imagem por Ressonância Magnética (RM), com os objetivos de (I) correlacionar as diferentes alterações radiológicas do encéfalo com os achados clínicos, laboratoriais e a presença de mutações gênicas; (II) caracterizar qualitativa e quantitativamente as alterações do rinencéfalo; e (III) investigar possíveis alterações associadas aos ME, dando atenção às duas principais hipóteses para sua causa, desenvolvimento anormal do trato corticoespinhal e deficiência do mecanismo inibitório contra-lateral via corpo caloso. Para estudo do rinencéfalo utilizamos especialmente imagens coronais ponderadas em T2 com cortes finos, avaliando subjetivamente e posteriormente medindo o volume dos bulbos olfatórios, comprimento e profundidade dos sulcos. Para estudo dos ME utilizamos a técnica de morfometria baseada em voxel (VBM), procurando alterações volumétricas da substância branca (SB) e cinzenta (SC), seguida da avaliação de alterações da SB com as técnicas de relaxometria (RL) e cálculo da taxa de transferência de magnetização (TTM). Dezoito (85%) pacientes apresentaram graus variáveis de acometimento das estruturas olfatórias. Demonstramos que a aplasia dos bulbos e/ou

sulcos olfatórios foi o achado mais comum na SK, e a presença de aplasia de bulbo olfatório teve excelente concordância com a presença de anosmia no teste olfativo. O VBM otimizado mostrou áreas alteradas da SC envolvendo o córtex motor de maneira diferente nos pacientes com e sem ME, compatíveis com uma resposta cortical hipertrófica à uma decussação deficiente do trato corticoespinhal nos pacientes com SK e ME. Ainda, as alterações da SC nos pacientes sem ME podem representar mecanismos mais complexos determinando a presença ou não do sinal. Apesar do nosso estudo de VBM não mostrar alteração significativa de volume da SB, as avaliações com RL e TTM mostraram áreas de alteração de sinal, demonstrando a presença de desmielinização e/ou desorganização axonal na SB dos pacientes com SK, envolvendo diferentemente o sistema motor dos pacientes com e sem ME, sendo compatível com os estudos prévios que sugerem a associação entre uma anomalia do trato corticoespinhal e uma deficiência no mecanismo inibitório inter-hemisférico como responsáveis pela persistência patológica dos ME. A análise da TTM demonstrou ainda alteração em topografia da decussação das pirâmides bulbares que pode representar o desarranjo primário desta região, com as alterações das fibras a montante, superiormente (evidenciadas na RL e TTM), e do córtex motor (evidenciadas no VBM), possivelmente sendo secundárias e acometendo diferentemente os pacientes com e sem ME.

Palavras-chave: Síndrome de Kallmann, rinencéfalo, movimentos em espelho, ressonância magnética.

ABSTRACT

Koenigkam-Santos, M. **Neuroradiologic changes in Kallmann Syndrome: studies with Magnetic Resonance Imaging**. 2009. 92p. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Kallmann syndrome (KS) is defined by the association of hypogonadotropic hypogonadism with olfaction disturbance (hyposmia or anosmia). It is caused by a neuronal migration arrest that involves both the gonadotropin releasing hormone (GnRH) and the olfactory neurons, which have a common embryonic origin. The first gene described, *KALI*, encodes a protein named anosmin, which shows a strong homology to axonal adhesion molecules involved in neuronal migration and axonal pathfinding. Various phenotypic abnormalities have been described in KS, including olfactory bulbs and sulci aplasia or hypoplasia and specific neurologic disorders, such as mirror movements (MM). In this study we evaluated 21 patients with KS, comparing with a control group (n=16), using qualitative and quantitative techniques with Magnetic Resonance Imaging (MRI), with the following purposes: (I) correlate the brain's radiologic alterations with the clinical, laboratorial and genetic findings; (II) characterize the rhinencephalon alterations; and (III) investigate MM etiology, addressing the two main hypotheses concerning its cause, abnormal development of the primary motor system, involving the ipsilateral corticospinal tract, and lack of contralateral motor cortex inhibitory mechanisms, mainly through the corpus callosum. For rhinencephalon evaluation, we specially used thin-section coronal T2-weighted images, which were reviewed and then objectively evaluated with the measurements of the olfactory bulbs and sulci. To study MM we used the voxel-based morphometry (VBM), to determine white (WM) and gray matter (GM) volume changes, and T2 relaxometry (T2R) and magnetization transfer ratio (MTR), searching for signal intensity changes in the WM. Eighteen (85%) patients presented different degrees of olfactory structures abnormalities, with the bulbs and/or sulci aplasia being the most common finding, and presence olfactory bulb aplasia showed excellent agreement with anosmia as determined by the smell identification clinical test. The optimized VBM

study did not show significant white matter changes in patients with KS but showed gray matter alterations in keeping with a hypertrophic response to a deficient pyramidal decussation in patients with MM. In addition, gray matter alterations were observed in patients without MM, which can represent more complex mechanisms determining the presence or absence of this symptom. Even if the VBM did not show significant volume changes in WM, the evaluation with the T2R and MTR showed WM signal intensity alterations, differently involving patients with and without MM, in keeping with demyelination and/or axonal disorder, in accordance with the involvement of a corticospinal tract anomaly and a deficient inhibitory interhemispheric mechanism in the etiology of MM. The MTR analysis also showed a different alteration in the pyramidal decussation, which can represent a primary disorder in this region, with all other alterations in the superior WM fibers and motor cortex possibly being secondary to this disarrangement, and involving patients with and without MM in a different manner.

Key words: Kallmann syndrome, rhinencephalon, mirror movements, magnetic resonance imaging.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Imagens de ressonância magnética de um paciente com Síndrome de Kallmann. Sequência volumétrica gradiente eco ponderada em T1, adquirida no plano sagital, utilizada para realização do estudo de morfometria baseada em voxel (VBM)..... 40
- Figura 2 – Imagens de ressonância magnética do rinencéfalo de um voluntário do grupo controle. Cortes finos coronais, turbo spin eco ponderados em T2, contínuos, sem espaçamento, utilizados para a avaliação mais adequada das estruturas pequenas do rinencéfalo e cálculo do volume dos bulbos olfatórios (setas). 41
- Figura 3 – Imagens de ressonância magnética obtidas de um voluntário do grupo controle. Para a transferência de magnetização são adquiridas duas sequências ponderadas em T1, sem (A) e com (B) o pulso de saturação fora de ressonância. Para a relaxometria obtém-se uma sequência ponderada em T2 com duplo eco, um primeiro eco de 22 ms (C) e outro de 90 ms (D). 41
- Figura 4 – Imagens de ressonância magnética de um voluntário do grupo controle (A, B, C) e de um paciente com Síndrome de Kallmann (D, E, F). No voluntário identificam-se os bulbos olfatórios normais (setas curtas em A) e os sulcos olfatórios com comprimento e profundidade normais (setas longas em B e C). No paciente com Síndrome de Kallmann não se identifica os bulbos olfatórios e os sulcos olfatórios não são normais, sendo hipoplásico a direita e aplásico a esquerda. 55
- Figura 5 – Imagens de ressonância magnética do rinencéfalo de um voluntário do grupo controle, utilizadas para a avaliação quantitativa. As medidas foram feitas com o programa ImageJ, incluindo o volume dos bulbos olfatórios (A), comprimento (B) e profundidade (C) dos sulcos olfatórios. 55
- Figura 6 – Representação do resultado do VBM nos pacientes com Síndrome de Kallmann e movimentos em espelho, quando comparados ao grupo controle. As regiões de aumento (laranja/vermelho) e redução (azul) volumétrica da substância cinzenta estão superpostas em imagens selecionadas, normalizadas no espaço, de um indivíduo controle. Considerando nossas hipóteses *a priori*, as áreas de aumento de volume foram encontradas no córtex motor primário e somatosensorial primário a esquerda. 60
- Figura 7 – Representação do resultado do VBM nos pacientes com Síndrome de Kallmann sem movimentos em espelho, quando comparados ao grupo controle. As regiões de aumento (laranja/vermelho) e redução (azul) volumétrica da substância cinzenta estão superpostas em imagens selecionadas, normalizadas no espaço, de um indivíduo controle. Considerando nossas hipóteses *a priori*, as áreas de aumento de volume foram encontradas no lobo frontal esquerdo e no sulco pré-central direito. 61
- Figura 8 – Imagens sagitais gradiente eco ponderadas em T1 de dois pacientes com Síndrome de Kallmann. O programa ImageJ foi utilizado para cálculo da área do corpo caloso na linha média, representada em B. 63

Figura 9 – Imagens de mapas médios de relaxometria do grupo controle. Os diferentes cortes do encéfalo exemplificam algumas das regiões de interesse demarcadas para análise quantitativa da substância branca, incluindo na decussação das pirâmides bulbares (A), perna posterior da cápsula interna (B) e lobo frontal a direita (C). 67

Figura 10 – Imagens de mapas médios de transferência de magnetização do grupo controle. Os diferentes cortes do encéfalo exemplificam algumas das regiões de interesse demarcadas para análise quantitativa da substância branca, incluindo no joelho do corpo caloso (A), pedúnculo cerebral (B) e pedúnculo cerebelar a direita (C). 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com Síndrome de Kallmann.....	51
Tabela 2- Características molecular, olfativa, neurológica e radiológica dos pacientes com Síndrome de Kallmann.	53
Tabela 3 – Volume (mm ³) dos bulbos olfatórios e medidas (mm) dos sulcos olfatórios dos pacientes com Síndrome de Kallmann.....	56
Tabela 4 – Análise da substância cinzenta pelo VBM, comparando os pacientes com Síndrome de Kallmann (SK), com e sem movimentos em espelho (ME) e os controles.	59
Tabela 5 – Análise da substância branca pelo VBM, comparando os pacientes com Síndrome de Kallmann (SK), com e sem movimentos em espelho (ME) e os controles.	62
Tabela 6 – Área do corpo caloso na linha média (mm ²), valores individuais e a média, dos pacientes com Síndrome de Kallmann (SK), com e sem movimentos em espelho (ME) e os controles.....	64
Tabela 7 - Valores ($X \pm DP$) da relaxometria (RL) das regiões de interesse do grupo controle e dos pacientes com Síndrome de Kallmann (SK), com e sem movimentos em espelho (ME).	65
Tabela 8 – Valores ($X \pm DP$) da taxa de transferência de magnetização (TTM) das regiões de interesse do grupo controle e dos pacientes com Síndrome de Kallmann (SK), com e sem movimentos em espelho (ME).....	66
Tabela 9 – Regiões de interesse alteradas na comparação entre as médias de relaxometria dos pacientes com Síndrome de Kallmann (SK) com e sem movimentos em espelho (ME) e o grupo controle.	69
Tabela 10 – Regiões de interesse alteradas na comparação entre as médias da taxa de transferência de magnetização dos pacientes com Síndrome de Kallmann (SK) com e sem movimentos em espelho (ME) e o grupo controle.	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Tridimensional
<i>a priori</i>	Conhecimento ou argumento independente da experiência
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DICOM	Digital Imaging and Communications in Medicine
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio padrão
et al.	E outros
<i>FGFR1</i>	Gene do receptor 1 do fator de crescimento de fibroblastos
FOV	Field of view
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
GRE	Gradiente eco
HCFMRP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HH	Hipogonadismo hipogonadotrófico sem anosmia
IC	Intervalo de confiança
<i>KAL1</i>	Gene da Síndrome de Kallmann 1
<i>KAL2</i>	Gene da Síndrome de Kallmann 2 (<i>FGFR1</i>)
Khz	Kilohertz
LH	Hormônio luteinizante
mm	Milímetros
ms	Milisegundos
ME	Movimentos em espelho
MINC	Medical Imaging Net CDF

MNI	Montreal Neurological Institute, Canada
n	Tamanho da amostra
N	Normal
p	Valor da probabilidade estatística do erro tipo I (α)
PET	Positron emission tomography
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>PROKR2</i>	Gene do receptor de procineticina tipo 2
RL	Relaxometria
RM	Ressonância Magnética
SB	Substância branca
SC	Substância cinzenta
ROI	Region of interest
SK	Síndrome de Kallmann
SPM	Statistic parametric mapping
t	Teste estatístico de Student
T	Tesla
T1	Tempo de relaxação longitudinal
T2	Tempo de relaxação transversal
T4	Tiroxina
TE	Tempo de eco
TFD	Taxa de falsa descoberta
TM	Transferência de magnetização
TR	Tempo de repetição
TRH	Hormônio liberador do TSH
TSE	Turbo spin eco

TSH	Hormônio tireócito-estimulante
TTM	Taxa de transferência de magnetização
US	Ultrassom
USA	United States of America
USP	Universidade de São Paulo
VBM	Voxel based morphometry

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
1.1	Hipogonadismo Hipogonadotrófico.....	21
1.2	Síndrome de Kallmann.....	22
1.3	Exames de Imagem do Rinencéfalo.....	25
1.4	Movimentos em Espelho e Ressonância Magnética.....	26
1.5	Avaliação Quantitativa do Sinal da Substância Branca Encefálica.....	31
2	OBJETIVOS.....	34
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1	Casuística.....	37
3.2	Avaliação Clínica e Laboratorial.....	37
3.3	Aquisição das Imagens de Ressonância Magnética.....	39
3.4	Avaliação do Rinencéfalo.....	42
3.5	Protocolo de VBM.....	43
3.6	Protocolo de Relaxometria e Transferência de Magnetização.....	45
3.7	Análise Estatística.....	46
3.7.1	Estatística da avaliação do rinencéfalo.....	46
3.7.2	Estatística do VBM.....	46
3.7.3	Análise ROI do Corpo Caloso.....	47
3.7.4	Estatística da Relaxometria e Taxa de Transferência de Magnetização.....	48
4	RESULTADOS.....	49
4.1	Dados Clínicos e Laboratoriais.....	50
4.2	Bulbos e Sulcos Olfatórios.....	53
4.3	VBM.....	57
4.3.1	Substância Cinzenta.....	58
4.3.2	Substância Branca.....	61
4.4	Área do Corpo Caloso na Linha Média.....	62
4.5	Relaxometria e Taxa de Transferência de Magnetização.....	64

5	DISCUSSÃO	71
5.1	Avaliação Clínica, Laboratorial e do Rinencéfalo	72
5.2	Morfometria da Substância Branca e Cinzenta	75
5.3	Análise Quantitativa da Substância Branca	78
6	CONCLUSÃO	81
	REFERÊNCIAS	84

ARTIGO PUBLICADO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hipogonadismo Hipogonadotrófico

O hipogonadismo é definido como uma deficiência na função gonadal, resultando em retardo do desenvolvimento sexual (puberdade atrasada) ou insuficiência reprodutiva. Verifica-se um baixo nível de hormônios sexuais, principalmente a testosterona no homem e o estradiol na mulher. Pode ser classificado em duas categorias: primário ou hipergonadotrófico, em que o defeito é gonadal e há valores elevados de gonadotrofinas (hormônio luteinizante - LH e folículo-estimulante - FSH); e secundário ou hipogonadotrófico, com alteração hipotalâmica ou hipofisária levando a anormalidade na liberação de gonadotrofinas.

O hipogonadismo hipogonadotrófico pode estar associado a alterações estruturais hipotalâmico-hipofisárias, como malformações e lesões congênitas, neoplasias, doenças infiltrativas, traumatismo crânio-encefálico e radioterapia. Nestes casos, o hipogonadismo geralmente está associado à deficiência de outros hormônios hipofisários (deficiência múltipla hipofisária ou pan-hipopituitarismo), observando-se outras manifestações clínicas, secundárias às disfunções dos demais eixos hipotalâmico-hipofisários, além dos sinais e sintomas decorrentes de efeito expansivo ou acometimento de outras estruturas encefálicas.

A deficiência isolada de gonadotrofinas pode ser congênita ou adquirida. A forma congênita pode ser secundária a alterações da síntese e secreção de FSH e LH, pode estar associada à hipoplasia adrenal congênita e outras síndromes genéticas, como a de Prader-Willi. O hipogonadismo hipogonadotrófico quando associado à hiposmia ou anosmia é chamado de displasia olfato-genital ou Síndrome de Kallmann (SK) (KALMANN et al., 1944; HEDGE et al., 1987).

Clinicamente o hipogonadismo é mais facilmente suspeitado na adolescência, quando normalmente há um aumento pulsátil da secreção do hormônio liberador de gonadotrofina

(GnRH) para adequado desenvolvimento puberal. Nas mulheres, o hipoestrogenismo se traduz por ausência de telarca e distúrbios menstruais, com volumes uterino e ovariano reduzidos para a idade, além de diminuição da libido, dispareunia e infertilidade. Nos homens, os baixos níveis de andrógenos manifestam-se por falta de desenvolvimento do pênis e testículos, que permanecem com medidas pré-puberais, além de poucos pêlos faciais, voz infantilizada, massa muscular deficiente, diminuição da libido e impotência. Criptorquidia e ginecomastia são menos comumente observadas. Em ambos os sexos, o eunucoidismo pode estar presente. As manifestações clínicas dependem do grau de deficiência de GnRH, completa ou parcial, variando ainda com a idade de início e a duração. O diagnóstico de hipogonadismo hipogonadotrófico isolado congênito mais raramente pode ser feito em neonatos, particularmente do sexo masculino, quando se observa criptorquidia e micropênis ao exame físico e laboratorialmente há diminuição dos valores de gonadotrofinas e hormônios sexuais (SEMINARA et al., 1998).

Laboratorialmente a deficiência isolada de GnRH é caracterizada por concentrações baixas de LH e FSH basais e após estímulo com GnRH, assim como níveis muito baixos de testosterona e estradiol. O teste do GnRH demonstra disfunção de seu padrão secretório, observando-se ausência de pulsatilidade ou presença de pulsos de baixa amplitude (WILSON et al., 1998).

1.2 Síndrome de Kallmann

Os primeiros casos de atraso puberal foram descritos há mais de 800 anos, por um grande filósofo e teólogo judeu chamado Rabbi Moshe ben Maimon (Rambam). A maturação sexual é de grande importância no judaísmo, e Rambam descreveu casos de adolescentes com ausência de barba, pêlos finos, pele macia, voz aguda e pouco espermatozoide. Já

as primeiras descrições de hipogonadismo associado a alterações do olfato foram feitas por MAESTRE DE SAN JUAN et al. em 1856 e, posteriormente, por WEIDENREICH et al. em 1914. Porém, somente trinta anos após este estudo, em 1944, foi descrita a base genética da doença, quando KALLMANN et al. (1944) publicaram artigo baseado em estudo de três famílias com eunucoidismo primário (RIBEIRO et al., 2008).

A SK é mais freqüente no sexo masculino, com incidência estimada de 1/10000 homens e 1/50000 mulheres (SEMINARA et al., 1998). A associação entre hipogonadismo e alteração do olfato é explicada com base em estudos da embriogênese humana. Os neurônios que sintetizam o GnRH originam-se da placa olfatória, esta por sua vez de origem ectodérmica, localiza-se fora do sistema nervoso central, em uma área do epitélio de revestimento da cavidade nasal, que também origina os receptores olfatórios. Os neurônios produtores de GnRH são detectados no feto já ao redor da quarta semana de vida, enquanto a presença de LH e FSH é verificada apenas a partir da décima semana. Esses neurônios devem migrar através dos nervos olfatórios, passando pela placa cribiforme, até atingirem o hipotálamo (região infundibular e área pré-óptica), sendo guiados por moléculas de adesão. Na SK esta migração ocorre de forma inadequada e incompleta (SCHWANZEL-FUKUDA et al., 1989).

Além das manifestações do hipogonadismo e da disfunção olfatória, outras alterações que podem fazer parte da síndrome são criptorquidia, defeitos de linha média como fenda labial e palatina, defeitos cardiovasculares, anormalidades oculomotoras, ataxia cerebelar, hipoplasia e agenesia renal, e distúrbios neurológicos como sincinesia bimanual ou movimentos em espelho (ME) (SCHWANKHAUS et al., 1989). Até recentemente, a ocorrência de agenesia renal e de ME eram consideradas específicas dos casos com herança ligada ao X (QUINTON et al., 2001). Atualmente estas alterações são consideradas típicas, mas não específicas, desta forma de herança (SATO et al., 2004).

