ULYSSES DOS SANTOS TORRES

**Estudo de alterações estruturais cerebrais em pacientes com
esquizofrenia crônica e de primeiro episódio através de
imagens por ressonância magnética com morfometria
baseada no voxel**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Radiologia

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Busatto Filho

São Paulo
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Torres, Ulysses dos Santos

Estudo de alterações estruturais cerebrais em pacientes com esquizofrenia crônica e de primeiro episódio através de imagens por ressonância magnética com morfometria baseada no voxel / Ulysses dos Santos Torres. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Radiologia.

Orientador: Geraldo Busatto Filho.

Descritores: 1.Transtornos mentais 2.Esquizofrenia 3.Imagem por ressonância magnética 4.Neuroimagem 5.Estudos transversais

USP/FM/DBD-081/16

"Auch das Schöne muß sterben!"

Friedrich Schiller

"Descubrir lo desconocido no es una especialidad de Simbad, de Erico el Rojo o de Copérnico.

No hay un solo hombre que no sea un descubridor. Empieza descubriendo lo amargo, lo salado, lo cóncavo, lo liso, lo áspero, los siete colores del arco y las veintitantas letras del alfabeto; pasa por los rostros, los mapas, los animales y los astros; concluye por la duda o por la fe y por la certidumbre casi total de su propia ignorancia."

Jorge Luis Borges

Aos meus queridos pais, Mario e Penha, pelo amor absoluto, pelo apoio incondicional e pelo generoso esforço que os fizeram inúmeras vezes renunciar aos próprios sonhos em favor dos meus. Vocês são o meu maior tesouro e alicerce. Dedico-lhes este trabalho com meu mais profundo respeito e infinito amor.

Aos meus queridos irmãos, Lilian e Danilo, companhia constante ao longo da jornada desta vida, pelo amor e união.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Geraldo Busatto Filho, pela generosa oportunidade, pela confiança em mim depositada, pela orientação firme e, sobretudo, por seu grande exemplo pessoal de inabalável ética científica, que espero levar pelo resto da vida.

Ao Prof. Dr. Antonio Soares Souza, meu “padrinho” radiológico, amigo querido e modelo de radiologista brilhante, pelo apoio fundamental que deu à minha carreira radiológica desde os mais embriológicos primórdios da mesma.

Ao Prof. Dr. José Roberto Lopes Ferraz Filho, cuja figura neurorradiológica me inspirou, primeiro indireta e depois diretamente, ainda no quinto ano da graduação, a desejar tornar-me radiologista.

À “Dear”, Dra. Fabiana Gual, minha amiga de todas as horas, a mais diletta, leal e sempiterna das companhias.

À minha “friendina”, Dra. Fernanda Del Campo Braojos Braga, cuja maravilhosa amizade tornou a vida, a residência e esses anos do doutorado definitivamente mais leves e alegres.

À Dra. Maria Laura Silveira de Castro, com quem primeiramente compartilhei os esboços e planos iniciais deste doutorado durante as longas noites de plantões da residência em São José do Rio Preto, e com quem dividi tantas histórias de percalços, sempre obtendo cumplicidade e um ombro amigo.

Ao nobre e estimado Prof. Dr. Tufik Bauab Jr., por me ensinar a valiosa e inesquecível lição de que “Neuro é nobre, mas Abdome é divertido”, base que inspirou-me a tomar a coragem de mudar (em tempo) os rumos de minha carreira.

Ao meu mestre, Prof. Dr. Giuseppe D’Ippolito, por me provar isso (e pela confiança e apoio moral imprescindíveis nos meus momentos de maior fragilidade nos últimos semestres deste doutorado).

Aos meus chefes no Hospital São Luiz e Grupo Fleury, especialmente nas pessoas do Prof. Dr. Luiz de Abreu Jr., da Prof^a. Dra. Maria Lucia Borri, da Prof^a. Dra. Ângela Maria Borri Wolosker e do Prof. Dr. Mário de Melo Galvão Filho.