A SK pode ocorrer na forma familiar ou esporádica, com os casos familiares podendo apresentar padrão de hereditariedade autossômico recessivo e dominante ou ligado ao X. A maioria dos casos é esporádica e o primeiro gene identificado relacionado à doença é o gene *KALI*, localizado no cromossomo X, na região Xp22-3, que codifica uma proteína de 680 aminoácidos chamada anosmina, que possui homologia com moléculas de adesão celular envolvidas no desenvolvimento neural, portanto, provavelmente atuando nas interações celulares e no desenvolvimento axonal. Múltiplas alterações diferentes já foram descritas neste gene, incluindo deleções e mutações, estas podendo ser de diferentes tipos. São descritos ainda casos de indivíduos com o mesmo defeito genético, porém com fenótipos diferentes, demonstrando a grande heterogeneidade clínica e genética da doença (WALDSTREICHER et al., 1996; SEMINARA et al., 1998; COSTA et al., 2001). Entretanto, em somente 14% dos casos familiares e 11% dos esporádicos são encontradas mutações no gene *KALI*, e, como somente a minoria dos casos segue o padrão de herança ligada ao X, ainda há busca por outros genes, provavelmente autossômicos, que tenham papel importante na doença (OLIVEIRA et al., 2001). Os estudos mais recentes já demonstram ao menos dois novos genes envolvidos na etiologia da doença, com mutações do gene do receptor de fator de crescimento dos fibroblastos 1 (*FGFR1*, também chamado de *KAL2*) associadas a uma forma autossômica dominante de SK, e mutações do gene *PROKR2*, que codifica um receptor de procinetina, associadas a deficiência no desenvolvimento do sistema olfatório e reprodutivo (MATSUMOTO et al., 2006; PITTELOUD et al., 2006, 2007; TRARBACH et al., 2006; ABREU et al., 2008).

O diagnóstico da SK em adultos pode, portanto, ser realizado devido às queixas clínicas do hipogonadismo hipogonadotrófico associadas à deficiência olfatória referida ou avaliada por testes específicos e confirmado por dosagens hormonais no sangue. Porém, em indivíduos pré-púberes e na adolescência o diagnóstico nem sempre é fácil de ser firmado,

devido não somente à clínica, como pelas dificuldades laboratoriais e de aplicação de testes olfatórios. As alterações no rinencéfalo de pacientes com SK estão bem definidas e podem colaborar no diagnóstico da doença em momentos oportunos.

1.3 Exames de Imagem do Rinencéfalo

O primeiro trabalho de MAESTRE DE SAN JUAN et al. (1856), relatando a associação entre hipogonadismo e hiposmia, já descrevia na necrópsia do indivíduo estudado a presença de alterações morfológicas do rinencéfalo. Os primeiros estudos de imagem para avaliação do encéfalo de pacientes com SK foram realizados com pneumoencefalografia, como o de LIEBLICH et al. (1982), estudo este que conseguiu demonstrar em 4 pacientes a ausência completa de sulcos olfatórios bilateralmente.

Em 1987, KLINGMULLER et al. (1987), utilizando um aparelho de Ressonância Magnética (RM) de 1,5 T, com cortes axiais de 3,0 mm, demonstraram que os sulcos olfatórios em homens normais e homens com hipogonadismo hipogonadotrófico sem anosmia (HH) eram longos e largos, diferentemente de quatro homens estudados com SK, em que encontrou ausência de sulcos em um paciente e sulcos de dimensões reduzidas nos demais.

Em 1993 foram publicados os primeiros trabalhos que, utilizando imagens de RM em planos coronais, com cortes finos, do encéfalo anterior, descreveram alterações dos tratos e bulbos olfatórios, além das alterações nos sulcos previamente descritas. TRUWIT et al. (1993) estudaram nove pacientes com SK, descrevendo aplasia ou hipoplasia dos bulbos e tratos olfatórios em todos os casos, enquanto KNORR et al. (1993) relataram alterações em cinco de seis pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico, utilizando técnica semelhante, de cortes coronais do rinencéfalo ponderados em T1. Em ambos os estudos

foram descritas assimetrias em alguns pacientes, inclusive com hipoplasias unilaterais de sulcos e bulbos olfatórios.

No ano seguinte VOGL et al. (1994) realizaram estudo comparativo das alterações encefálicas encontradas em imagens de RM de pacientes com SK, HH e casos controles. O diagnóstico de SK foi firmado após confirmação por testes objetivos da presença de hiposmia ou anosmia. Os autores estudaram dezoito pacientes com SK e dez com HH, utilizando aparelho de RM de 1,5T, com seqüências ponderadas em T1 e T2 nos diferentes planos. Foi descrito aplasia ou hipoplasia dos sulcos, tratos e bulbos olfatórios em dezessete pacientes com SK, enquanto que em apenas três pacientes com HH observou-se discreta hipoplasia de um dos bulbos. Nos pacientes controles não se verificou alteração do rinencéfalo. Nesses estudos as avaliações do rinencéfalo por RM foram realizadas qualitativamente.

Em 1996, YOUSEM et al. (1996) estudaram vinte e cinco pacientes com anosmia desde o nascimento, sendo oito com diagnóstico de SK, sendo o primeiro trabalho a realizar uma avaliação quantitativa dos bulbos e tratos olfatórios. Os autores utilizaram imagens coronais ponderadas em T1, com processamento tridimensional, feito em uma estação de trabalho específica. Hipoplasia ou aplasia dos bulbos e tratos olfatórios foi descrita em todos os pacientes, incluindo aqueles com SK. Em 2002, ABOLMAALI et al. (2002) também realizaram avaliação quantitativa do rinencéfalo em dezesseis pacientes com anosmia isolada desde o nascimento, comparando com indivíduos controles.

1.4 Movimentos em Espelho e Ressonância Magnética

Sincinesia ou ME consiste na movimentação involuntária de um segmento do corpo em resposta a movimentação voluntária do segmento contra-lateral, de maneira análoga, mais comumente vista nos membros superiores, principalmente nas mãos. Em crianças e

adolescentes os movimentos em espelho podem ser observados, reduzindo progressivamente com a idade. A presença de ME no adulto, quando proeminente e sustentada, é considerada patológica, e pode ser encontrada como doença isolada congênita, em alguns casos com padrão familiar de herança autossômica, assim como associada a síndromes, como a de Klippel-Feil e Kallmann. Pode ser vista ainda na doença de Parkinson e associada à hemiplegia, em casos de paralisia cerebral e mais raramente infarto cerebral (CONNOLLY et al., 1968; MAYSTON et al., 1999). A presença de ME nos pacientes com SK familiar de herança ligada ao X sugere um mecanismo patogênico semelhante ao responsável pela associação entre anosmia e o hipogonadismo nestes pacientes, ou seja, um distúrbio de migração neuronal. Devido à fidedignidade anatômica e a possibilidade de estudos quantitativos, a RM passou a ser utilizada para auxiliar a elucidar a causa dessa alteração neurológica.

Baseado principalmente em estudos de neuroimagem e eletrofisiologia, duas hipóteses foram formuladas para explicar a etiologia dos ME: desenvolvimento anormal do sistema motor primário, envolvendo o trato corticoespinal; e uma deficiência no mecanismo inibitório do córtex motor contra-lateral, principalmente através do corpo caloso.

A primeira descrição da associação de ME com hipogonadismo hipogonadotrófico e anosmia foi feita por CONRAD et al. (1978). Os autores relataram a presença de ME somente nas mãos em quatro irmãos da mesma família, e sugeriram como fator etiológico, utilizando eletroneuromiografia, a presença de um distúrbio de fusão da linha média, envolvendo possivelmente uma deficiência na decussação das fibras dos tratos corticoespinais.

Anteriormente, outro estudo, realizado em pacientes com agenesia do corpo caloso, já havia proposto o envolvimento de uma deficiência do mecanismo inibitório inter-hemisférico entre os córtices motores suplementares na etiologia dos ME. Neste trabalho, os autores

sugeriam que, nos pacientes que apresentavam o sinal, a ausência de vias inibitórias inter-hemisféricas, que normalmente cruzam a linha média através da porção anterior do corpo caloso, seria responsável pela sua presença (DENNIS et al., 1976).

Em 1985, NASS et al. (1985) realizaram estudo eletrofisiológico com crianças com hemiparesia congênita. Os autores descreveram a persistência dos ME nestas crianças, após a idade de 10 anos, com mudança no padrão de apresentação, tornando-se simétricos, nas duas mãos, incluindo a dominante. Neste trabalho os autores propuseram que a associação entre uma alteração na maturação do corpo caloso e uma deficiência de decussação dos tratos piramidais seria responsável pela persistência patológica do sinal, desta maneira integrando as duas hipóteses previamente formuladas.

QUINTON et al. (1996), em avaliação de vinte e sete pacientes com SK, sendo doze com herança ligada ao X e dez com ME, não evidenciaram alterações significativas do corpo caloso. Neste trabalho os autores, além da caracterização genotípica e fenotípica, estudaram as alterações encefálicas em exames de RM, com avaliação qualitativa dos sulcos, bulbos e tratos olfatórios, e avaliação morfológica do corpo caloso, calculando a área deste em cortes sagitais na linha média. A área do corpo caloso dos vinte e sete pacientes com SK não foi significativamente diferente em relação a vinte e três casos controles, assim como não se encontrou diferença entre os pacientes com alterações do gene *KALI* e aqueles em que não se encontraram deleções ou mutações.

No ano seguinte, através de estudos eletrofisiológicos, outro grupo sustentou a hipótese de que a presença de um trato corticoespinhal anormalmente desenvolvido poderia explicar os ME nos pacientes com SK ligada ao X. Os autores estudaram treze pacientes com SK e demonstraram que a estimulação do nervo digital do primeiro dedo de uma mão modulava a eletroneuromiografia da mão oposta, e ainda, a estimulação magnética

transcraniana unilateral do córtex motor primário resultava em potencial evocado motor de latência semelhante nos músculos de ambas as mãos (MAYSTON et al., 1997).

No mesmo ano, KRAMS et al. (1997) realizaram exames de PET (do inglês “positron emission tomography”), com H₂-150, em seis pacientes com SK e seis casos controles, avaliando a ativação do córtex motor primário durante movimentos voluntários e involuntários das mãos, através da mensuração do fluxo sanguíneo cerebral. Demonstrou-se discreta ativação no córtex motor contra-lateral ao lado do movimento manual em espelho, que sugeria realmente uma deficiência na inibição transcalosa. Porém, em um segundo experimento, grau semelhante de ativação também foi visto durante movimentos ativos e passivos da mão que no primeiro experimento apresentava os movimentos anormais, sugerindo participação de uma via aferente ao córtex motor, provavelmente associada a um “feedback” sensorial anormal.

MAYER et al. (1999) encontraram atividade razoavelmente simétrica do córtex sensorimotor primário nos dois hemisférios quando do movimento voluntário de uma mão nos pacientes com ME persistente, e descreveu ainda nestes pacientes, ativação relevante de áreas motoras suplementares na linha média. Os autores sugeriram que a ativação cortical bilateral agiria como uma estratégia na realização dos movimentos finos das mãos para compensar a decussação incompleta do trato corticoespinal. LEISING et al. (1997) realizaram estudo de RM funcional em nove pacientes com ME, sendo três com SK, e mostrou nestes pacientes ativação do córtex na região medial do sulco pré-central bilateralmente, enquanto nos controles a ativação ocorreu apenas no lado contra-lateral ao movimento da mão ordenada. Os autores sugeriram participação do córtex motor primário e não somente alteração do trato corticoespinal na etiologia dos ME. Desta maneira, estes estudos sugeriram ainda a participação de outras estruturas na etiologia dos ME, além da deficiência na decussação do trato corticoespinal e no mecanismo inibitório transcaloso.

Com o objetivo de estudar a etiologia dos ME, KRAMS et al. (1999), realizaram avaliação do encéfalo utilizando a técnica de análise morfométrica baseada em voxel (VBM, do inglês “voxel-based morphometry”), com o mesmo grupo de pacientes do estudo prévio de eletrofisiologia. O termo voxel em radiologia representa a unidade volumétrica das imagens tridimensionais. Neste trabalho, os autores compararam os encéfalos de nove pacientes com SK ligado ao X (todos com ME), nove pacientes com SK autossômico (sem ME) e dezoito casos controles. A análise com VBM foi realizada a partir de imagens de RM com seqüências tridimensionais volumétricas ponderadas em T1, utilizando-se o programa SPM-96. Os resultados demonstraram um aumento da densidade de substância branca (SB) do corpo caloso em ambos os grupos de pacientes com SK em relação aos casos controles, ou seja, sem diferenças entre os pacientes com e sem ME, entrando em desacordo com a hipótese de que alteração do corpo caloso poderia ser responsável pelo sinal. A técnica apontou ainda áreas de aumento da SB nos pacientes com SK e ME em relação aos controles, que não foram encontradas na comparação dos pacientes sem ME com os mesmos controles. Estas áreas, de acordo com o sistema de coordenadas utilizado, incluíam porções da cápsula interna e ponte bilateralmente, que os autores concluíram como parte do aspecto posterior do trato corticoespinhal, ou seja, sugerindo uma hipertrofia do trato em pacientes com SK ligada ao X.

O VBM é um método de segmentação automática capaz de analisar diferenças da SB e substância cinzenta (SC) de todo o cérebro, independe do examinador e possui maior objetividade e reprodutibilidade. Mas a principal característica e vantagem do método é o fato de o VBM ser capaz de detectar diferenças pequenas de volume ou densidade, desconsiderando as diferenças inerentes às variações anatômicas entre os indivíduos (ASHBURNER et al., 2000, 2001). O VBM tem sido utilizado principalmente para estudos

de alteração da SC em doenças como esquizofrenia, epilepsia do lobo temporal e doença de Alzheimer (KUBICKI et al., 2002; KARAS et al., 2003; BERNASCONI et al., 2004).

Alterações morfológicas não necessariamente significam alterações funcionais. A presença de ME e de agenesia renal tipicamente encontrada nos pacientes com SK de herança ligada ao X é uma questão intrigante, de natureza ainda não completamente esclarecida, e que tem motivado vários estudos com diferentes técnicas, inclusive de exames de imagem, anatômicos e funcionais, com intuito de tentar elucidar os mecanismos responsáveis por estas associações e desta maneira também colaborar no diagnóstico e na caracterização do fenótipo adequado da doença.

1.5 Avaliação Quantitativa do Sinal da Substância Branca Encefálica

As imagens convencionais de RM, utilizadas na prática clínica, não são capazes de detectar alterações sutis de sinal da SB e SC, além do aspecto qualitativo da análise das imagens. Por exemplo, nas imagens convencionais, áreas de edema, desmielinização e gliose se apresentam de maneira semelhante. Com o objetivo de superar o problema da baixa especificidade da RM convencional, técnicas de análise quantitativa têm sido criadas, dentre elas destacando-se a relaxometria (RL) e a transferência de magnetização (TM).

A RL é um método capaz de quantificar diferenças sutis nos tempos de relaxação T1 e T2 dos tecidos. O tempo de relaxação transversal T2 pode ser estimado fazendo-se uma sequência com tempo de repetição (TR) fixo e adquirindo o sinal em dois ou mais tempos de eco (TE) nesta mesma sequência. Portanto, em uma determinada região ou pixel, para cada TE, tem-se uma intensidade de sinal diferente, que varia de acordo com seu tempo de relaxação transversal. O termo pixel refere-se à unidade bidimensional das imagens em radiologia, de maneira homóloga ao termo voxel para as imagens tridimensionais. Quanto

maior o número de TE utilizado, mais semelhante fica a curva estimada da curva real. Pode-se calcular o tempo de relaxação transversal pixel a pixel numa imagem, formando um mapa. Quando se utilizam apenas dois tempos de eco, o tempo de relaxação T2 é estimado pela equação: $T2 = (TE_2 - TE_1) / \ln (SI_1 / SI_2)$, onde TE₁ e TE₂ são o primeiro e segundo tempos e SI₁ e SI₂ as medidas de intensidade de sinal nestes tempos respectivamente. O aumento do tempo de relaxação T2 reflete um aumento da concentração de água dos tecidos que, no sistema nervoso central, pode ser resultante de processo inflamatório, edema, desmielinização, gliose ou perda e dano neuronal (BARNES et al., 1988; LARSSON et al., 1989; ARMSPACH et al., 1991; BERNASCONI et al., 2000; BOUILLERET et al., 2000; PAPANIKOLAOU et al., 2004).

A imagem de RM convencional detecta apenas o sinal dos prótons com maior mobilidade, isto é, prótons que tem o tempo de relaxação T2 maior que 10 ms. Os prótons que são menos móveis por estarem associados a macromoléculas ou a membranas nos tecidos biológicos apresentam T2 muito curto (menos que 1 ms) e não são detectados. A proximidade entre os prótons das macromoléculas e os prótons nas moléculas de água livre permite que os estados de precessão deles sejam influenciados entre si através do processo de troca química. É possível saturar de forma seletiva os prótons ligados a macromoléculas usando um pulso de radiofrequência denominado fora de ressonância. Esta saturação pode ser transferida para os prótons livres, dependendo da taxa de troca entre eles, desta maneira reduzindo a intensidade de sinal da imagem (WOLFF et al., 1989; DOUSSET et al., 1992). Esta técnica é utilizada na prática clínica para melhorar o contraste das imagens na realização de exames de angiorressonância e após administração de contraste paramagnético (HENKELMAN et al., 2001).

Esta transferência de energia entre os prótons ligados a macromoléculas e prótons livres pode ser estimada calculando-se a porcentagem da taxa de transferência de

magnetização (TTM). Esta é calculada através da diferença do sinal entre voxels obtidos com o pulso de saturação (M_S) e sem o pulso de saturação (M_0), dividida pelos voxels sem o pulso de saturação, multiplicado por 100, como se segue: $TTM = (M_0 - M_S) \times 100 / M_0$. No cérebro humano, os prótons ligados estão basicamente localizados na mielina, principal proteína constituinte do envoltório axonal, por esta razão a TTM é um método comumente usado para avaliação quantitativa da mielina e caracterização de doenças da SB (BERRY et al., 1999; BAGLEY et al., 1999; KUMAR et al., 2003; ROVARIS et al., 2003).

Mesmo a técnica de VBM não é capaz de elucidar a natureza da alteração volumétrica do corpo caloso e da hipertrofia dos tratos de SB possivelmente envolvidas na etiologia dos ME. Desta maneira, não especificando se essas alterações devem-se a um aumento do número de fibras, aumento do diâmetro das fibras ou aumento da mielinização. Portanto, as técnicas de estudo quantitativo da SB podem auxiliar na determinação do mecanismo responsável pelos ME nos pacientes com SK.

2 OBJETIVOS

Estudar as alterações no encéfalo de pacientes com SK, através de imagens obtidas por RM, utilizando diferentes técnicas e ferramentas em radiologia.

- Avaliar as alterações dos sulcos e bulbos olfatórios de maneira qualitativa e quantitativa.
- Avaliar as alterações relacionadas ao sistema motor, comparando os pacientes com SK, com e sem ME, com o intuito de colaborar para a elucidação da etiopatogenia deste sinal. Para tanto utilizaremos novas técnicas por RM, incluindo o VBM, a RL e a TM.
- Correlacionar as diferentes alterações radiológicas do encéfalo com os achados clínicos, laboratoriais e a presença de mutações gênicas nos pacientes com SK.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

Foram estudados vinte e um pacientes com diagnóstico de SK, em seguimento ambulatorial pela disciplina de Endocrinologia do Departamento de Clínica Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP). Foram excluídos do trabalho pacientes em que o hipogonadismo hipogonadotrófico fazia parte de outra síndrome genética diferente da SK, e aqueles em que o hipogonadismo estivesse associado ao quadro de hipopituitarismo parcial ou total.

O trabalho teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP (parecer número 9034/2001) e do CONEP (parecer número 357/2002), e todos os pacientes assinaram termo de consentimento informado.

3.2 Avaliação Clínica e Laboratorial

Os critérios para diagnóstico da SK incluíram a presença de sinais e sintomas de hipogonadismo hipogonadotrófico, confirmados por avaliação laboratorial, associados à queixa de distúrbio olfatório, confirmado por teste específico. O estudo clínico e laboratorial, assim como o estudo molecular dos pacientes selecionados, já foi realizado como parte de um projeto de pesquisa prévio desenvolvido pela disciplina de Endocrinologia (VERSIANI et al., 2007). A avaliação clínica é realizada com atenção aos sinais de hipogonadismo hipogonadotrófico, como ausência de caracteres sexuais secundários, eunucoidismo, ginecomastia e pênis e testículos diminuídos de tamanho. Para todos os pacientes seguidos no ambulatório é solicitada avaliação da idade óssea, dosagem de LH, FSH, testosterona, cortisol, T4 total ou livre e TSH. Quando indicado, são realizados testes funcionais de reserva

hipotálamo-hipofisária: teste de hipoglicemia insulínica, teste de estímulo com TRH e teste de estímulo com GnRH.

A presença de disfunções olfatórias, ou seja, hiposmia ou anosmia, é avaliada através de teste específico, “The Smell Identification Test”, da Universidade da Pennsylvania (DOTY et al., 1984). Este teste pode ser realizado pelo próprio paciente e utiliza partículas odoríferas microencapsuladas que são liberadas após arranhar-se um cartão teste impregnado. De acordo com a idade do paciente e o número de acertos, baseado em um escore fornecido pelo fabricante, o resultado pode indicar teste normal, hiposmia leve, moderada, grave ou anosmia.

A avaliação de ME também é realizada através de exame neurológico apropriado, adaptado do descrito por MAYSTON et al (1997). Observa-se a presença de movimentos involuntários contra-laterais em espelho durante movimentos ativos, voluntários e repetitivos, de um dos membros superiores, como aposição indicador-polegar, flexão-extensão do punho ou cotovelo e pronação-supinação do antebraço. Quanto à classificação, os movimentos involuntários foram graduados de 0 a 4, conforme a descrição: 0 = nenhum movimento visível, 1 = movimento involuntário muito discreto, 2 = movimentos em espelho fracos e não sustentados ou mais fortes porém breves, 3 = movimento forte e sustentado, 4 = movimento igual ao da mão oposta. Os resultados são apresentados como a soma de duas provas.

O rastreamento de mutações e deleções nos genes *KALI*, *FGFR1* e *PROKR2* (TRARBACH et al., 2006; VERSIANI et al., 2007; ABREU et al., 2008) é realizado após coleta de sangue venoso periférico dos pacientes incluídos no estudo, extração do DNA, amplificação deste utilizando-se a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) com primers apropriados para cada gene, e posterior, seqüenciamento do DNA amplificado pelo método automático (ABI Prism 310 Genetic Analyser, PE Applied Biosystems).

Para os estudos com RM, os pacientes foram comparados a um grupo controle formado por dezesseis voluntários, pareados por sexo e idade.

3.3 Aquisição das Imagens de Ressonância Magnética

Todos os vinte e um pacientes e o dezesseis voluntários do grupo controle foram submetidos a exames de imagem por RM em um equipamento supercondutor de 1,5 T, modelo Magnetom Vision (Siemens, Erlangen, Alemanha), instalado no Centro de Ciência das Imagens e Física Médica do HCFMRP - USP. Foi usada bobina transmissora e receptora para exame de crânio com polarização circular.

O protocolo incluiu as seguintes seqüências:

- Sequência volumétrica gradiente eco (GRE 3D) ponderada em T1, com TR de 9,7 ms, TE de 4 ms, ângulo de nutação de 12 graus, varredura de todo o encéfalo proporcionando partições de 1 mm de espessura no plano sagital, matriz de 256 x 256 pixels e campo de visão (FOV, do inglês “field of view”) de 256 mm, produzindo assim um voxel isométrico de 1 mm³ (Figura 1).
- Sequência de turbo spin eco (TSE) coronal ponderada em T2 com cortes finos (3 mm) obtida no plano coronal, TR de 5400 ms, TE de 99 ms, matriz de 512 x 512 e FOV de 240 mm, varredura desde o seio frontal até posteriormente ao seio esfenoidal (Figura 2).
- Sequência para RL: TSE com duplo eco, ponderada em T2 com TR de 3526 ms, TE de 22 ms e 90 ms, fator turbo de 5, 20 cortes de 5 mm de espessura e 1mm de intervalo, obtida no plano axial bicomissural, matriz de 150 x 256 e FOV de 240 mm (Figura 3 C/D).

- Sequências de TM: duas sequências seguidas GRE, obtidas no plano axial paralelo ao plano bicomissural, com TR de 34 ms, TE de 11 ms, ângulo de nutação de 30 graus, 40 partições com cortes de 3 mm de espessura sem espaçamento, matriz de 167 x 256 e FOV de 240 mm. Apenas na segunda aquisição foi aplicado um pulso de saturação fora de ressonância, sendo o pulso gaussiano com 7,68 ms de duração, 500 graus de ângulo de pulso efetivo e 1,5 kHz off-ressonância (Figura 3 A/B).

Figura 1 – Imagens de ressonância magnética de um paciente com Síndrome de Kallmann. Sequência volumétrica gradiente eco ponderada em T1, adquirida no plano sagital, utilizada para realização do estudo de morfometria baseada em voxel (VBM).

Figura 2 – Imagens de ressonância magnética do rinencéfalo de um voluntário do grupo controle. Cortes finos coronais, turbo spin eco ponderados em T2, contínuos, sem espaçamento, utilizados para a avaliação mais adequada das estruturas pequenas do rinencéfalo e cálculo do volume dos bulbos olfatórios (setas).

Figura 3 – Imagens de ressonância magnética obtidas de um voluntário do grupo controle. Para a transferência de magnetização são adquiridas duas sequências ponderadas em T1, sem (A) e com (B) o pulso de saturação fora de ressonância. Para a relaxometria obtém-se uma sequência ponderada em T2 com duplo eco, um primeiro eco de 22 ms (C) e outro de 90 ms (D).

3.4 Avaliação do Rinencéfalo

Para análise dos bulbos e sulcos olfatórios foram utilizadas principalmente as imagens coronais TSE ponderadas em T2 com cortes finos do rinencéfalo e as imagens GRE 3D ponderadas em T1. Inicialmente foi realizada a avaliação qualitativa, com a revisão das imagens feita por ao menos dois médicos radiologistas, utilizando como referência atlas anatômicos e casos de hipoplasia e aplasia descritos na literatura médica, classificando os sulcos e bulbos olfatórios como normais (N), presença de hipoplasia discreta (+/4+), hipoplasia moderada (++/4+), hipoplasia acentuada (+++/4+) e ausentes (4+/4+), avaliando cada sulco e bulbo individualmente, a direita e a esquerda. Foram revistas as imagens dos vinte e um pacientes e dos dezesseis casos controles de maneira cega e aleatória, sem conhecimento do grupo a que cada indivíduo pertencia.

Como forma de análise quantitativa foi calculada a volumetria dos bulbos olfatórios, nas imagens TSE T2, e realizada as mensurações bidimensionais dos sulcos olfatórios, no comprimento e na profundidade, utilizando adicionalmente as reconstruções nos planos axial e coronal das imagens GRE 3D. Utilizou-se o programa ImageJ (programa de livre distribuição, criado pelo National Institutes of Health, Bethesda, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij>), sendo que para a volumetria utilizou-se ainda uma ferramenta “plug in” do imageJ, o Livewire tool, capaz de detectar as bordas das estruturas baseando-se em limiares de intensidade de sinal (<http://ivusssnakes.sourceforge.net>). As medidas foram feitas ao menos duas vezes, em tempos diferentes, pelo autor, e a média aritmética considerada como representativa do valor a ser analisado.

Os bulbos olfatórios visíveis foram medidos nos pacientes com SK, assim como todos os bulbos dos voluntários do grupo controle. Os bulbos foram diferenciados dos tratos olfatórios mediante a mudança abrupta do diâmetro, e as suas margens foram facilmente

delimitadas pelo líquido cefalorraquidiano circundante, brilhante em T2. A área do bulbo foi medida em imagens consecutivas sem espaçamento e multiplicada pela espessura do corte para se obter o volume. Bulbo olfatório não visível foi considerado aplásico, com volume igual a zero, assim como foi considerado aplásico o sulco não identificável. A ferramenta de mensuração semi-automática do imageJ também foi utilizada para medir os sulcos olfatórios, permitindo obter medidas não lineares mais fidedignas dos sulcos tortuosos.

Um bulbo olfatório de paciente com SK foi considerado hipoplásico quando seu volume foi menor que a média menos dois desvios padrões do grupo controle, enquanto o sulco olfatório foi considerado hipoplásico quando ao menos uma medida, o comprimento ou a profundidade, foi menor que a média menos dois desvios padrões dos indivíduos controles.

3.5 Protocolo de VBM

Inicialmente as imagens volumétricas adquiridas originalmente no formato DICOM (do inglês “Digital Imaging and Communications in Medicine”) foram transformadas para o formato ANALYZE, utilizando para isso outro programa, o MRICro (<http://www.sph.sc.edu/comd/rorden/mricro.html>). O processamento das imagens seguiu o protocolo otimizado para VBM (GOOD et al., 2001). Para este processamento foi utilizado uma ferramenta de mapa estatístico paramétrico chamada SPM2 (“Statistical Parametric Mapping”, Wellcome Department of Imaging Neuroscience, Institute of Neurology, London, UK), trabalhando no programa MATLAB versão 7.0 (Mathworks, Natick, MA, USA).

O primeiro passo é a demarcação da comissura anterior e a reorientação para o padrão neurológico, consistindo na única fase manual do processamento. A primeira etapa foi a criação de imagens de referência ou moldes específicos para nosso estudo, tanto para a SB como SC, utilizando para tanto todas as imagens de todos os indivíduos. Em seguida,

seguindo o modelo otimizado de VBM, utiliza-se estes moldes para reprocessamento de todas as imagens, que são espacialmente normalizadas e segmentadas, e então estes parâmetros de deformação são novamente aplicados as imagens originais que são segmentadas mais uma vez. As imagens segmentadas de SB e SC são então suavizadas antes da realização da análise estatística das diferenças entre os grupos de pacientes e controles, realizada através de testes t aplicados voxel a voxel. Ainda, uma medida do total de SC é calculada para ser utilizada como fator confusional na análise de covariância. A covariância foi dada pelo numero total de voxels no compartimento da SC de cada indivíduo.

Mais detalhadamente, a normalização é um procedimento de alinhamento das imagens que serve para garantir que um determinado voxel de uma imagem esteja idealmente na mesma posição em todas as outras imagens. As imagens originais são normalizadas com base no modelo estudo-específico utilizando transformações lineares e não lineares, sendo esta última feita com funções de base $7 \times 8 \times 7$ e 12 interações. As imagens normalizadas são então segmentadas. Nesse passo cada imagem é dividida em SC, SB, liquido cefalorraquidiano e tecidos extra-cerebrais. A segmentação emprega um modelo de análise de agrupamento que verifica a intensidade de sinal de cada voxel para separar cada grupo de tecido utilizando-se o conhecimento da distribuição desses tecidos em um indivíduo normal. Em nosso estudo a segmentação das imagens originais foi modulada pelo determinante Jacobiano extraído dos parâmetros de normalização obtidos anteriormente, para corrigir possíveis alterações de volume introduzidas durante a fase não linear de transformação espacial. Para a suavização das imagens utilizou-se um filtro gaussiano isotrópico de 12 mm. O valor do filtro gaussiano a ser utilizado na suavização é referente à quantidade de voxels vizinhos que são considerados para análise, ou seja, a intensidade de cada voxel se dá pela média ponderada dos valores dos voxels vizinhos. Este processo serve fundamentalmente para eliminar ruídos na imagem.

3.6 Protocolo de Relaxometria e Transferência de Magnetização

As imagens adquiridas no formato DICOM para cálculo da RL e da TTM foram convertidas para o formato MINC (do inglês “Medical Imaging Net CDF”). O processamento das imagens foi realizado utilizando-se ferramentas do programa MINC-tools (McConnell Brain Imaging Center, McGill University, Montreal, Canada), em uma estação de trabalho PC-Linux. As imagens de RL foram calculadas utilizando-se as imagens TSE T2 com duplo eco, e de maneira semelhante, as imagens de TM foram calculadas a partir das imagens adquiridas GRE com e sem pulso de saturação. Para cada indivíduo foram criadas imagens de RL e de TM, e posteriormente mapas médios de todos os indivíduos de cada grupo de interesse foram calculados. Os grupos estudados foram: pacientes com SK e ME, SK sem ME e grupo controle.

Para criação dos mapas médios é necessário que todas as imagens estejam alinhadas em um único espaço. Buscando este espaço único, realizou-se o alinhamento ou registro das imagens utilizando as transformadas linear e não linear, aplicadas às imagens de RL e TM, e o atlas modelo MNI305 foi utilizado como espaço estereotático padrão (EVANS et al., 1993). A análise dos mapas médios foi feita manualmente através da delimitação de regiões de interesse (ROI, do inglês “region of interest”), retangulares, envolvendo áreas relacionadas ao sistema motor, incluindo: área pré-central, lobos frontais, joelho e esplênio do corpo caloso, perna anterior e posterior da cápsula interna, pedúnculos cerebrais e cerebelares, porção basilar da ponte e decussação das pirâmides bulbares. Para delimitação das ROI utilizou-se a ferramenta Xdisp, tendo sido criados ao menos três ROI na SB das áreas de interesse, com obtenção de valores de RL e TTM em cada mapa médio dos grupos estudados. Posteriormente foi calculada a média dos valores e a média dos desvios padrões obtidos para cada região, e estas médias foram consideradas como representantes do valor de RL e TTM de cada região. Para a demarcação das ROI os mapas médios dos três grupos eram abertos

simultaneamente e colocados lado a lado, desta maneira possibilitando a identificação da mesma região nos diferentes grupos. Cada ROI possuía tamanho mínimo de 15 pixels e era marcada em localização simétrica nos lados direito e esquerdo.

3.7 Análise Estatística

3.7.1 Estatística da avaliação do rinencéfalo

Os dados obtidos após mensuração dos bulbos e sulcos olfatórios foram analisados com o programa SPSS 15.0 para Windows. Para avaliar o grau de concordância do teste olfativo com a análise quantitativa por RM nós utilizamos o índice de Kappa.

3.7.2 Estatística do VBM

A análise estatística dos resultados do processamento foi feita no próprio programa SPM2, seguindo o modelo linear geral, pressupondo-se a distribuição normal ou Gaussiana dos dados, com variâncias homogêneas centradas na média. As comparações foram feitas isoladamente entre as médias da SB e SC, detectando-se separadamente aumento ou redução significativa, de acordo com os grupos previamente definidos: todos os pacientes com SK, com e sem ME, pacientes com SK e ME, SK sem ME e grupo controle.

A análise estatística foi realizada levando em consideração nossas hipóteses *a priori*. Como já descrito previamente, baseado em investigações prévias dos ME, as regiões do córtex cerebral relacionadas às nossas hipóteses *a priori* incluíram o córtex motor primário (área de Brodmann 4), córtex somatossensorial primário (áreas 1 a 3), córtex motor suplementar (área 6) e córtex somatossensorial associativo (áreas 5 e 7), enquanto as áreas *a*

a priori de SB foram consideradas quando envolvendo o corpo caloso ou o trajeto do trato corticoespinhal na cápsula interna, mesencéfalo, ponte e bulbo. Para outras áreas da SC ou SB, nenhuma hipótese *a priori* pode ser estabelecida. As diferenças nos clusters (conjuntos de voxels) em áreas relacionadas às hipóteses *a priori* foram consideradas significativas apenas se incluíam voxels com valor de Z maior que 3,09, correspondendo a um p valor com duas caudas de 0,001 não corrigido para múltiplas comparações, ainda com um limiar adicional de um mínimo de 25 voxels. Valor de p não corrigido menor que 0,001 tem sido utilizado em estudos prévios com imagens de RM funcionais e estruturais e é considerado seguro para proteger contra resultados falso negativos quando existem hipóteses *a priori* relacionadas a localização dos achados (BLACKWOOD et al., 1999; RUSCH et al., 2003). Já achados em áreas inesperadas, ou seja, não relacionadas às hipóteses *a priori*, foram considerados significativos apenas se sobrevivessem à taxa de falsa descoberta (TFD) para correção por múltiplas comparações, com p valor menor que 0,05.

As coordenadas obtidas com o valor de pico no voxel, isto é, o valor máximo de diferença de volume da SB e SC em cada cluster significante, no espaço estereotático MNI (Montreal Neurological Institute, Canada) foram convertidas para o espaço Talairach utilizando a transformação sugerida por Matthew Brett em seu website, através do programa Mni2tal (<http://imaging.mrc-cbu.cam.ac.uk/imaging/MniTalairach>). Uma vez convertidas as coordenadas, foi utilizado o programa Talairach Daemon para finalmente obter-se a descrição da localização anatômica.

3.7.3 Análise ROI do Corpo Caloso

Como forma de validar nosso estudo de VBM (QUINTON et al., 1996; KRAMS et al., 1999), foi realizada uma análise independente de região de interesse, calculando-se a área

do corpo caloso na linha média das imagens originais GRE 3D, no plano sagital. Esta análise também foi realizada com a ferramenta Livewire do programa ImageJ. A área do corpo caloso de cada indivíduo foi medida ao menos duas vezes, de maneira cega, sem conhecimento do grupo a que cada imagem pertencia, e a média aritmética foi utilizada para a análise estatística. Um teste t independente foi realizado comparando as áreas entre os grupos de pacientes com SK com e sem ME e o grupo controle.

3.7.4 Estatística da Relaxometria e Taxa de Transferência de Magnetização

A análise estatística dos resultados da RL e da TTM foi realizada no programa Minitab versão 3.3.0 (Minitab Inc, Pennsylvania, USA). Este programa permite a comparação entre duas médias, sabendo-se o desvio padrão e o tamanho da amostra, sem necessitar utilizar todos os valores da amostra, ou seja, em nosso estudo permitiu fazer o teste estatístico com os valores obtidos nos mapas médios. Nós utilizamos o teste t de Student com duas caudas e intervalo de confiança de 95% para comparar separadamente o valor representativo de RL e TTM dos mapas médios de dois grupos, de maneira similar a realizada no estudo de VBM, ou seja, comparando pacientes com SK e ME com o grupo controle, pacientes com SK sem ME com o grupo controle e pacientes com e sem ME.

4 RESULTADOS

4.1 Dados Clínicos e Laboratoriais

Todos os vinte e um pacientes estudados são do sexo masculino, com idade média de trinta e oito anos, variando de onze a sessenta anos.

Todos os pacientes foram submetidos à avaliação clínica e laboratorial completa (VERSIANI et al., 2007), incluindo a pesquisa de história familiar da doença e as dosagens dos hormônios sexuais, como o LH e a testosterona, para confirmar o hipogonadismo hipogonadotrófico (Tabela 1). A ultrassonografia de vias urinárias também foi realizada em dezenove dos vinte e um pacientes, em quatorze o resultado foi normal, enquanto em três indivíduos foi observada agenesia renal unilateral, hipoplasia renal unilateral foi identificada em um paciente e em outro foi encontrada ainda criptorquidia unilateral ao estudo abdominal (Tabela 1).

Tabela 1- Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com Síndrome de Kallmann.