À equipe do LIM-21, especialmente nas pessoas do Fábio Luís de Souza Duran, Paula Squarzoni da Silveira, Luciana Cristina Santos e Naomi Antunes da Costa, pelo valioso suporte em variadas frentes ao longo desses anos do doutorado.

Ao Prof. Dr. Helio Elkis e à Caroline Yaciko de Oliveira Kanegusuku pela valiosa ajuda no levantamento de dados referentes ao uso de antipsicóticos em uma das amostras.

A todos os pesquisadores envolvidos nos quatro estudos prévios cujos dados foram empregados neste trabalho.

Aos pacientes com esquizofrenia, razão maior da realização deste estudo.

Last but not least, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro mediante concessão de bolsa de Doutorado Direto (processo 11/18631-1).

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação.

Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011. Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas
Lista de figuras
Lista de tabelas
Resumo
Abstract

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Importância e aspectos gerais da doença	2
1.2 O modelo neurodesenvolvimental	5
1.3 Os estudos de neuroimagem	8
1.4 A introdução da análise estrutural por morfometria baseada no voxel	10
1.5 A hipótese do processo neurodegenerativo associado e a importância da diferenciação entre esquizofrenia crônica e de primeiro episódio	12
1.6 O papel da medicação sobre a progressão das alterações estruturais	13
1.7 Os novos estudos colaborativos de VBM e a combinação de dados multicêntricos e de múltiplos estudos	16
1.8 A importância dos estudos transversais	18
1.9 Limitações do conhecimento atual	19
2. JUSTIFICATIVAS	22
3. OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo primário	26
3.2 Objetivos secundários	26
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	27
4.1 Casuística	28
4.1.1 Critérios de inclusão	29
4.1.2 Critérios de exclusão	30
4.1.3 Dados demográficos e clínicos	31

4.2 Métodos	34
4.2.1 Protocolo de aquisição das imagens de RM estrutural	34
4.2.2 Pré-processamento das imagens	36
4.2.3 Processamento das imagens	38
4.2.4 Pós-processamento	40
4.2.5 Extração de volumes globais	41
4.2.6 Métodos alternativos de covariação das análises para valores globais de substância cinzenta	42
4.2.7 Análise estatística	44
5. RESULTADOS	47
5.1 Dados clínicos e demográficos	48
5.2 Análises de volumes globais	50
5.3 Análises de volumes regionais: achados de VBM nas comparações intergrupos	52
5.4 Análises de volumes regionais: achados de VBM nas correlações intragrupo	60
6. DISCUSSÃO	64
6.1 Reduções volumétricas regionais de substância cinzenta no grupo de primeiro episódio	65
6.2 Maior extensão das reduções volumétricas regionais de substância cinzenta no grupo crônico	69
6.3 A relação entre alterações estruturais cerebrais na esquizofrenia e o uso de antipsicóticos	74
6.4 Vantagens e limitações	75
7. CONCLUSÃO	78

8. ANEXOS80

Anexo A. Aprovação do protocolo de pesquisa pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do HC-FMUSP81

Anexo B. Tabela de equivalências dos principais antipsicóticos em 100 miligramas de clorpromazina (Baseado em Andreasen *et al.*, 2010, ref. 95).....82

Anexo C. Exemplificação dos resultados de uma parcela das análises adicionais realizadas com métodos alternativos de covariação para valores globais de substância cinzenta (resultados sem correção FWE, $p < 0,001$, reduções regionais, análises pacientes totais x controles)83

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS95

10. APÊNDICES

Apêndice 1. Publicação: Torres US et al. BMC Psychiatry 2013;13:342

Apêndice 2. Certificado de Conclusão de Curso: Statistical Analysis of fMRI Data. Johns Hopkins University, EUA, 2014

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANCOVA - Análise de covariância

CAPPesq- Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

CID-10 - Classificação Internacional de Doenças – 10

CPZ - Clorpromazina

DALY - Disability-adjusted life-years

DARTEL - Diffeomorphic anatomical registration through exponentiated Lie algebra.