Pacientes	Idade	Modo de Herança	LH (RIA ng/ml ^a ou IFMA mUI/ml ^b)	T (ng/dl)	US urinário
Sem ME					
1	42	Familiar	15,3 ^a	51,8	Normal
2	37	Esporádica	10,3 ^a	31	Normal
3	39	Esporádica	<7,8 ^a	<30	Normal
4	38	Esporádica	18,6 ^a	17,5	Normal
5	40	Familiar	<7,8 ^a	<30	Normal
6	11	Esporádica	<3,9 ^a	<10	Normal
7	30	Familiar	0,7 ^b	53,7	Normal
8	27	Esporádica	<7,8 ^a	12,9	Normal
9	39	ND	<0,24 ^a	29,3	Normal
10	20	ND	3,4 ^b	195,2	Normal
11	14	Esporádica	0,3 ^b	<10	Normal
12	18	ND	12,3 ^a	33,2	Normal
Com ME					
13	43	Esporádica	10,6 ^a	181	Normal
14	37	Familiar	<7,8 ^a	<30	Normal
15	41	Familiar	<7,8 ^a	15,1	Agenesia renal direita
16	50	Familiar	10,3 ^a	38,1	Agenesia renal esquerda
17	39	Esporádica	1,5 ^b	128	Criptorquidia direita
18	60	Esporádica	<7,8 ^a	37	Hipoplasia renal direita
19	37	Esporádica	1,2 ^b	228,5	ND
20	13	Familiar	0,2 ^b	22,5	Agenesia renal direita
21	26	ND	8,5 ^a	<10	ND

ME: movimentos em espelho; ND: não disponível; RIA: radioimunoensaio; IFMA: imunofluorescência

O teste específico para avaliação da função olfatória, o “Smell Identification Test”, foi realizado em vinte pacientes, sendo que um paciente não conseguiu realizar o teste devido ao quadro de deficiência cognitiva, mas a queixa clínica de anosmia foi confirmada pelos pais. Baseado no escore fornecido pelo fabricante, o teste indicou anosmia em quatorze pacientes, com escore menor ou igual a 19 pontos (média de 11 ± 3) e hiposmia moderada em seis, com escore menor que 30 pontos (média de 27 ± 1) (Tabela 2). A presença de ME, avaliada nos vinte e um pacientes, foi observada e confirmada pelo teste clínico como significativa em nove indivíduos (Tabela 2).

Como já citado, a análise molecular completa dos pacientes foi tema de dissertação e conteúdo de um artigo científico escrito previamente (VERSIANI et al., 2007). Mutações no gene *KALI* foram encontradas em 4 pacientes, no gene *FGFR1* em três pacientes e em um paciente encontramos mutação no gene *PROKR2* (TRARBACH et al., 2006; ABREU et al., 2008) (Tabela 2).

Tabela 2- Características molecular, olfativa, neurológica e radiológica dos pacientes com Síndrome de Kallmann.

Pacientes	Estudo Molecular	Teste olfativo	Teste de ME		Rinencéfalo (RM)			
		(escore)	E→D	D→E	BD	BE	SD	SE
Sem ME								
1	FGFR-1: P722S	Hiposmia (28)	2	1	1+	1+	N	N
2	Normal	Anosmia (12)	0	0	3+	4+	1+	3+
3	FGFR-1: L245P	Hiposmia (29)	1	1	1+	1+	N	N
4	Normal	Anosmia (8)	0	0	4+	4+	3+	3+
5	Normal	Hiposmia (28)	0	0	N	N	N	N
6	PROKR2: p.Y140X	Anosmia (9)	0	0	4+	4+	3+	3+
7	Normal	Anosmia (15)	1	1	4+	4+	4+	4+
8	Normal	Anosmia (16)	2	1	4+	4+	N	3+
9	ND	Anosmia(14)	0	0	4+	4+	2+	3+
10	KAL1: N304S	Hiposmia (27)	0	0	N	N	N	N
11	Normal	Anosmia (10)	2	2	4+	4+	4+	4+
12	ND	ND	2	2	3+	4+	2+	2+
Com ME								
13	Normal	Anosmia (13)	4	2	4+	4+	3+	4+
14	FGFR-1: P722S	Hiposmia (28)	5	4	3+	3+	N	1+
15	KAL1: c.1655_1668del	Anosmia (12)	6	7	4+	4+	4+	4+
16	KAL1 : c.1655_1668del	Anosmia (14)	6	5	4+	4+	4+	4+
17	Normal	Anosmia (9)	1	3	4+	4+	4+	4+
18	Normal	Anosmia (11)	3	2	4+	1+	3+	2+
19	Normal	Hiposmia (26)	0	3	N	N	N	N
20	Normal	Anosmia (6)	0	3	4+	4+	4+	4+
21	KAL11: S478X	Anosmia (10)	4	4	4+	4+	4+	4+

E→D (D→E): esquerda → direita (direita → esquerda) movimento voluntário da mão; BD (BE): bulbo direito (esquerdo); SD (SE): sulco direito (esquerdo); gradação dos movimentos em espelho (ME): 0- ausente, 1-2: leve, 3-4: moderado, 5-6: acentuado, 7-8: grave; RM: N: normal, + a 3+: hipoplasia leve a acentuada, 4+: aplasia; ND: não disponível.

4.2 Bulbos e Sulcos Olfatórios

O grupo controle para os estudos de RM foi formado por dezesseis voluntários saudáveis do sexo masculino, com idade média de 34 anos, variando de 22 a 50 anos.

Inicialmente, a avaliação subjetiva do rinencéfalo mostrou aplasia ou hipoplasia dos bulbos e sulcos olfatórios em dezoito dos vinte e um pacientes, como descrito na tabela 2. Já para os pacientes controles as estruturas do rinencéfalo foram classificadas como normais em todos, sem exceção (Figura 4). Dentre os pacientes com SK, três tiveram exame de imagem considerado normal, apresentando bulbos e sulcos olfatórios de aspecto semelhante aos controles, porém no teste olfativo estes pacientes apresentaram hiposmia moderada, e por isso foram incluídos no estudo.

O estudo quantitativo dos sulcos e bulbos olfatórios permitiu determinar os valores médios de referência no grupo controle, com todos os voluntários apresentando bulbos e sulcos olfatórios normais e simétricos (Figura 5). Os três pacientes com SK considerados normais na avaliação subjetiva também apresentaram medidas dos sulcos e bulbos olfatórios semelhantes as do grupo controle. Nos pacientes com SK foram encontrados quinze bulbos direitos e quinze bulbos esquerdos aplásicos, ou seja, imensuráveis, assim como aplasia de oito sulcos direitos e oito sulcos esquerdos. (Tabela 3).

Figura 4 – Imagens de ressonância magnética de um voluntário do grupo controle (A, B, C) e de um paciente com Síndrome de Kallmann (D, E, F). No voluntário identificam-se os bulbos olfatórios normais (setas curtas em A) e os sulcos olfatórios com comprimento e profundidade normais (setas longas em B e C). No paciente com Síndrome de Kallmann não se identifica os bulbos olfatórios e os sulcos olfatórios não são normais, sendo hipoplásico a direita e aplásico a esquerda.

Figura 5 – Imagens de ressonância magnética do rinencéfalo de um voluntário do grupo controle, utilizadas para a avaliação quantitativa. As medidas foram feitas com o programa ImageJ, incluindo o volume dos bulbos olfatórios (A), comprimento (B) e profundidade (C) dos sulcos olfatórios.

Tabela 3 – Volume (mm³) dos bulbos olfatórios e medidas (mm) dos sulcos olfatórios dos pacientes com Síndrome de Kallmann.

Pacientes	Volume BD	Volume BE	Comprimento SD	Comprimento SE	Profundidade SD	Profundidade SE
1	52,1	60,7	42,6	38,7	9,3	8,6
2	0	0	32,5	18,2	7,3	4,6
3	37,6	73,5	32,7	33,2	7,3	6,1
4	0	0	0	0	0	0
5	79,3	75,8	37,2	40,7	5,8	7,7
6	0	0	0	0	2	1,9
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	32,2	13,2	7,5	4,3
9	0	0	23,1	0	3,5	0
10	72,4	64,6	40,1	43,6	8,3	7,1
11	0	0	21,1	10,1	3,8	0
12	0	0	17	18,9	1,5	3,2
13	0	0	24,1	17,9	3,1	1,7
14	24,9	0	36	29,9	6	3,7
15	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	8,2	0	4,9
18	0	43,4	8,7	36,1	7,4	6,5
19	73,5	71,5	41,6	39,2	8,4	8,6
20	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0
Controles (X ± DP)	66,8 ± 7,3	71,7 ± 7,2	37,5 ± 3,2	37,4 ± 2,6	8,2 ± 1,2	7,7 ± 0,7

BD (BE): bulbo olfatório direito (esquerdo); SD (SE): sulco olfatório direito (esquerdo).

Encontramos ainda três bulbos direitos e dois bulbos esquerdos hipoplásicos, assim como oito sulcos direitos e oito sulcos esquerdos. Os sulcos hipoplásicos apresentaram comprimento médio a direita de 23,9 mm e a esquerda de 18,7 mm, enquanto a profundidade média foi a direita de 4,1 mm e a esquerda de 3,3 mm. Já a volumetria dos bulbos hipoplásicos mostrou a direita média de 38,2 mm³ e a esquerda de 52,1 mm³. Desta maneira,

em dezesseis pacientes encontramos aplasia de bulbo olfatório, bilateral em quatorze, e os sulcos olfatórios destes pacientes apresentaram diferentes graus de hipoplasia. Dois pacientes com hiposmia moderada apresentaram um ou ambos bulbos hipoplásicos, completando assim os dezoito pacientes com alteração do rinencéfalo identificada na RM, qualitativa e quantitativamente. O paciente com hiposmia subjetiva possui bulbos olfatórios aplásicos.

Realizamos também a comparação das medidas de profundidade entre os sulcos olfatórios direito e esquerdo, que não foram estatisticamente diferentes, tanto nos pacientes (p valor de 0,32) quanto nos controles (p valor de 0,23).

Dezessete dos vinte pacientes com teste olfativo alterado apresentaram também alteração nas medidas dos bulbos e sulcos olfatórios, com um índice de concordância geral de Kappa de 0,553 ($p < 0,001$, IC 95% de 0,251 a 0,855), significando uma concordância moderada. Mas ao realizar uma análise individualizada, considerando a concordância entre a presença de aplasia detectada na RM e anosmia apontada no teste olfativo, encontramos um índice Kappa de 0,877 ($p < 0,001$), significando uma concordância quase perfeita (Landis et al., 1977).

4.3 VBM

As tabelas 4 e 5 mostram todas as regiões de aumento e redução de volume de SC e SB, respectivamente, como determinadas pelo VBM otimizado realizado pelo programa SPM2, quando comparados separadamente os grupos previamente estabelecidos.

O programa apresenta os resultados identificando as regiões com alteração significativa no sistema de coordenadas MNI, com posições nos eixos x, y e z. Para cada região são dados o tamanho do cluster em número de voxels, os valores de p corrigido e não corrigido para o cluster, os valores de p corrigido e não corrigido, assim como o T e Z escore para o voxel mais significativo do cluster. Como já descrito, as coordenadas foram

convertidas para o espaço Talairach e então identificadas as regiões anatômicas que são apresentadas nas tabelas, que apresentam ainda o valor de Z score do voxel mais significativo, considerado como valor de melhor significância diagnóstica para a discussão dos resultados na maior parte dos estudos de VBM (ISHII et al., 2005).

4.3.1 Substância Cinzenta

Considerando nossas hipóteses *a priori*, algumas áreas de alteração de volume da SC foram encontradas. Quando separadamente comparados com o grupo controle, os grupos SK com ME e SK sem ME apresentaram diferentes áreas de aumento de volume. No grupo com ME, duas regiões alteradas foram encontradas: uma no giro pré-central esquerdo, área de Brodmann 4, e outra no giro pós-central esquerdo, área de Brodmann 3. Na comparação do grupo sem ME com o grupo controle o estudo mostrou outras duas regiões diferentes com aumento de volume, uma no lobo frontal esquerdo, área de Brodmann 6, e outra no giro pré-central direito, área de Brodmann 4. Na comparação direta entre os grupos com e sem ME não foram demonstradas áreas de diferença significativa de volume na SC. Todas as outras áreas de alteração de volume de SC, mostradas na tabela 4, não relacionadas às nossas hipóteses *a priori*, não sobreviveram a TFD para correção para múltiplas comparações, com um limiar de $p < 0,05$, portanto, como representativas de achados inesperados, não foram consideradas significantes (Tabela 4).

Tabela 4 – Análise da substância cinzenta pelo VBM, comparando os pacientes com Síndrome de Kallmann (SK), com e sem movimentos em espelho (ME) e os controles.

Grupos	Localização anatômica	Coordenadas MNI			Z-escore do voxel
		x	y	z	
SK (todos) vs	↑ Giro pré-central esquerdo	-16	-22	62	3.49
Controles	↑ Giro pré-central direito	34	-26	56	3.42
	↑ Giro pré-central esquerdo	-62	-6	44	3.39
	↑ Giro occipital médio esquerdo*	-32	-86	44	3.6
	↓ Giro frontal médio esquerdo*	-24	22	40	3.67
	↓ Giro parahipocampal direito *	36	-24	-24	3.15
	↓ Giro parahipocampal direito*	30	-24	-16	3.27
SK com ME vs	↑ Giro pré-central esquerdo	-16	-28	80	4.26
Controles	↑ Giro pós-central esquerdo	-30	-32	58	4.08
	↑ Giro reto direito *	4	14	-28	3.53
	↓ Giro temporal médio esquerdo *	-52	-18	-16	4.2
SK sem ME vs	↑ Giro pré-central esquerdo	-62	-4	46	3.95
Controles	↑ Giro temporal médio esquerdo *	-46	-80	28	3.76
	↑ Giro occipital inferior esquerdo *	-44	-88	-10	3.69
	↑ Giro supramarginal esquerdo *	-56	-54	42	3.65
	↑ Giro occipital médio esquerdo *	-32	-86	14	3.44
	↑ Giro occipital médio esquerdo *	-30	-94	32	3.42
	↑ Giro occipital inferior direito *	52	-82	-10	3.4
	↑ Giro pré-central direito	32	-24	56	3.36
	↓ Giro parahipocampal direito *	38	-20	-26	3.44
	↓ Giro parahipocampal esquerdo *	-28	-22	-20	3.4
SK com ME vs					
SK sem ME	Nenhuma área identificada				

↑: aumento de volume; ↓: redução de volume; vs: versus. MNI: Montreal Neurological Institute. Limiar de $Z > 3,09$, correspondendo a um $p < 0,001$. * Áreas não relacionadas às nossas hipóteses *a priori* e que não sobreviveram à correção para múltiplas comparações ($p < 0.05$).

As figuras 6 e 7 mostram todas as regiões do cérebro de aumento e redução de volume da SC nos pacientes com e sem ME, respectivamente, quando comparados separadamente com o grupo controle.

Figura 6 – Representação do resultado do VBM nos pacientes com Síndrome de Kallmann e movimentos em espelho, quando comparados ao grupo controle. As regiões de aumento (laranja/vermelho) e redução (azul) volumétrica da substancia cinzenta estão superpostas em imagens selecionadas, normalizadas no espaço, de um indivíduo controle. Considerando nossas hipóteses *a priori*, as áreas de aumento de volume foram encontradas no córtex motor primário e somatosensorial primário a esquerda.

Figura 7 – Representação do resultado do VBM nos pacientes com Síndrome de Kallmann sem movimentos em espelho, quando comparados ao grupo controle. As regiões de aumento (laranja/vermelho) e redução (azul) volumétrica da substancia cinzenta estão superpostas em imagens selecionadas, normalizadas no espaço, de um indivíduo controle. Considerando nossas hipóteses *a priori*, as áreas de aumento de volume foram encontradas no lobo frontal esquerdo e no sulco pré-central direito.

4.3.2 Substância Branca

O estudo de VBM mostrou varias áreas de alteração de volume da substância branca contendo mais de 25 voxels com valor de Z maior que 3,09, porém nenhuma área sobreviveu a TFD para múltiplas comparações com $p < 0,05$, e nenhuma área foi demonstrada envolvendo o corpo caloso, cápsula interna, mesencéfalo, ponte ou medula, ou seja, regiões

relacionadas às nossas hipóteses *a priori*. As principais alterações demonstradas pelo programa SPM2 corresponderam a áreas de redução da SB nos lobos frontais dos pacientes do grupo sem ME, quando comparadas ao grupo controle. Na comparação dos grupos com e sem ME, nenhuma área de alteração significativa de volume foi demonstrada (Tabela 5).

Tabela 5 – Análise da substância branca pelo VBM, comparando os pacientes com Síndrome de Kallmann (SK), com e sem movimentos em espelho (ME) e os controles.

Grupos	Localização anatômica	Coordenadas MNI			Z-escore voxel
		x	y	z	
SK (todos) vs	↑ Cúneo esquerdo	-30	-82	36	4.07
Controles	↑ Giro subcaloso direito	10	16	-16	3.69
	↓ Giro frontal superior esquerdo	-16	28	50	4.23
	↓ Giro frontal médio direito	12	28	50	3.89
	↓ Lobo frontal esquerdo subgiral	-34	22	32	3.61
	↓ Insula esquerda	-44	2	12	3.81
SK com ME vs	↓ Giro pós-central direito	40	-34	70	4.11
Controles	↓ Giro parahipocampal esquerdo	-22	-20	-24	3.88
	↓ Giro fusiforme direito	54	-6	-28	3.51
SK sem ME vs	↑ Cúneo esquerdo	-32	-84	36	4.1
Controles	↑ Giro subcaloso direito	10	16	-16	3.8
	↓ Giro frontal médio direito	12	28	50	4.37
	↓ Giro frontal superior esquerdo	-14	32	50	4.15
	↓ Amígdala esquerda	-24	-2	-16	3.99
	↓ Lobo frontal esquerdo subgiral	-34	22	32	3.59
	↓ Giro frontal médio esquerdo	-38	-2	48	3.42
	↓ Insula esquerda	-44	2	12	4.16
SK com ME vs					
SK sem ME	↑ Giro parahipocampal esquerdo	-33	-16	-24	3.95

↑: aumento de volume; ↓: redução de volume. MNI: Montreal Neurological Institute. Limiar de $Z > 3,09$, correspondendo a um $p < 0,001$. Nenhuma área está relacionada às nossas hipóteses *a priori* ou sobreviveu à correção para múltiplas comparações ($p < 0,05$).

4.4 Área do Corpo Caloso na Linha Média

Não encontramos diferenças significativas na área do corpo caloso na linha média (Figura 8) quando aplicado individualmente um teste t para cada comparação entre os grupos, considerando um intervalo de confiança de 95% (p valor menor que 0,05). Os resultados dos testes t foram: grupo SK (todos) e controle, $p = 0,20$; grupo SK com ME e controle, $p = 0,87$; grupo SK sem ME e controle, $p = 0,06$; grupo SK sem e com ME, $p = 0,27$ (Tabela 6).

Figura 8 – Imagens sagitais gradiente eco ponderadas em T1 de dois pacientes com Síndrome de Kallmann. O programa ImageJ foi utilizado para cálculo da área do corpo caloso na linha média, representada em B.

Tabela 6 – Área do corpo caloso na linha média (mm²), valores individuais e a média, dos pacientes com Síndrome de Kallmann (SK), com e sem movimentos em espelho (ME) e os controles.

Controles	SK com ME	SK sem ME
706	481	513
695	638	531
662	667	588
638	620	568
674	751	603
653	556	580
655	761	575
573	576	596
656	677	679
667		679
567		689
659		557
652		
716		
620		
478		
641,9 ± 14,8	636,3 ± 30,2	596,5 ± 16,6

4.5 Relaxometria e Taxa de Transferência de Magnetização

As tabelas 7 e 8 mostram os valores médios de RL e TTM de todas as regiões de interesse estudadas, após delimitação de ao menos três ROI em cada mapa médio dos grupos de pacientes e do grupo controle.

Tabela 7 - Valores ($X \pm DP$) da relaxometria (RL) das regiões de interesse do grupo controle e dos pacientes com Síndrome de Kallmann (SK), com e sem movimentos em espelho (ME).

Região de interesse	Grupo Controle		SK com ME		SK sem ME	
RL	(n = 16)		(n = 9)		(n = 12)	
SB pré-central D	126,28	$\pm 4,82$	131,77	$\pm 12,35$	125,16	$\pm 11,59$
SB pré-central E	130,52	$\pm 15,40$	136,29	$\pm 9,98$	128,93	$\pm 11,03$
SB lobo frontal D	103,90	$\pm 0,70$	106,65	$\pm 3,41$	105,60	$\pm 1,59$
SB lobo frontal E	106,58	$\pm 1,80$	108,04	$\pm 1,02$	104,77	$\pm 3,60$
Joelho corpo caloso D	99,86	$\pm 12,09$	102,43	$\pm 16,13$	97,88	$\pm 11,70$
Joelho corpo caloso E	98,90	$\pm 7,29$	101,24	$\pm 16,51$	101,84	$\pm 14,87$
Esplênio corpo caloso D	117,04	$\pm 11,41$	122,82	$\pm 6,89$	119,47	$\pm 4,50$
Esplênio corpo caloso E	116,69	$\pm 8,62$	122,65	$\pm 7,01$	116,90	$\pm 2,49$
Cápsula interna perna anterior D	102,59	$\pm 2,50$	107,26	$\pm 4,76$	104,84	$\pm 4,36$
Cápsula interna perna anterior E	103,56	$\pm 3,99$	107,40	$\pm 7,08$	106,01	$\pm 5,82$
Cápsula interna perna posterior D	89,68	$\pm 2,60$	98,28	$\pm 8,85$	90,00	$\pm 4,51$
Cápsula interna perna posterior E	89,17	$\pm 2,34$	93,11	$\pm 5,13$	92,63	$\pm 4,22$
Pedúnculo cerebral D	104,20	$\pm 12,49$	105,03	$\pm 5,07$	107,50	$\pm 6,98$
Pedúnculo cerebral E	103,62	$\pm 8,66$	103,55	$\pm 12,19$	104,80	$\pm 5,99$
Porção basilar da ponte D	118,72	$\pm 6,92$	118,31	$\pm 7,20$	118,10	$\pm 11,94$
Porção basilar da ponte E	119,48	$\pm 3,42$	120,83	$\pm 8,51$	118,88	$\pm 7,43$
Decussação pirâmides bulbares	139,91	$\pm 19,81$	136,63	$\pm 9,39$	135,75	$\pm 10,05$
Pedúnculo cerebelar médio D	135,79	$\pm 28,22$	132,14	$\pm 18,07$	130,98	$\pm 91,11$
Pedúnculo cerebelar médio E	131,25	$\pm 19,69$	131,18	$\pm 24,74$	127,58	$\pm 22,72$

SB: substância branca; D: direito, E: esquerdo; n: tamanho da amostra

Tabela 8 – Valores ($X \pm DP$) da taxa de transferência de magnetização (TTM) das regiões de interesse do grupo controle e dos pacientes com Síndrome de Kallmann (SK), com e sem movimentos em espelho (ME).

Região de interesse	Grupo Controle		SK com ME		SK sem ME	
TTM	(n = 16)		(n = 9)		(n = 12)	
SB pré-central D	28,47	$\pm 0,54$	26,95	$\pm 0,25$	28,32	$\pm 0,20$
SB pré-central E	28,58	$\pm 0,10$	27,87	$\pm 0,30$	28,08	$\pm 0,26$
SB lobo frontal D	28,87	$\pm 0,10$	27,67	$\pm 0,21$	28,30	$\pm 0,07$
SB lobo frontal E	29,43	$\pm 0,06$	28,22	$\pm 0,21$	29,25	$\pm 0,18$
Joelho corpo caloso D	28,91	$\pm 0,66$	28,94	$\pm 1,73$	29,50	$\pm 0,80$
Joelho corpo caloso E	30,01	$\pm 0,44$	28,99	$\pm 1,27$	29,97	$\pm 0,36$
Esplênio corpo caloso D	29,06	$\pm 0,65$	27,36	$\pm 0,70$	29,23	$\pm 0,16$
Esplênio corpo caloso E	29,48	$\pm 0,50$	27,62	$\pm 0,40$	29,72	$\pm 0,49$
Cápsula interna perna anterior D	25,50	$\pm 1,43$	25,16	$\pm 0,88$	25,25	$\pm 0,84$
Cápsula interna perna anterior E	25,70	$\pm 2,26$	24,92	$\pm 1,52$	26,35	$\pm 1,90$
Cápsula interna perna posterior D	29,32	$\pm 0,71$	27,54	$\pm 0,66$	29,20	$\pm 0,99$
Cápsula interna perna posterior E	29,43	$\pm 0,72$	28,43	$\pm 0,61$	28,32	$\pm 0,52$
Pedúnculo cerebral D	29,03	$\pm 0,48$	26,81	$\pm 0,74$	27,85	$\pm 0,38$
Pedúnculo cerebral E	29,34	$\pm 0,87$	28,24	$\pm 1,25$	27,24	$\pm 0,90$
Porção basilar da ponte D	29,94	$\pm 0,65$	29,50	$\pm 0,50$	28,57	$\pm 1,02$
Porção basilar da ponte E	29,71	$\pm 0,55$	28,99	$\pm 0,91$	28,22	$\pm 1,11$
Decussação pirâmides bulbares	27,65	$\pm 0,43$	28,39	$\pm 0,63$	28,19	$\pm 0,33$
Pedúnculo cerebelar médio D	30,57	$\pm 0,45$	29,42	$\pm 0,94$	29,63	$\pm 1,60$
Pedúnculo cerebelar médio E	31,02	$\pm 0,25$	30,43	$\pm 0,47$	29,22	$\pm 0,76$

SB: substância branca; D: direito, E: esquerdo; n: tamanho da amostra

O estudo de RL identificou algumas poucas áreas com alteração significativa após a delimitação das regiões de interesse na SB dos mapas médios criados para os pacientes e o grupo controle (Figura 9). Quando comparados os pacientes com ME e os controles, o método apontou em três regiões aumento do tempo de relaxação T2, enquanto na comparação dos pacientes sem ME com os controles outras duas regiões diferentes apresentaram aumento do tempo T2. Já a comparação entre os grupos de pacientes, com e sem ME, também mostrou

algumas regiões com diferenças significativas, consistindo em três regiões com tempo de relaxação T2 aumentado nos pacientes com ME (Tabela 9).

Figura 9 – Imagens de mapas médios de relaxometria do grupo controle. Os diferentes cortes do cérebro exemplificam algumas das regiões de interesse demarcadas para análise quantitativa da substância branca, incluindo na decussação das pirâmides bulbares (A), perna posterior da cápsula interna (B) e lobo frontal a direita (C).

A análise da TTM nos mapas médios após a delimitação das regiões de interesse na SB (Figura 10), diferentemente da RL, mostrou múltiplas áreas com diferença significativa quando comparados os pacientes e o grupo controle (Tabela 10). Evidenciou-se redução da TTM em várias das regiões de interesse delimitadas na SB dos pacientes com SK quando comparados ao grupo controle, sendo em maior número no grupo com ME, envolvendo algumas regiões diferentes nos pacientes com e sem ME e, na comparação direta entre os dois grupos de pacientes, regiões de TTM menor nos pacientes com ME em relação aos pacientes sem ME. Na comparação do grupo com ME e grupo controle encontramos valores menores de TTM nas regiões de projeção do trato corticoespinhal bilateralmente, incluindo a SB pré-central, perna posterior da cápsula interna e pedúnculo cerebral, porém também verificamos TTM menor nos lobos frontais e no corpo caloso posteriormente (esplênio). Já o grupo sem ME apresentou valores menores de TTM em menos regiões, inclusive em projeção do trato

corticoespinhal, porém incluindo ainda regiões diferentes, como na porção basilar da ponte bilateralmente. Neste grupo não houve diferença significativa no corpo caloso. A comparação entre os grupos de pacientes mostrou que, mesmo em áreas comuns de TTM reduzida em relação ao grupo controle, o grupo com ME apresentou valores menores que o grupo sem ME, incluindo o lobo frontal bilateral e a perna posterior da cápsula interna e o pedúnculo cerebral apenas a direita.

Figura 10 – Imagens de mapas médios de transferência de magnetização do grupo controle. Os diferentes cortes do encéfalo exemplificam algumas das regiões de interesse demarcadas para análise quantitativa da substância branca, incluindo no joelho do corpo caloso (A), pedúnculo cerebral (B) e pedúnculo cerebelar a direita (C).

Tabela 9 – Regiões de interesse alteradas na comparação entre as médias de relaxometria dos pacientes com Síndrome de Kallmann (SK) com e sem movimentos em espelho (ME) e o grupo controle.

Grupos	Região alterada	p valor do teste t
SK com ME	↑ SB lobo frontal E	0,017
vs		
Controles	↑ Cápsula interna perna anterior D	0,021
	↑ Cápsula interna perna posterior D	0,022
<hr/>		
SK sem ME	↑ SB lobo frontal D	0,004
vs		
Controles	↑ Cápsula interna perna posterior E	0,021
<hr/>		
SK com ME	↑SB lobo frontal E	0,01
vs		
SK sem ME	↑Esplênio corpo caloso E	0,043
	↑Cápsula interna perna posterior D	0,026

SB: substância branca; ↑ aumento e ↓ redução; D: direito, E: esquerdo.

Em apenas uma região encontramos um aumento da TTM nos pacientes com SK, tanto na comparação entre os pacientes com ME com o grupo controle quanto nos pacientes sem ME. Esta região foi a decussação das pirâmides bulbares, que porém não apresentou TTM diferente quando comparados diretamente os pacientes com e sem ME (Tabela 10).

Tabela 10 – Regiões de interesse alteradas na comparação entre as médias da taxa de transferência de magnetização dos pacientes com Síndrome de Kallmann (SK) com e sem movimentos em espelho (ME) e o grupo controle.

Grupos	Região alterada	p valor do teste t
SK com ME vs Controles	↓ SB pré-central D	0,0001
	↓ SB pré-central E	0,0001
	↓ SB lobo frontal D	0,0001
	↓ SB lobo frontal E	0,0001
	↓ Esplênio corpo caloso D	0,0001
	↓ Esplênio corpo caloso E	0,0001
	↓ Cápsula interna perna posterior D	0,0001
	↓ Cápsula interna perna posterior E	0,002
	↓ Pedúnculo cerebral D	0,0001
	↓ Pedúnculo cerebral E	0,037
	↑ Decussação pirâmides bulbares	0,009
SK sem ME vs Controles	↓ SB pré-central E	0,0001
	↓ SB lobo frontal D	0,0001
	↓ SB lobo frontal E	0,006
	↓ Cápsula interna perna posterior E	0,0001
	↓ Pedúnculo cerebral D	0,0001
	↓ Pedúnculo cerebral E	0,0001
	↓ Porção basilar da ponte D	0,001
	↓ Porção basilar da ponte E	0,001
	↑ Decussação pirâmides bulbares	0,001
SK com ME vs SK sem ME	↓ SB pré-central D	0,0001
	↓ SB lobo frontal D	0,0001
	↓ SB lobo frontal E	0,0001
	↓ Esplênio corpo caloso D	0,0001
	↓ Esplênio corpo caloso E	0,0001
	↓ Cápsula interna perna posterior D	0,001
	↓ Pedúnculo cerebral D	0,003

SB: substância branca; ↑ aumento e ↓ redução; D: direito, E: esquerdo.

5 DISCUSSÃO

5.1 Avaliação Clínica, Laboratorial e do Rinencéfalo

Neste estudo avaliamos vinte e um pacientes com SK e todos apresentaram alteração no teste olfativo, sendo mais comum a presença de anosmia, encontrada em quatorze indivíduos. Três pacientes com hiposmia moderada apresentaram rinencéfalo normal ao exame de RM, tanto na avaliação subjetiva quanto após a mensuração dos sulcos e bulbos olfatórios, o que não exclui o diagnóstico de SK (QUINTON et al., 1996). Nove (43%) pacientes apresentaram ME ao teste clínico e dentre estes sete possuem padrão de herança genética ligada ao X. Mutações genéticas foram encontradas em oito (36%) pacientes, incluindo mutações novas (TRARBACH et al., 2006; VERSIANI et al., 2007; ABREU et al., 2008). Estes dados são semelhantes aos relatados por outros autores, em que aproximadamente um terço dos casos familiares de SK e metade dos casos com herança ligada ao X apresentam mutações no gene *KALI* e menos frequentemente em outros genes (PITTELOUD et al., 2006; MATSUMOTO et al., 2006; TRARBACH et al., 2006). Estudos recentes demonstraram a presença de novas mutações envolvendo novos genes, assim como mutações digênicas agindo de forma sinérgica na determinação fenotípica (TRARBACH et al., 2006; PITTELOUD et al., 2007; ABREU et al., 2008). Dentre os dezenove pacientes que realizaram ultrassonografia, anormalidade do trato genitourinário foi identificada em cinco (26%), todos pertencentes ao grupo com ME, com dois pacientes apresentando a mesma mutação do gene *KALI*, representando assim o fenótipo clássico da SK ligada ao X, com hipogonadismo hipogonadotrófico, anosmia, ME e displasia renal (SATO et al., 2004).

Dos vinte e um pacientes com SK, dezoito (85%) apresentaram alterações das estruturas olfatórias, com graus variáveis de acometimento. Estas alterações foram detectadas na avaliação subjetiva e confirmadas após a avaliação quantitativa. Outros estudos mostraram alteração do rinencéfalo acometendo entre 76 e 100% dos pacientes com SK (VOGL et al.,

1994; QUINTON et al., 1996; MADAN et al., 2004). Estes autores concluíram que a presença ou ausência de bulbo olfatório nas imagens coronais feitas por RM seria o critério mais significativo para distinção entre os pacientes com SK e com hipogonadismo hipogonadotrófico idiopático, sugerindo que esta anormalidade é muito específica para o diagnóstico de SK. Porém, como já citado, o exame pode ser normal, e há relatos de pacientes com SK, apresentando inclusive mutações genéticas características, em que o exame de RM não mostrou alteração dos sulcos e bulbos olfatórios (SATO et al., 2004). Em nosso estudo, um dos pacientes com exame de RM normal apresentou mutação do gene KAL1 (paciente número 10, Tabela 2).

Nosso estudo demonstrou que a aplasia dos bulbos e sulcos olfatórios foi o achado mais comum na SK, estando em acordo com os estudos prévios (MADAN et al., 2004; SATO et al., 2004). Poucos estudos realizaram avaliação objetiva das estruturas do rinencéfalo. Em trabalho de YOUSEM et al. (1996), os autores encontraram aplasia ou hipoplasia dos bulbos e sulcos olfatórios em todos os pacientes estudados, com a volumetria dos bulbos olfatórios hipoplásicos mostrando volume médio de 18,6 mm³ a direita e 11,6 mm³ a esquerda. Em outro trabalho mais recente os autores encontraram volume médio dos bulbos olfatórios hipoplásicos de 19,4 mm³, variando de 14,7 a 26,8 mm³, enquanto os sulcos hipoplásicos apresentaram profundidade a direita de 6,4 ± 3,4 mm e a esquerda de 5,0 ± 3,0 mm. Estes autores encontraram ainda sulcos olfatórios mais profundos a direita, particularmente nos pacientes com anosmia, e sugeriram que o olfato deve ser processado principalmente no hemisfério cerebral direito (ABOLMAALI et al., 2002). Apesar de confirmar a diferença volumétrica dos bulbos considerados hipoplásicos na avaliação subjetiva, em relação ao grupo controle, nossas medidas de volumetria dos bulbos olfatórios foram pouco diferentes de estudos prévios, tanto a média dos controles quanto dos bulbos hipoplásicos, enquanto as medidas dos sulcos foram mais semelhantes, o que pode ser explicado pelas diferentes

sequências utilizadas e diferentes técnicas aplicadas para cálculo do volume, procedimento mais complexo e demorado que a mensuração bidimensional dos sulcos. Apesar de encontrarmos diferenças nas medidas de profundidade entre os sulcos olfatórios direito e esquerdo, estas diferenças não foram estatisticamente significativas, tanto nos pacientes quanto nos controles, portanto, não podemos corroborar a hipótese de predominância direita no processamento olfatório, o que também havia sido sugerido em outro estudo com modelo animal prévio (HEINE et al., 1986).

Os estudos anteriores utilizaram sequências volumétricas ponderadas em T1 para mensuração das estruturas do rinencéfalo, enquanto em nosso estudo preferimos utilizar uma sequência com cortes finos e sem espaçamento, ponderada em T2, devido melhor resolução de contraste, o que facilita a distinção entre as estruturas neuronais e o líquido cefalorraquidiano brilhante ao redor. Atualmente já é possível inclusive obtenção de sequências volumétricas T2 com alta resolução espacial (ATLAS et al., 2008).

Em nosso estudo encontramos uma concordância moderada entre as alterações vistas na RM e o escore do teste olfativo, provavelmente por causa da presença de três pacientes com teste positivo, porém com exame de RM normal. Mas quando realizamos a análise individualizada, correlacionando a presença de distúrbio olfatório completo (anosmia) e malformação completa identificada na RM (aplasia de bulbo olfatório), encontramos uma concordância quase perfeita, comprovando a alta especificidade dos achados de RM. Demonstramos ainda que na presença de bulbos olfatórios aplásicos (imensuráveis), os sulcos olfatórios apresentaram diferentes graus de alteração, incluindo aplasia e hipoplasia, sugerindo, portanto, que a alteração dos bulbos olfatórios tem maior acurácia na avaliação de distúrbio olfatório, correlacionando com hiposmia ou anosmia.

5.2 Morfometria da Substância Branca e Cinzenta

Podemos destacar três principais achados em nosso estudo de VBM: primeiro, nenhuma área de aumento de volume da SB foi demonstrada na projeção do trato corticoespinhal nos pacientes com SK, mesmo no grupo com ME; segundo, tanto o VBM como a análise da área sagital na linha média com ROI, não mostraram diferenças no corpo caloso entre os grupos; terceiro, algumas áreas de SC, envolvendo o córtex motor, relacionadas às nossas hipóteses *a priori*, foram demonstradas estar alteradas de forma diferente em pacientes com e sem ME.

Os primeiros estudos sugeriram que uma deficiência na decussação das fibras do trato piramidal ou um mecanismo inibitório deficiente entre o córtex motor direito e esquerdo, principalmente via corpo caloso, estariam envolvidos na etiologia dos ME (DENNIS et al., 1976; CONRAD et al., 1978). Um estudo posterior sugeriu que uma associação entre a maturação incompleta do corpo caloso e a deficiência na decussação piramidal seria responsável pela persistência patológica dos ME, desta maneira mesclando as duas primeiras hipóteses (NASS et al., 1985).

Nossa análise não demonstrou região de SB com alteração significativa de volume quando comparados os grupos com e sem ME. O estudo prévio que utilizou VBM convencional para estudo da SB em pacientes com SK sugeriu a presença de hipertrofia bilateral do trato corticoespinhal no grupo com herança ligada ao X e ME, estando ainda em acordo com estudos eletrofisiológicos prévios (MAYSTON et al., 1997; KRAMS et al., 1999). Portanto, nossos resultados não reproduziram as alterações estruturais dos tratos corticoespinhais previamente descritas em pacientes com SK e ME. Possíveis explicações para os diferentes achados em relação à SB dos pacientes com SK utilizando a técnica de VBM incluem diferenças nas populações estudadas, diferenças inerentes ao método de pré-

processamento (VBM convencional versus otimizado) e a ausência de alterações estruturais refletindo alterações funcionais motoras em nossa população de pacientes estudados com SK e ME.

Não foram encontradas alterações no volume do corpo caloso. Este achado está em acordo com estudos prévios (QUINTON et al., 1996). O estudo anterior com VBM da SB de pacientes com SK mostrou hipertrofia do corpo caloso nos grupos com e sem ME, porém sem diferença significativa entre os grupos, desta maneira excluindo uma possível associação entre os ME e a alteração do corpo caloso (KRAMS et al., 1999).

Além das duas principais hipóteses correlacionando os ME com uma deficiência na decussação do trato piramidal e/ou no mecanismo inibitório transcaloso, outros estudos com pacientes com SK, utilizando diferentes técnicas, como o PET e a RM funcional, demonstraram a possível participação de outras estruturas na sua etiologia, incluindo o córtex motor primário bilateral, córtex sensorimotor e áreas corticais suplementares próximas à linha média. Além disso, outros estudos com diferentes condições clínicas como a sincinesia congênita, doença de Parkinson e infarto cerebral, propuseram a participação de mecanismos mais complexos na gênese dos ME (KRAMS et al., 1997; LEINSINGER et al., 1997; MAYER et al., 1999; KIM et al., 2003; Li et al., 2007).

Não foram demonstradas áreas com diferença de volume da SC quando comparados diretamente os pacientes com e sem ME. Os pacientes com SK e ME apresentaram duas áreas de aumento da SC adjacentes ao sulco central esquerdo, no córtex motor primário (área de Brodmann 4) e no córtex somatossensorial primário (área 3), quando comparados ao grupo controle. Esta alteração está em acordo com a hipótese de envolvimento do córtex motor dominante, relacionado às vias motoras aferentes e eferentes, na etiologia dos ME, podendo representar a presença de hipertrofia cortical como uma alteração secundária a um desarranjo do trato corticoespinhal, como uma decussação deficiente das pirâmides. Já os pacientes com

SK e sem ME, quando comparados ao grupo controle, apresentaram outras duas áreas diferentes de aumento de volume da SC, também relacionadas ao sistema motor, porém com a maior região alterada envolvendo o córtex motor suplementar (área de Brodmann 6) e a menor o córtex motor primário contra-lateral. Este achado é compatível com a participação de mecanismos mais complexos na determinação da presença ou ausência de ME em pacientes com SK. Mesmo que o VBM não tenha demonstrado diferenças de volume da SB e SC entre os grupos com SK (com e sem ME), os diferentes achados nas comparações individuais de cada grupo com o grupo controle podem ser considerados como evidência indireta de alterações estruturais do córtex cerebral dos pacientes com SK, envolvendo diferentemente os pacientes com e sem ME.

As alterações do rinencéfalo identificadas na RM de pacientes com SK já estão bem estabelecidas. Vias aferentes olfatórias, especialmente os tratos olfatórios, não somente fazem conexões com o córtex olfatório (área de Brodmann 34), mas também fazem interações com o sistema límbico, córtex piriforme, incluindo as amígdalas e o giro parahipocampal, hipotálamo lateral e o hipocampo, contribuindo para a memória e para os mecanismos de aprendizado (GREENSTEIN et al., 2000). Alterações do desenvolvimento neuropsicomotor também são descritas nos pacientes com SK, desde o trabalho original de KALMANN et al. (1944). Outros autores, posteriormente, também descreveram a associação da SK com distúrbios psiquiátricos e retardo mental (OBAYDI et al., 1992; VAGENAKIS et al., 2004). Em nosso estudo não realizamos uma avaliação psiquiátrica completa de todos os pacientes, contudo foi possível identificar três pacientes com distúrbios psiquiátricos, sendo dois com esquizofrenia e um paciente que apresentou episódio psicótico agudo. O estudo de VBM demonstrou muitas outras áreas significativamente alteradas de SB e SC para o limiar de $p = 0,001$, porém estas áreas não eram diretamente associadas às nossas hipóteses *a priori* e não sobreviveram ao teste para correção de múltiplas variáveis. Uma abordagem de estudo

diferente seria necessária para correlacionar estas áreas alteradas com a alteração olfatória ou com os distúrbios psiquiátricos e de desenvolvimento.

A técnica de VBM possui algumas limitações e, apesar de ter muitas vantagens em relação ao método tradicional com ROI, resultados falso positivos e falso negativos podem surgir das mudanças na forma e posição das estruturas, principalmente durante a etapa de normalização. O VBM otimizado é uma tentativa de minimizar este problema. Nossa amostra possui um tamanho aceitável quando considerados todos os pacientes com SK, porém para a investigação dos ME foi necessário dividir a amostra em grupos menores, o que pode reduzir o poder estatístico de nosso teste. Para evitar reduzir ainda mais o tamanho de nossa amostra, mantivemos no estudo dois pacientes com idade de 11 e 14 anos, porém o papel e a acurácia do VBM em populações não adultas ainda não estão bem documentados.

5.3 Análise Quantitativa da Substância Branca

Apesar do nosso estudo de VBM não mostrar alteração significativa de volume da SB do corpo caloso ou na projeção do trato corticoespinhal, as avaliações com RL e TTM mostraram alterações de sinal destas e outras regiões nos pacientes com SK, acometendo diferentemente os grupos com e sem ME.

A RL identifica o aumento da concentração de água nos tecidos, que no sistema nervoso central pode ser devido a diferentes causas, incluindo as inflamatórias e degenerativas. Já a TTM é capaz de identificar redução na concentração de macromoléculas, que na SB encefálica significa desmielinização, dano ou perda axonal. A redução no valor da TTM ocorre antes do aparecimento de alterações que possam ser identificadas nas imagens ponderadas em T2, sendo, portanto mais sensível na detecção de dano axonal (KIMURA et al., 1996; MCGOWAN et al., 1999; SINSON et al., 2001). Em nosso estudo demonstramos

que na projeção do trato corticoespinhal os pacientes com SK apresentaram regiões de interesse com aumento do tempo de relaxação T2 e redução da TTM, ou seja, desconsiderando a presença de processo inflamatório (edema) e sinal de perda volumétrica (gliose) durante a realização dos exames, estas alterações são compatíveis com desmielinização e/ou dano axonal, possivelmente secundário a um desarranjo congênito ou adquirido das fibras. A TTM mostrou mais áreas alteradas que a RL, o que se deve provavelmente à maior sensibilidade do método. Os pacientes com ME apresentaram maior número de regiões alteradas, e quando comparados aos pacientes sem ME, maior grau de alteração (maior tempo T2 e menor TTM). Mas, além das regiões em projeção do trato corticoespinhal, encontramos alteração em regiões de interesse nos lobos frontais de ambos os grupos, com e sem ME, tanto na RL quanto na TTM, e ainda alteração no corpo caloso apenas nos pacientes com ME.

Nossos resultados são compatíveis com a hipótese de que existe alteração da organização axonal na SB dos pacientes com SK, traduzida como áreas de desmielinização e/ou dano axonal, envolvendo diferentemente o sistema motor dos pacientes com e sem ME, tanto as vias motoras primárias (incluindo o trato corticoespinhal) quanto as vias associativas e de interligação, inclusive inibitórias (lobos frontais e corpo caloso). Desta maneira, os achados da RL e TTM são compatíveis com os estudos prévios que sugerem a associação entre uma anomalia do trato corticoespinhal e uma deficiência no mecanismo inibitório inter-hemisférico como responsáveis pela persistência patológica dos ME (NASS et al., 1985; LEISING et al., 1997; MAYER et al., 1999). Mesmo que esta alteração tenha sido interpretada como hipertrofia do trato corticoespinhal em estudo prévio de VBM (KRAMS et al., 1999), nosso estudo não somente não mostrou este aumento de volume no VBM como as técnicas de RL e a TTM não identificaram alteração de sinal compatível com aumento do número, diâmetro ou mielinização das fibras axonais.

A análise da TTM demonstrou ainda nos pacientes com SK apenas uma região de interesse com aumento de valor, em topografia da decussação das pirâmides bulbares, quando comparados separadamente ambos os grupos, com e sem ME, com o grupo controle. Este achado demonstra uma alteração nesta topografia, em que normalmente as fibras do trato corticoespinhal cruzam a linha média, diferente das demais áreas alteradas com redução da TTM. Portanto, este resultado da TTM pode representar um desarranjo primário desta região, estando em acordo com a hipótese da deficiência na decussação piramidal, podendo-se considerar ainda que as alterações das fibras a montante, superiormente (evidenciadas na RL e TTM), e do córtex motor (evidenciadas no VBM), seriam secundárias e estariam acometendo diferentemente os pacientes com e sem ME. Entretanto, seria necessário explicar como este desarranjo na decussação piramidal se traduziria em aumento da concentração de macromoléculas e consequente aumento da TTM no bulbo. Outros novos métodos de imagem poderão auxiliar na elucidação deste achado, como a tratografia por RM, técnica capaz de identificar e delinear os tratos de SB no encéfalo, esclarecendo, possivelmente em definitivo, a etiopatogenia dos ME nos pacientes com SK (ATLAS et al., 2008).

6 CONCLUSÃO

Dos vinte e um pacientes estudados com SK, dezoito (85%) apresentaram alterações das estruturas olfatórias, com graus variáveis de acometimento, identificadas na avaliação subjetiva e confirmadas após a avaliação quantitativa. Nosso estudo demonstrou que a aplasia dos bulbos e sulcos olfatórios foram os achados mais comuns na SK. A presença de aplasia de bulbo olfatório possui excelente concordância com a presença de anosmia no teste olfativo. Portanto, certificamos a alta especificidade da RM, que pode auxiliar no diagnóstico da SK em momentos oportunos, como em pacientes pré púberes em que o teste olfativo e a avaliação laboratorial do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal são mais difíceis de se realizar.

Utilizamos o VBM otimizado para investigar alterações volumétricas na SB e SC dos pacientes com SK, com características genóticas e fenóticas bem determinadas, na tentativa de auxiliar na elucidação do mecanismo responsável pelos ME, presente em parte destes pacientes. O VBM não demonstrou alterações significativas de volume da SB, mas mostrou áreas alteradas da SC envolvendo o córtex motor de maneira diferente nos pacientes com e sem ME. Estas alterações são compatíveis com uma resposta cortical hipertrófica a uma decussação deficiente do trato corticoespinhal nos pacientes com SK e ME. Ainda, as alterações da SC encontradas nos pacientes sem ME podem representar mecanismos mais complexos determinando a presença ou não do sinal em pacientes com SK.

Apesar do nosso estudo de VBM não mostrar alteração significativa de volume da SB do corpo caloso ou na projeção do trato corticoespinhal, as avaliações com RL e TTM mostraram alterações de sinal destas e outras regiões nos pacientes com SK. Estes resultados demonstram a presença de áreas de desmielinização e/ou dano axonal na SB dos pacientes com SK, envolvendo diferentemente o sistema motor dos pacientes com e sem ME. Nossos dados são compatíveis com os estudos prévios que sugerem a associação entre uma anomalia do trato corticoespinhal e uma deficiência no mecanismo inibitório inter-hemisférico como responsáveis pela persistência patológica dos ME. A análise da TTM demonstrou ainda, nos

pacientes com SK, apenas uma região de interesse com aumento de valor, em topografia da decussação das pirâmides bulbares. Esta alteração pode representar um desarranjo primário desta região, com as alterações das fibras a montante, superiormente (evidenciadas na RL e TTM), e do córtex motor (evidenciadas no VBM), sendo secundárias e acometendo diferentemente os pacientes com e sem ME.

Diferentes padrões de herança e diferentes mutações genéticas foram descritos em pacientes com SK, com e sem ME, assim como diferentes graus de alteração do rinencéfalo envolvendo os bulbos e sulcos olfatórios e diferentes alterações da SB e SC envolvendo o sistema motor, refletindo a importante variabilidade fenotípica desta síndrome. Muitas questões ainda restam em relação ao modelo neurobiológico fascinante representado pela SK. O genótipo variado observado nestes pacientes poderia não somente modular os sintomas endócrinos, mas também determinar a presença de alterações neurológicas nestes pacientes, incluindo as do rinencéfalo e a presença de ME.

A RM mostra-se cada vez mais como uma ferramenta diagnóstica eficiente e robusta, e seu papel na pesquisa médica também cresce rapidamente, com novas técnicas, colaborando para a elucidação dos mecanismos fisiológicos e a patogênese de muitas doenças, incluindo a SK.

REFERÊNCIAS*

* De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10520**: informação e documentação: citações em documentos: apresentação. Rio de janeiro, 2002.

ABOLMAALI, N. D., HIETSCHOLD, V., VOGL, T. J., HUTTENBRINK, K. B., HUMMEL, T. MR evaluation in patients with isolated anosmia since birth or early childhood. **AJNR Am J Neuroradiol**, v.23(1), p.157-64, 2002.

ABREU, A. P., TRARBACH, E. B., DE CASTRO, M., FRADE COSTA, E. M., VERSIANI, B., MATIAS BAPTISTA, M. T., GARMES, H. M., MENDONCA, B. B., LATRONICO, A. C. Loss-of-function mutations in the genes encoding prokineticin-2 or prokineticin receptor-2 cause autosomal recessive Kallmann syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, v.93(10), p.4113-8, 2008.

ARMSPACH, J. P., GOUNOT, D., RUMBACH, L., CHAMBRON, J. In vivo determination of multiexponential T2 relaxation in the brain of patients with multiple sclerosis. **Magn Reson Imaging**, v.9(1), p.107-13, 1991.

ASHBURNER, J., FRISTON, K. J. Voxel-based morphometry--the methods. **Neuroimage**, v.11(6 Pt 1), p.805-21, 2000.

ASHBURNER, J., FRISTON, K. J. Why voxel-based morphometry should be used. **Neuroimage**, v.14(6), p.1238-43, 2001.

ATLAS SW. **Magnetic Resonance Imaging of the Brain and Spine**. 4th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008.

BAGLEY, L. J., GROSSMAN, R. I., GALETTA, S. L., SINSON, G. P., KOTAPKA, M., MCGOWAN, J. C. Characterization of white matter lesions in multiple sclerosis and traumatic brain injury as revealed by magnetization transfer contour plots. **AJNR Am J Neuroradiol**, v.20(6), p.977-81, 1999.

BARNES, D., MCDONALD, W. I., LANDON, D. N., JOHNSON, G. The characterization of experimental gliosis by quantitative nuclear magnetic resonance imaging. **Brain**, v.111 (Pt 1), p.83-94, 1988.

BERNASCONI, A., BERNASCONI, N., CARAMANOS, Z., REUTENS, D. C., ANDERMANN, F., DUBEAU, F., TAMPIERI, D., PIKE, B. G., ARNOLD, D. L. T2 relaxometry can lateralize mesial temporal lobe epilepsy in patients with normal MRI. **Neuroimage**, v.12(6), p.739-46, 2000.

BERNASCONI, N., DUCHESNE, S., JANKE, A., LERCH, J., COLLINS, D. L., BERNASCONI, A. Whole-brain voxel-based statistical analysis of gray matter and white matter in temporal lobe epilepsy. **Neuroimage**, v.23(2), p.717-23, 2004.

BERRY, I., BARKER, G. J., BARKHOF, F., CAMPI, A., DOUSSET, V., FRANCONI, J. M., GASS, A., SCHREIBER, W., MILLER, D. H., TOFTS, P. S. A multicenter measurement of magnetization transfer ratio in normal white matter. **J Magn Reson Imaging**, v.9(3), p.441-6, 1999.

BLACKWOOD, D. H., GLABUS, M. F., DUNAN, J., O'CARROLL, R. E., MUIR, W. J., EBMEIER, K. P. Altered cerebral perfusion measured by SPECT in relatives of patients with schizophrenia. Correlations with memory and P300. **Br J Psychiatry**, v.175, p.357-66, 1999.

BOUILLERET, V., NEHLIG, A., MARESCAUX, C., NAMER, I. J. Magnetic resonance imaging follow-up of progressive hippocampal changes in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v.41(6), p.642-50, 2000.

CONNOLLY, K., STRATTON, P. Developmental changes in associated movements. **Dev Med Child Neurol**, v.10(1), p.49-56, 1968.

CONRAD, B., KRIEBEL, J., HETZEL, W. D. Hereditary bimanual synkinesis combined with hypogonadotropic hypogonadism and anosmia in four brothers. **J Neurol**, v.218(4), p.263-74, 1978.

COSTA, E. M., BEDECARRATS, G. Y., MENDONCA, B. B., ARNHOLD, I. J., KAISER, U. B., LATRONICO, A. C. Two novel mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor gene in Brazilian patients with hypogonadotropic hypogonadism and normal olfaction. **J Clin Endocrinol Metab**, v.86(6), p.2680-6, 2001.

DENNIS, M. Impaired sensory and motor differentiation with corpus callosum agenesis: a lack of callosal inhibition during ontogeny? **Neuropsychologia**, v.14(4), p.455-69, 1976.

DOTY, R. L., SHAMAN, P., DANN, M. Development of the University of Pennsylvania Smell Identification Test: a standardized microencapsulated test of olfactory function. **Physiol Behav**, v.32(3), p.489-502, 1984.

DOUSSET, V., GROSSMAN, R. I., RAMER, K. N., SCHNALL, M. D., YOUNG, L. H., GONZALEZ-SCARANO, F., LAVI, E., COHEN, J. A. Experimental allergic

encephalomyelitis and multiple sclerosis: lesion characterization with magnetization transfer imaging. **Radiology**, v.182(2), p.483-91, 1992.

EVANS, A.C., COLLINS, D.L., MILLS, S.R., BROWN, E.D., KELLY, R.L., PETERS, T.M. 3D statistical neuroanatomical models from 305 MRI volumes. **1993 IEEE Conference Record**, v.3, p.1813-1817, 1993

GOOD, C. D., JOHNSRUDE, I. S., ASHBURNER, J., HENSON, R. N., FRISTON, K. J., FRACKOWIAK, R. S. A voxel-based morphometric study of ageing in 465 normal adult human brains. **Neuroimage**, v.14(1 Pt 1), p.21-36, 2001.

GREENSTEIN B, GREENSTEIN A. **Color Atlas of Neuroscience: Neuroanatomy and Neurophysiology**. 7th edition. Stuttgart – New York: Thieme, 2000.

HEDGE GA, COLBY HD, GOODMAN RL. **Fisiologia Endócrina Clínica**. 1^a edição. Philadelphia: WB Saunders Co., 1987.

HEINE, O., GALABURDA, A. M. Olfactory asymmetry in the rat brain. **Exp Neurol**, v.91(2), p.392-8, 1986.

HENKELMAN, R. M., STANISZ, G. J., GRAHAM, S. J. Magnetization transfer in MRI: a review. **NMR Biomed**, v.14(2), p.57-64, 2001.

ISHII, K., KAWACHI, T., SASAKI, H., KONO, A. K., FUKUDA, T., KOJIMA, Y., MORI, E. Voxel-based morphometric comparison between early- and late-onset mild Alzheimer's disease and assessment of diagnostic performance of z score images. **AJNR Am J Neuroradiol**, v.26(2), p.333-40, 2005.

KALMANN, F. J. W., SCHONFELD, ET AL. . The genetic aspects of primary eunuchoidism. **American Journal of Mental Deficiency**, v.48, p.203-236, 1944.

KARAS, G. B., BURTON, E. J., ROMBOUTS, S. A., VAN SCHIJNDEL, R. A., O'BRIEN, J. T., SCHELTENS, P., MCKEITH, I. G., WILLIAMS, D., BALLARD, C., BARKHOF, F. A comprehensive study of gray matter loss in patients with Alzheimer's disease using optimized voxel-based morphometry. **Neuroimage**, v.18(4), p.895-907, 2003.

KIM, Y. H., JANG, S. H., CHANG, Y., BYUN, W. M., SON, S., AHN, S. H. Bilateral primary sensori-motor cortex activation of post-stroke mirror movements: an fMRI study. **Neuroreport**, v.14(10), p.1329-32, 2003.

KIMURA, H., MEANEY, D. F., MCGOWAN, J. C., GROSSMAN, R. I., LENKINSKI, R. E., ROSS, D. T., MCINTOSH, T. K., GENNARELLI, T. A., SMITH, D. H. Magnetization transfer imaging of diffuse axonal injury following experimental brain injury in the pig: characterization by magnetization transfer ratio with histopathologic correlation. **J Comput Assist Tomogr**, v.20(4), p.540-6, 1996.

KLINGMULLER, D., DEWES, W., KRAHE, T., BRECHT, G., SCHWEIKERT, H. U. Magnetic resonance imaging of the brain in patients with anosmia and hypothalamic hypogonadism (Kallmann's syndrome). **J Clin Endocrinol Metab**, v.65(3), p.581-4, 1987.

KNORR, J. R., RAGLAND, R. L., BROWN, R. S., GELBER, N. Kallmann syndrome: MR findings. **AJNR Am J Neuroradiol**, v.14(4), p.845-51, 1993.

KRAMS, M., QUINTON, R., ASHBURNER, J., FRISTON, K. J., FRACKOWIAK, R. S., BOULOUX, P. M., PASSINGHAM, R. E. Kallmann's syndrome: mirror movements associated with bilateral corticospinal tract hypertrophy. **Neurology**, v.52(4), p.816-22, 1999.

KRAMS, M., QUINTON, R., MAYSTON, M. J., HARRISON, L. M., DOLAN, R. J., BOULOUX, P. M., STEPHENS, J. A., FRACKOWIAK, R. S., PASSINGHAM, R. E. Mirror movements in X-linked Kallmann's syndrome. II. A PET study. **Brain**, v.120 (Pt 7), p.1217-28, 1997.

KUBICKI, M., SHENTON, M. E., SALISBURY, D. F., HIRAYASU, Y., KASAI, K., KIKINIS, R., JOLESZ, F. A., MCCARLEY, R. W. Voxel-based morphometric analysis of gray matter in first episode schizophrenia. **Neuroimage**, v.17(4), p.1711-9, 2002.

KUMAR, R., GUPTA, R. K., HUSAIN, M., VATSAL, D. K., CHAWLA, S., RATHORE, R. K., PRADHAN, S. Magnetization transfer MR imaging in patients with posttraumatic epilepsy. **AJNR Am J Neuroradiol**, v.24(2), p.218-24, 2003.

LANDIS, J. R., KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v.33(1), p.159-74, 1977.

LARSSON, H. B., FREDERIKSEN, J., PETERSEN, J., NORDENBO, A., ZEEBERG, I., HENRIKSEN, O., OLESEN, J. Assessment of demyelination, edema, and gliosis by in vivo

determination of T1 and T2 in the brain of patients with acute attack of multiple sclerosis. **Magn Reson Med**, v.11(3), p.337-48, 1989.

LEINSINGER, G. L., HEISS, D. T., JASSOY, A. G., PFLUGER, T., HAHN, K., DANEK, A. Persistent mirror movements: functional MR imaging of the hand motor cortex. **Radiology**, v.203(2), p.545-52, 1997.

LI, J. Y., ESPAY, A. J., GUNRAJ, C. A., PAL, P. K., CUNIC, D. I., LANG, A. E., CHEN, R. Interhemispheric and ipsilateral connections in Parkinson's disease: relation to mirror movements. **Mov Disord**, v.22(6), p.813-21, 2007.

LIEBLICH, J. M., ROGOL, A. D., WHITE, B. J., ROSEN, S. W. Syndrome of anosmia with hypogonadotropic hypogonadism (Kallmann syndrome): clinical and laboratory studies in 23 cases. **Am J Med**, v.73(4), p.506-19, 1982.

MADAN, R., SAWLANI, V., GUPTA, S., PHADKE, R. V. MRI findings in Kallmann syndrome. **Neurol India**, v.52(4), p.501-3, 2004.

MATSUMOTO, S., YAMAZAKI, C., MASUMOTO, K. H., NAGANO, M., NAITO, M., SOGA, T., HIYAMA, H., MATSUMOTO, M., TAKASAKI, J., KAMOHARA, M., MATSUO, A., ISHII, H., KOBORI, M., KATOH, M., MATSUSHIME, H., FURUICHI, K., SHIGEYOSHI, Y. Abnormal development of the olfactory bulb and reproductive system in mice lacking prokineticin receptor PKR2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.103(11), p.4140-5, 2006.

MAYER, M., SCHULZE, S., DANEK, A., BOTZEL, K. Dipole source analysis in persistent mirror movements. **Brain Topogr**, v.12(1), p.49-60, 1999.

MAYSTON, M. J., HARRISON, L. M., QUINTON, R., STEPHENS, J. A., KRAMS, M., BOULOUX, P. M. Mirror movements in X-linked Kallmann's syndrome. I. A neurophysiological study. **Brain**, v.120 (Pt 7), p.1199-216, 1997.

MAYSTON, M. J., HARRISON, L. M., STEPHENS, J. A. A neurophysiological study of mirror movements in adults and children. **Ann Neurol**, v.45(5), p.583-94, 1999.

MCGOWAN, J. C., MCCORMACK, T. M., GROSSMAN, R. I., MENDONCA, R., CHEN, X. H., BERLIN, J. A., MEANEY, D. F., XU, B. N., CECIL, K. M., MCINTOSH, T. K., SMITH, D. H. Diffuse axonal pathology detected with magnetization transfer imaging following brain injury in the pig. **Magn Reson Med**, v.41(4), p.727-33, 1999.

NASS, R. Mirror movement asymmetries in congenital hemiparesis: the inhibition hypothesis revisited. **Neurology**, v.35(7), p.1059-62, 1985.

OBAYDI, H., IZMETH, M. G., RIGBY, J. C. Kallmann's syndrome and mental handicap. **J Intellect Disabil Res**, v.36 (Pt 5), p.457-60, 1992.

OLIVEIRA, L. M., SEMINARA, S. B., BERANOVA, M., HAYES, F. J., VALKENBURGH, S. B., SCHIPANI, E., COSTA, E. M., LATRONICO, A. C., CROWLEY, W. F., JR., VALLEJO, M. The importance of autosomal genes in Kallmann syndrome: genotype-phenotype correlations and neuroendocrine characteristics. **J Clin Endocrinol Metab**, v.86(4), p.1532-8, 2001.

PAPANIKOLAOU, N., PAPADAKI, E., KARAMPEKIOS, S., SPILIOTI, M., MARIS, T., PRASSOPOULOS, P., GOURTSOYIANNIS, N. T2 relaxation time analysis in patients with multiple sclerosis: correlation with magnetization transfer ratio. **Eur Radiol**, v.14(1), p.115-22, 2004.

PITTELOUD, N., ACIERNO, J. S., JR., MEYSING, A., ELISEENKOVA, A. V., MA, J., IBRAHIMI, O. A., METZGER, D. L., HAYES, F. J., DWYER, A. A., HUGHES, V. A., YIALAMAS, M., HALL, J. E., GRANT, E., MOHAMMADI, M., CROWLEY, W. F., JR. Mutations in fibroblast growth factor receptor 1 cause both Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.103(16), p.6281-6, 2006.

PITTELOUD, N., ZHANG, C., PIGNATELLI, D., LI, J. D., RAIVIO, T., COLE, L. W., PLUMMER, L., JACOBSON-DICKMAN, E. E., MELLON, P. L., ZHOU, Q. Y., CROWLEY, W. F., JR. Loss-of-function mutation in the prokineticin 2 gene causes Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2007.

QUINTON, R., DUKE, V. M., DE ZOYSA, P. A., PLATTS, A. D., VALENTINE, A., KENDALL, B., PICKMAN, S., KIRK, J. M., BESSER, G. M., JACOBS, H. S., BOULOUX, P. M. The neuroradiology of Kallmann's syndrome: a genotypic and phenotypic analysis. **J Clin Endocrinol Metab**, v.81(8), p.3010-7, 1996.

QUINTON, R., DUKE, V. M., ROBERTSON, A., KIRK, J. M., MATFIN, G., DE ZOYSA, P. A., AZCONA, C., MACCOLL, G. S., JACOBS, H. S., CONWAY, G. S., BESSER, M., STANHOPE, R. G., BOULOUX, P. M. Idiopathic gonadotrophin deficiency: genetic questions addressed through phenotypic characterization. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v.55(2), p.163-74, 2001.

ROVARIS, M., AGOSTA, F., SORMANI, M. P., INGLESE, M., MARTINELLI, V., COMI, G., FILIPPI, M. Conventional and magnetization transfer MRI predictors of clinical multiple sclerosis evolution: a medium-term follow-up study. **Brain**, v.126(Pt 10), p.2323-32, 2003.

RUSCH, N., VAN ELST, L. T., LUDAESCHER, P., WILKE, M., HUPPERTZ, H. J., THIEL, T., SCHMAHL, C., BOHUS, M., LIEB, K., HESSLINGER, B., HENNIG, J., EBERT, D. A voxel-based morphometric MRI study in female patients with borderline personality disorder. **Neuroimage**, v.20(1), p.385-92, 2003.

SATO, N., KATSUMATA, N., KAGAMI, M., HASEGAWA, T., HORI, N., KAWAKITA, S., MINOWADA, S., SHIMOTSUKA, A., SHISHIBA, Y., YOKOZAWA, M., YASUDA, T., NAGASAKI, K., HASEGAWA, D., HASEGAWA, Y., TACHIBANA, K., NAIKI, Y., HORIKAWA, R., TANAKA, T., OGATA, T. Clinical assessment and mutation analysis of Kallmann syndrome 1 (KAL1) and fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1, or KAL2) in five families and 18 sporadic patients. **J Clin Endocrinol Metab**, v.89(3), p.1079-88, 2004.

SCHWANKHAUS, J. D., CURRIE, J., JAFFE, M. J., ROSE, S. R., SHERINS, R. J. Neurologic findings in men with isolated hypogonadotropic hypogonadism. **Neurology**, v.39(2 Pt 1), p.223-6, 1989.

SCHWANZEL-FUKUDA, M., BICK, D., PFAFF, D. W. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells do not migrate normally in an inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome. **Brain Res Mol Brain Res**, v.6(4), p.311-26, 1989.

SEMINARA, S. B., HAYES, F. J., CROWLEY, W. F., JR. Gonadotropin-releasing hormone deficiency in the human (idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann's syndrome): pathophysiological and genetic considerations. **Endocr Rev**, v.19(5), p.521-39, 1998.

SINSON, G., BAGLEY, L. J., CECIL, K. M., TORCHIA, M., MCGOWAN, J. C., LENKINSKI, R. E., MCINTOSH, T. K., GROSSMAN, R. I. Magnetization transfer imaging and proton MR spectroscopy in the evaluation of axonal injury: correlation with clinical outcome after traumatic brain injury. **AJNR Am J Neuroradiol**, v.22(1), p.143-51, 2001.

TRARBACH, E. B., COSTA, E. M., VERSIANI, B., DE CASTRO, M., BAPTISTA, M. T., GARMES, H. M., DE MENDONCA, B. B., LATRONICO, A. C. Novel fibroblast growth factor receptor 1 mutations in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism with and without anosmia. **J Clin Endocrinol Metab**, v.91(10), p.4006-12, 2006.

TRUWIT, C. L., BARKOVICH, A. J., GRUMBACH, M. M., MARTINI, J. J. MR imaging of Kallmann syndrome, a genetic disorder of neuronal migration affecting the olfactory and genital systems. **AJNR Am J Neuroradiol**, v.14(4), p.827-38, 1993.

VAGENAKIS, G. A., HYPHANTIS, T. N., PAPAGEORGIOU, C., PROTONATARIOU, A., SGOUROU, A., DIMOPOULOS, P. A., MAVREAS, V., VAGENAKIS, A. G., GEORGOPOULOS, N. A. Kallmann's syndrome and schizophrenia. **Int J Psychiatry Med**, v.34(4), p.379-90, 2004.

VERSIANI, B. R., TRARBACH, E., KOENIGKAM-SANTOS, M., DOS SANTOS, A. C., ELIAS, L. L., MOREIRA, A. C., LATRONICO, A. C., DE CASTRO, M. Clinical assessment and molecular analysis of GnRHR and KAL1 genes in males with idiopathic hypogonadotrophic hypogonadism. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v.66(2), p.173-9, 2007.

VOGL, T. J., STEMMLER, J., HEYE, B., SCHOPOHL, J., DANEK, A., BERGMAN, C., BALZER, J. O., FELIX, R. Kallman syndrome versus idiopathic hypogonadotropic hypogonadism at MR imaging. **Radiology**, v.191(1), p.53-7, 1994.

WALDSTREICHER, J., SEMINARA, S. B., JAMESON, J. L., GEYER, A., NACHTIGALL, L. B., BOEPPLE, P. A., HOLMES, L. B., CROWLEY, W. F., JR. The genetic and clinical heterogeneity of gonadotropin-releasing hormone deficiency in the human. **J Clin Endocrinol Metab**, v.81(12), p.4388-95, 1996.

WILSON JD, FOSTER DW, KRONENBERG HM, LARSEN PR. **Williams Textbook of Endocrinology**. 9th edition. Philadelphia: WB Saunders Co., 1998

WOLFF, S. D., BALABAN, R. S. Magnetization transfer contrast (MTC) and tissue water proton relaxation in vivo. **Magn Reson Med**, v.10(1), p.135-44, 1989.

YOUSEM, D. M., GECKLE, R. J., BILKER, W., MCKEOWN, D. A., DOTY, R. L. MR evaluation of patients with congenital hyposmia or anosmia. **AJR Am J Roentgenol**, v.166(2), p.439-43, 1996.

ARTIGO PUBLICADO

ORIGINAL
RESEARCH

M. Koenigkam-Santos
A.C. Santos
T. Borduqui
B.R. Versiani
J.E.C. Hallak
J.A.S. Crippa
M. Castro

Whole-Brain Voxel-Based Morphometry in Kallmann Syndrome Associated with Mirror Movements

BACKGROUND AND PURPOSE: There are 2 main hypotheses concerning the cause of mirror movements (MM) in Kallmann syndrome (KS): abnormal development of the primary motor system, involving the ipsilateral corticospinal tract; and lack of contralateral motor cortex inhibitory mechanisms, mainly through the corpus callosum. The purpose of our study was to determine white and gray matter volume changes in a KS population by using optimized voxel-based morphometry (VBM) and to investigate the relationship between the abnormalities and the presence of MM, addressing the 2 mentioned hypotheses.

MATERIALS AND METHODS: T1-weighted volumetric images from 21 patients with KS and 16 matched control subjects were analyzed with optimized VBM. Images were segmented and spatially normalized, and these deformation parameters were then applied to the original images before the second segmentation. Patients were divided into groups with and without MM, and a *t* test statistic was then applied on a voxel-by-voxel basis between the groups and controls to evaluate significant differences.

RESULTS: When considering our hypothesis a priori, we found that 2 areas of increased gray matter volume, in the left primary motor and sensorimotor cortex, were demonstrated only in patients with MM, when compared with healthy controls. Regarding white matter alterations, no areas of altered volume involving the corpus callosum or the projection of the corticospinal tract were demonstrated.

CONCLUSION: The VBM study did not show significant white matter changes in patients with KS but showed gray matter alterations in keeping with a hypertrophic response to a deficient pyramidal decussation in patients with MM. In addition, gray matter alterations were observed in patients without MM, which can represent more complex mechanisms determining the presence or absence of this symptom.

Kallmann syndrome (KS), first described by the pathologist Maestre de San Juan, is defined by the association of hypogonadotropic hypogonadism with complete (anosmia) or incomplete (hyposmia) olfaction disturbance. Prevalence has been estimated to be from 1:8,000 to 1:10,000 men.¹ It is caused by a neuronal migration arrest that involves both the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and the olfactory neurons, which have a common embryonic origin.^{2,3} The first gene described, *KALI*, encodes a protein named “anosmin,” which shows a strong homology to axonal adhesion molecules involved in neuronal migration and axonal pathfinding.⁴ Recently, other gene mutations have been described in association with the disease.^{5,6}

Various phenotypic abnormalities have been described in KS, including unilateral renal agenesis and specific neurologic disorders, such as bimanual synkinesia or mirror movements (MM).⁷ Currently, these characteristics are considered typical, but not exclusive, in the X-linked KS form of inheritance.^{8,9} MM consists of the involuntary movement of a body segment in reply to voluntary movement of the similar contralateral

segment, more often seen in the hands. It can be observed in children and adolescents, decreasing gradually with age,¹⁰ but its presence in adults, if significant and sustained, is considered pathologic.¹¹ On the basis of neuroimaging and electrophysiologic studies, 2 main hypotheses were elaborated concerning the cause of MM: abnormal development of the primary motor system, involving the ipsilateral corticospinal tract; and lack of contralateral motor cortex inhibitory mechanisms, mainly through the corpus callosum.¹²⁻¹⁴

Voxel-based morphometry (VBM) is a relatively recent method for morphometric evaluation, based on statistical analysis of pooled data,^{15,16} which showed pathologic changes of gray matter in various neurologic and psychiatric conditions, including Alzheimer disease, schizophrenia, and medial temporal lobe epilepsy.¹⁷⁻²¹ A previous study used conventional VBM to compare only the white matter attenuation of the brains of patients with the X-linked form of KS (exhibiting MM) and those of patients with autosomal inherited KS (no MM) and suggested a bilateral corticospinal tract hypertrophy involved in the MM etiology.²² Therefore, the purpose of our study was to use optimized VBM to determine white and gray matter volume changes in a KS population with a well-established genotypic and phenotypic status and to investigate the relationship between the abnormalities and the presence of MM, addressing the 2 mentioned hypotheses.

Materials and Methods

Subjects and Clinical Evaluation

This study was approved by our Institutional Review Board for Human Research and informed consent was obtained from all subjects.

Twenty-one patients with KS, recruited from the endocrinology

Received March 25, 2008; accepted after revision May 14.

From the Divisions of Radiology (M.K.-S., A.C.S.) and Endocrinology and Metabolism (B.R.V., M.C.), Department of Internal Medicine, and Department of Neurology, Psychiatry, and Medical Psychology (T.B., J.E.C.H., J.A.S.C.), School of Medicine of Ribeirão Preto-University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

This work was supported by a grant from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo.

Please address correspondence to Marcel Koenigkam Santos, MD, Division of Radiology, Department of Internal Medicine, School of Medicine of Ribeirão Preto-University of São Paulo, Av. Caramuru 2200, ap. 502, República, Ribeirão Preto, SP, Brazil, 14030 000; e-mail: marcelk46@yahoo.com.br

indicates article with supplemental on-line tables

DOI 10.3174/ajnr.A1202

clinics, were evaluated. All patients were male, with a mean age of 38 ± 12.6 years, ranging from 11 to 60 years of age. Criteria for the diagnosis of KS included clinical signs and symptoms of hypogonadism and clinical reports of hyposmia or anosmia. Complete laboratory endocrine status was obtained. Olfactory acuity was evaluated by the Smell Identification Test,²³ indicating normal olfactory function, mild hyposmia, moderate hyposmia, severe hyposmia, or anosmia, based on the manufacturer's score.

MM was evaluated clinically, with a test adapted from Mayston et al.¹¹ In brief, the patients sequentially opposed the tip of each finger to the tip of the thumb from index to little finger and back again and held the hands horizontal with fingers extended over the edge of a box and flexed each finger in turn several times. When involuntary movement of the homologous finger of the other hand was noted, MM was assessed as positive.

Genomic deoxyribonucleic acid was extracted from peripheral blood; the *KAL1*, *FGFR1*, and *PROKR2* genes were amplified by polymerase chain reaction and then analyzed by a direct sequencing method.⁹ The urinary tract structure was assessed by abdominal ultrasound.

For the MR imaging and VBM evaluations, the patients were matched to 16 control healthy volunteers (all men; mean age, 34 ± 10.4 years; range, 22–50 years).

Image Acquisition

MR images were obtained on a 1.5T Magnetom Vision scanner (Siemens, Erlangen, Germany). Volumetric 3D magnetization-prepared rapid acquisition of gradient echo sequences of all 21 patients and the control group were acquired by using the same parameters: T1-weighted sagittal acquisition; TR = 9.7 ms; TE = 4.0 ms; flip angle = 12°; FOV = 255 mm; matrix = 512×224 ; section resolution equal to $1.0 \times 1.0 \times 1.0$ mm, producing an isometric voxel of 1 mm^3 . For rhinencephalon evaluation, thin-section (3 mm) coronal turbo spin-echo T2-weighted images were acquired. Olfactory bulbs and sulci of the 21 patients and 16 healthy participants were evaluated by at least 2 radiologists (M.K.-S. and A.C.S.).

VBM Protocol

The optimized VBM protocol of Good et al.²⁰ was applied to preprocess gray and white matter images, by using the statistical parametric mapping software (SPM2; Wellcome Department of Imaging Neuroscience, Institute of Neurology, London, UK) in Matlab Version 7.0 (MathWorks, Natick, Mass). In brief, a study-specific template and a priori probability maps for gray and white matter were created by averaging and smoothing all the images of the subjects. Using these study-specific templates, we spatially normalized and segmented all of the images, and then we applied these deformation parameters to the original images, which were segmented again. The resulting images were modulated by the Jacobian determinants from spatial normalization to correct for volume changes introduced during the nonlinear spatial transformations and smoothed (12-mm full width at half maximum isotropic Gaussian kernel). A measure of the total amount of gray matter was entered as a confound in an analysis of covariance. This covariate was given by the total number of voxels within the gray matter compartment of each subject. A *t* test statistic was then applied on a voxel-by-voxel basis between the groups to evaluate significant differences.

Data Analyses

Statistical analysis was performed within the SPM2 software package. Between-group statistical comparisons of mean gray and white mat-

ter volumes were performed with the general linear model, based on random Gaussian field theory. Resulting clusters in a priori regions were reported as significant only if including voxels with *Z*-values of >3.09 , corresponding to the 2-tailed $P < .001$ level, uncorrected for multiple comparisons and an extent threshold of 25 voxels. Uncorrected $P < .001$ levels have been used in previous SPM analyses of functional²⁴ and structural imaging data²⁵ and are considered to provide protection against false-positive results when there are clear hypotheses as to the location of findings. Unpredicted findings were considered as significant only if they survived the False Discovery Rate correction for multiple comparison ($P < .05$).

On the basis of previous MM investigations, our hypothesis a priori-related cortical regions included the primary motor cortex (Brodmann area 4), primary somatosensory cortex (areas 1–3), supplementary motor cortex (area 6), and somatosensory association cortex (Brodmann areas 5 and 7), whereas white matter a priori areas were considered involving the corpus callosum or the corticospinal tract projection in the internal capsule, midbrain, pons, or medulla oblongata. For other gray and white matter regions, no a priori hypothesis could be established. The coordinates obtained for the peak voxels (ie, the anatomic location with maximal white and gray matter differences within each significant cluster) were transferred into Talairach space by using the Matthew Brett mni2tal routine (<http://imaging.mrc-cbu.cam.ac.uk/imaging/MniTalairach>). The anatomic locations of the peak voxels were found by using the Talairach Daemon Client.

The groups were the following: all patients with KS, with and without MM (group I) versus controls, patients with KS and MM (group II) versus controls, patients with KS without MM (group III) versus controls, and group II versus group III.

Region-of-Interest Analysis

To validate our VBM study, we carried out an independent region-of-interest (region of interest) analysis of the corpus callosum surface in the midline, performed on the original volumetric MR images. Using a semiautomatic region-of-interest plug-in tool in ImageJ 1.38 (Limewire tool plug-in, freeware; National Institutes of Health, Bethesda, Md; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), we measured the midsagittal area of the corpus callosum in each individual at least twice. This analysis was blind, without knowing to which group any individual belonged. An independent *t* test was performed, comparing the corpus callosum areas between the previously established groups.

Results

Clinical, Laboratory, and MR Imaging Data

The clinical evaluation of the 21 patients with KS, including age, form of inheritance, molecular analysis, and clinical tests for olfactory disturbance and MM is shown in on-line Tables 1 and 2. These tables also show the results of rhinencephalon evaluation by using MR imaging and findings of renal sonography.

Molecular analysis was performed in previous studies^{9,26} and showed the presence of a mutation of the *KAL1* gene in 4 patients, the *FGFR1* gene in 3 patients, and the *PROKR2* gene in 1 patient. The Smell Identification Test was performed in 20 patients, indicating anosmia in 14 patients and moderate hyposmia in 4. One patient did not undergo the test because of a cognitive deficit, but reports of hyposmia/anosmia were con-

Fig 1. Regional cortical gray matter volume increase (orange/red) and reduction (blue) in patients with KS and MM relative to control subjects. Significant voxels (height threshold of $P < .001$, uncorrected for multiple comparisons and an extent threshold of 25 voxels) are superimposed on selected sections of spatially normalized MR images from a control subject. With the hypothesis a priori, areas of increased gray matter are seen around the left central sulcus, in the primary motor cortex, Brodmann area 4 (the cluster with 122 voxels), and the primary somatosensory cortex, area 3 (the cluster with 93 voxels).

firmed by parent testimony. MM, evaluated in all patients, were significantly observed in 9 subjects.

Rhinencephalon Alterations

Aplasia or hypoplasia was found in 18 subjects. Among the patients with KS, 3 had normal examination findings, presenting olfactory bulbs and sulci dimensions similar to those of controls; however, they presented moderate hyposmia in the smell test and, therefore, were included in the study.

VBM

On-line Tables 3 and 4 show all regions of increased and decreased volumes of gray and white matter, respectively, as determined in the optimized VBM by SPM2 software, when comparing pooled data for each of the previously defined groups.

Gray Matter

Considering our hypothesis a priori, we found some areas of altered gray matter volume. When individually compared with controls, groups II and III showed different areas of increased volume. In group II, there were 2 areas: 1 in the left precentral gyrus, Brodmann area 4, and another cluster in the left postcentral gyrus, Brodmann area 3, though in group III

comparison with controls, the study demonstrated 2 clusters, 1 in the left frontal lobe, Brodmann area 6, and the other in the right precentral gyrus, Brodmann area 4. In the direct comparison between groups II and III, no area of altered gray matter was demonstrated. All other areas of altered gray matter volume, not related to our hypothesis a priori, did not survive correction for multiple comparisons at a $P = .05$ threshold; therefore, because they were unpredicted findings, we did not consider them significant.

Figures 1 and 2 show all brain regions of increased (orange/red) and decreased (blue) gray matter volume in patients with KS with and without MM, respectively, compared with control subjects.

White Matter

The VBM analysis showed many areas of altered white matter volume containing more than 25 voxels with $Z = 3.09$, but no area survived correction for multiple comparisons at a $P = .05$ threshold, and no area was demonstrated involving the corpus callosum, internal capsule, midbrain, pons, or medulla oblongata. Major areas shown in the statistical parametric map analysis comprise clusters of reduced white matter in the frontal lobes of the patients in group III, compared with controls. In

Fig 2. Regional cortical gray matter volume increase (orange/red) and reduction (blue) in patients with KS without MM relative to control subjects. Significant voxels (height threshold of $P < .001$, uncorrected for multiple comparisons and an extent threshold of 25 voxels) are superimposed on selected sections of spatially normalized MR images from a control subject. With the hypothesis a priori, areas of increased gray matter are seen in the left frontal lobe, Brodmann area 6 (the cluster with 304 voxels), and in the right precentral gyrus, contralateral area 4 (the cluster with 27 voxels).

the group II versus group III comparison, no significant difference was observed.

Region-of-Interest Analysis

We did not find significant differences in the corpus callosum midsagittal area when applying individual t tests for each group comparison and considering $P < .05$. Corpus callosum mean areas and SDs were the following: control group, $641.9 \pm 14.87 \text{ mm}^2$; group I, $620.3 \pm 17.17 \text{ mm}^2$; group II, $636.3 \pm 30.23 \text{ mm}^2$; group III, $596.5 \pm 16.66 \text{ mm}^2$. The t tests showed the following: group I versus controls, $P = .20$; group II versus controls, $P = .87$; group III versus controls, $P = .06$; and group II versus group III, $P = .27$.

Discussion

In this study, we evaluated 21 patients with KS, and all patients showed altered findings on smell tests, mostly presenting anosmia. Three patients with moderate hyposmia showed normal MR imaging findings, which do not exclude a KS diagnosis.²⁷⁻²⁹ Nine individuals (43%) presented with MM and 7 presented with an X-linked inheritance pattern. Gene mutations were found in 8 (36%) patients.⁹ These data are similar to those found by other authors.¹³ Genitourinary tract abnormality was observed in 5 (26%), all patients within the synkinetic group, with 2 patients presenting the same *KAL1* muta-

tion, representing the classic X-linked KS phenotype (ie, hypogonadotropic hypogonadism, anosmia, MM, and renal aplasia).^{8,28}

We can emphasize 3 main findings in the VBM study: First, no area of white matter increased volume in the projection of the corticospinal tract was demonstrated in patients with KS, even in the group with MM. Second, the VBM showed no difference in the corpus callosum between the groups, as well as the region-of-interest analysis of the corpus callosum area in the sagittal midline. Third, related to our hypothesis a priori, some areas of gray matter volume involving the motor cortex were demonstrated to be altered in a different manner in patients with and without MM.

The association between MM and hypogonadotropic hypogonadism with anosmia was first described in 1978.³⁰ The authors suggested that uncrossed pyramidal tract fibers could be a major pathogenic factor for the occurrence of congenital MM. In a previous study, a deficient inhibitory mechanism between the right and left supplemental motor cortex was suggested as the MM etiology in patients presenting corpus callosum agenesis.³¹ In 1985, in a study of children with congenital hemiparesis, the authors proposed that the association between incomplete maturation of the corpus callosum and a deficiency in the crossing of pyramidal tract fibers would be

responsible for the pathologic persistence of MM, therefore suggesting a merger of the previous 2 main hypotheses.¹²

Our analysis showed no significant altered white matter area when comparing the groups with and without MM. The previous study by using VBM in KS²² demonstrated the presence of 2 symmetric tracts of increased white matter attenuation, extending from the lower limb of the internal capsule and laterally through the midbrain toward the pons, in patients with the X-linked form with MM, suggesting a bilateral corticospinal tract hypertrophy involvement in its etiology. This study was in agreement with previous neurophysiologic reports.¹³ Hence, our results did not reproduce the previous MR imaging structural findings regarding corticospinal tract alterations in patients with KS with MM. Possible explanations for the different findings regarding white matter alterations identified in KS by using VBM include differences in the studied populations, differences inherent to the preprocessing method used (conventional versus optimized VBM), and the lack of structural changes that can be associated with altered motor function in our population of patients with KS and MM.

No volume alteration in the corpus callosum was found. This is in accordance with the study by Quinton et al.²⁸ The prior study using conventional VBM in white matter showed hypertrophy of the corpus callosum in KS groups with and without MM, but no significant difference between the groups, therefore excluding a possible association between MM and corpus callosum alterations.²²

Beyond the 2 main hypotheses correlating MM with an uncrossed pyramidal tract and/or a deficient transcallosal inhibitory mechanism, further studies in patients with KS using different techniques, such as positron-emission tomography¹⁴ and functional MR imaging,³² demonstrated the relationship of other structures and MM, including the primary motor cortex bilaterally, sensorimotor cortices, and supplemental motor areas near the midline.³³ Besides those in patients with KS, other studies with different clinical conditions, such as the congenital form of synkinesia, Parkinson disease, and post-stroke, have proposed a more complex mechanism in MM etiology.³⁴⁻³⁶

No areas of difference in gray matter volume were demonstrated when comparing patients with and without MM. Patients with KS and MM presented 2 areas of increased gray matter around the left central sulcus, the primary motor cortex (Brodmann area 4), and the primary somatosensory cortex (area 3), compared with control group. This alteration is in accordance with the hypothesis of involvement of the dominant motor cortex related to the afferent and efferent motor pathways in the MM pathomechanism and could suggest the presence of hypertrophy as a secondary change to the deficient pyramidal decussation. On the other hand, compared with controls, patients with KS without MM presented 2 different areas of increased gray matter volume related to the motor cortex, the biggest one in the left supplementary motor cortex, Brodmann area 6. These data suggest more complex mechanisms involved in the presence or absence of MM in patients with KS. Even without differences in white and gray matter volume between both groups of patients with KS (with and without MM), different findings in gray matter volume in each KS group compared with controls can be considered as

an indirect evidence of gray matter structural alterations in patients with KS with and without MM.

Rhinencephalon alterations of KS identified in MR imaging are well established. Olfactory afferents, especially from olfactory tracts, not only make connections with the olfactory cortex (Brodmann 34) but also have interactions with the limbic system, piriform cortex, including the amygdala, parahippocampal gyrus, and lateral hypothalamus, and the hippocampus, contributing memory and learning mechanisms.²⁸ Indeed, neuropsychological developmental alterations have already been described in KS, because the original study of Kallmann et al³⁷ and those of other authors observed association of KS with psychiatric disorders and mental handicaps.^{38,39} In our study, a complete structured psychiatric assessment of all patients was not carried out; however it was possible to identify 3 patients with psychiatric disorders, including 2 with schizophrenia and 1 who had an acute psychotic manifestation. Many other areas of gray and white matter volumes were significantly altered for a height threshold of $P < .001$, but they were not directly associated with our hypothesis a priori or did not survive multiple variations correction. Different study approaches would be necessary to correlate these altered areas with olfaction disturbances or neuropsychiatric disorders, which are being considered by the authors as possible future projects.

An isolated GnRH deficiency presenting as hypogonadotropic hypogonadism with or without anosmia encompasses a broad spectrum of phenotypes, and many questions remain unanswered regarding the fascinating neurobiologic model presented by KS.¹ Recent studies in KS have demonstrated the presence of novel mutations involving new genes, as well as digenic mutations, acting in a synergic way to account for phenotypic determination.^{26,40} The variable genotype observed in patients with KS might modulate not only endocrine symptoms but also neurologic features, including the presence of MM.

Study Limitations

Although the automated approach of VBM has advantages over traditional region of interest–based methods, false-positive or false-negative findings might arise from the changes in the shape or displacement of structures in the course of spatial normalization. The optimized VBM is an attempt to minimize this problem.²⁰

We have an acceptable sample size when considering all patients with KS,²¹ but for the MM investigation, it was necessary to split the sample into smaller groups, which could reduce the statistical power of our test and could be responsible for the lack of alterations when comparing groups II and III and could also result in missing possible additional areas of abnormalities in the other comparisons. To avoid reducing the sample size, we kept 2 young subjects in group III, with the 11- and 14-year-old children. To our knowledge, the role and accuracy of VBM in nonadult populations are still not well documented.

Conclusion

The purpose of this study was to use optimized VBM to investigate white and gray matter volume changes in the well-established

lished genotypic and phenotypic status of the KS population to elucidate the cause of MM, present in part of these patients. Our study did not show significant changes in white matter but showed alterations in gray matter involving the motor cortex in a different manner in patients with KS with and without MM. These alterations are in keeping with a hypertrophic response to a deficient pyramidal decussation in patients with KS and MM. In addition, gray matter alterations were observed in patients without MM, which can represent more complex mechanisms determining the presence or absence of this symptom.

Acknowledgments

We thank Heather F. Olson, PhD, and Donald R. Short for reviewing the manuscript text.

References

1. Seminara SB, Hayes FJ, Crowley WF Jr, et al. **Gonadotropin-releasing hormone deficiency in the human (idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann's syndrome): pathophysiological and genetic considerations.** *Endocr Rev* 1998;19:521–39
2. Schwanzel-Fukuda M, Bick D, Pfaff DW. **Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells do not migrate normally in an inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome.** *Brain Res Mol Brain Res* 1989;6:311–26
3. Hayes FJ, Seminara SB, Crowley WF Jr. **Hypogonadotropic hypogonadism.** *Endocrinol Metab Clin North Am* 1998;27:739–63, vii
4. Franco B, Guioli S, Pragliola A, et al. **A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path-finding molecules.** *Nature* 1991;353:529–36
5. Pitteloud N, Acierno JS Jr, Meysing A, et al. **Mutations in fibroblast growth factor receptor 1 cause both Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:6281–86. Epub 2006 Apr 10
6. Matsumoto S, Yamazaki C, Matsumoto KH, et al. **Abnormal development of the olfactory bulb and reproductive system in mice lacking prokineticin receptor PKR2.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:4140–45. Epub 2006 Mar 2
7. Quinton R, Duke VM, Robertson A, et al. **Idiopathic gonadotrophin deficiency: genetic questions addressed through phenotypic characterization.** *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001;55:163–74
8. Sato N, Katsumata N, Kagami M, et al. **Clinical assessment and mutation analysis of Kallmann syndrome 1 (KAL1) and fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1, or KAL2) in five families and 18 sporadic patients.** *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:1079–88
9. Versiani BR, Trarbach E, Koenigkam-Santos M, et al. **Clinical assessment and molecular analysis of GnRHR and KAL1 genes in males with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism.** *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007;66:173–79
10. Connolly K, Stratton P. **Developmental changes in associated movements.** *Dev Med Child Neurol* 1968;10:49–56
11. Mayston MJ, Harrison LM, Stephens JA. **A neurophysiological study of mirror movements in adults and children.** *Ann Neurol* 1999;45:583–94
12. Nass R. **Mirror movement asymmetries in congenital hemiparesis: the inhibition hypothesis revisited.** *Neurology* 1985;35:1059–62
13. Mayston MJ, Harrison LM, Quinton R, et al. **Mirror movements in X-linked Kallmann's syndrome. I. A neurophysiological study.** *Brain* 1997;120 (Pt 7):1199–216
14. Krams M, Quinton R, Mayston MJ, et al. **Mirror movements in X-linked Kallmann's syndrome. II. A PET study.** *Brain* 1997;120 (Pt 7):1217–28
15. Ashburner J, Friston KJ. **Voxel-based morphometry: the methods.** *Neuroimage* 2000;11:805–21
16. Ashburner J, Friston KJ. **Why voxel-based morphometry should be used.** *Neuroimage* 2001;14:1238–43
17. Kubicki M, Shenton ME, Salisbury DF, et al. **Voxel-based morphometric analysis of gray matter in first episode schizophrenia.** *Neuroimage* 2002;17:1711–19
18. Karas GB, Burton EJ, Rombouts SA, et al. **A comprehensive study of gray matter loss in patients with Alzheimer's disease using optimized voxel-based morphometry.** *Neuroimage* 2003;18:895–907
19. Bernasconi N, Duchesne S, Janke A, et al. **Whole-brain voxel-based statistical analysis of gray matter and white matter in temporal lobe epilepsy.** *Neuroimage* 2004;23:717–23
20. Good CD, Johnsrude IS, Ashburner J, et al. **A voxel-based morphometric study of ageing in 465 normal adult human brains.** *Neuroimage* 2001;14 (Pt 1):21–36
21. McMillan AB, Hermann BP, Johnson SC, et al. **Voxel-based morphometry of unilateral temporal lobe epilepsy reveals abnormalities in cerebral white matter.** *Neuroimage* 2004;23:167–74
22. Krams M, Quinton R, Ashburner J, et al. **Kallmann's syndrome: mirror movements associated with bilateral corticospinal tract hypertrophy.** *Neurology* 1999;52:816–22
23. Doty RL, Sharnan P, Dann M. **Development of the University of Pennsylvania Smell Identification Test: a standardized microencapsulated test of olfactory function.** *Physiol Behav* 1984;32:489–502
24. Blackwood DH, Glabus MF, Dunan J, et al. **Altered cerebral perfusion measured by SPECT in relatives of patients with schizophrenia: Correlations with memory and P300.** *Br J Psychiatry* 1999;175:357–66
25. Rusch N, van Elst LT, Ludaescher P, et al. **A voxel-based morphometric MRI study in female patients with borderline personality disorder.** *Neuroimage* 2003;20:385–92
26. Trarbach EB, Costa EM, Versiani B, et al. **Novel fibroblast growth factor receptor 1 mutations in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism with and without anosmia.** *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4006–12
27. Vogl TJ, Stemmler J, Heye B, et al. **Kallman syndrome versus idiopathic hypogonadotropic hypogonadism at MR imaging.** *Radiology* 1994;191:53–57
28. Quinton R, Duke VM, de Zoysa PA, et al. **The neuroradiology of Kallmann's syndrome: a genotypic and phenotypic analysis.** *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3010–17
29. Madan R, Sawlani V, Gupta S, et al. **MRI findings in Kallmann syndrome.** *Neurol India* 2004;52:501–03
30. Conrad B, Kriebel J, Hetzel WD. **Hereditary bimanual synkinesis combined with hypogonadotropic hypogonadism and anosmia in four brothers.** *J Neurol* 1978;218:263–74
31. Dennis M. **Impaired sensory and motor differentiation with corpus callosum agenesis: a lack of callosal inhibition during ontogeny?** *Neuropsychologia* 1976;14:455–69
32. Leinsinger GL, Heiss DT, Jassoy AG, et al. **Persistent mirror movements: functional MR imaging of the hand motor cortex.** *Radiology* 1997;203:545–52
33. Mayer M, Schulze S, Danek A, et al. **Dipole source analysis in persistent mirror movements.** *Brain Topogr* 1999;12:49–60
34. Kim YH, Jang SH, Chang Y, et al. **Bilateral primary sensori-motor cortex activation of post-stroke mirror movements: an fMRI study.** *Neuroreport* 2003;14:1329–32
35. Li JY, Espay AJ, Gunraj CA, et al. **Interhemispheric and ipsilateral connections in Parkinson's disease: relation to mirror movements.** *Mov Disord* 2007;22:813–21
36. Verstynen T, Spencer R, Stinear CM, et al. **Ipsilateral corticospinal projections do not predict congenital mirror movements: a case report.** *Neuropsychologia* 2007;45:844–52
37. Kallmann FJ, Schonfeld WA, Barvera SE. **The genetic aspects of primary eunuchoidism.** *Am J Ment Defic* 1944;48:203–36
38. Obaydi H, Izmeth MG, Rigby JC. **Kallmann's syndrome and mental handicap.** *J Intellect Disabil Res* 1992;36 (Pt 5):457–60
39. Vagenakis GA, Hyphantis TN, Papageorgiou C, et al. **Kallmann's syndrome and schizophrenia.** *Int J Psychiatry Med* 2004;34:379–90
40. Pitteloud N, Quinton R, Pearce S, et al. **Digenic mutations account for variable phenotypes in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism.** *J Clin Invest* 2007;117:457–63