DICOM - Digital Imaging and Communications in Medicine

DISC-1 - Disrupted in schizophrenia¹

DP- Desvio-padrão

DSM-IV - Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, quarta edição

DSM-V - Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, quinta edição

DTNBP-1- Dystrobrevin-binding protein 1

ERBB4 - V-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4

EUA - Estados Unidos da América

fBIRN – Functional Biomedical Informatics Research Network

FMRP-USP - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP)

FOV – Field of view

FWE – Family-wise error

GM – Gray matter

HC-FMUSP - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

HCFMRP-USP - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão

Preto da USP

HIV - Human Immunodeficiency Virus

ICBM - International Consortium for Brain Mapping

IPq – Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

LIM-21 – Laboratório de Investigações Médicas 21 (Laboratório de Neuroimagem em Psiquiatria)

MCIC - Mind Clinical Imaging Consortium

MNI - Montreal Neurological Institute

NIfTI-1 - Neuroimaging Informatics Technology Initiative – 1

NIH - National Institutes of Health

NRG-1 - Neuregulin 1

PANSS - Positive and Negative Syndrome Scale

PET - Positron emission tomography

RM – Ressonância magnética

ROI – Region of interest

SC – Substância cinzenta

SCID-P - Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders, Patient Edition

SPM - Statistical Parametric Mapping

SVC - Small volume correction

T – Tesla

T1-3D-FLASH- Three-dimensional fast low angle shot

TE- Echo time

TGM- Total gray matter

TIV- Total intracranial volume

TR- Repetition time

UK – United Kingdom

US\$- Dólares americanos

VBM - Voxel-based morphometry

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática de um corte sagital cerebral; a comissura anterior é mostrada em vermelho, e a comissura posterior em amarelo.

Figura 2. Definição da comissura anterior como ponto de origem, que se localiza na intersecção virtual das três linhas azuis.

Figura 3. Análise de VBM: reduções volumétricas regionais em pacientes com esquizofrenia (crônicos + primeiro episódio) em comparação a controles.

Figura 4. Análise de VBM: reduções volumétricas regionais em pacientes com esquizofrenia de primeiro episódio em comparação a controles.

Figura 5. Análise de VBM: reduções volumétricas regionais em pacientes com esquizofrenia crônica em comparação a controles.

Figura 6. Análise de VBM: reduções volumétricas regionais em pacientes com esquizofrenia crônica em comparação a pacientes com esquizofrenia de primeiro episódio.

Figura 7. Resultados das análises de correlação intragrupo revelando áreas onde foram encontradas correlações negativas estatisticamente significantes entre tempo de doença e volumes regionais (grupo conjunto de pacientes crônicos e de primeiro episódio, com correção para os efeitos de exposição cumulativa a antipsicóticos ao longo da vida).

Figura 8. Resultados das análises de correlação intragrupo revelando áreas onde foram encontradas correlações negativas estatisticamente significantes entre tempo de doença e volumes regionais (análise conjunta de três grupos com escores de PANSS total disponíveis, com correção para os efeitos de exposição cumulativa a antipsicóticos ao longo da vida e gravidade psicopatológica).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis clínico-demográficas dos sujeitos incluídos no estudo.

Tabela 2. Comparação de volumes globais entre pacientes e controles.

Tabela 3. Análise de VBM: reduções volumétricas regionais em pacientes com esquizofrenia (crônicos + primeiro episódio) em comparação a controles.

Tabela 4. Análise de VBM: reduções volumétricas regionais em pacientes com esquizofrenia de primeiro episódio em comparação a controles.

Tabela 5. Análise de VBM: reduções volumétricas regionais em pacientes com esquizofrenia crônica em comparação a controles.

Tabela 6. Análise de VBM: reduções volumétricas regionais em pacientes com esquizofrenia crônica em comparação a pacientes com esquizofrenia de primeiro episódio.

Tabela 7. Resultados das análises com SVC (correção FWE, $p < 0,05$) evidenciando correlações negativas entre volumes regionais de substância cinzenta e tempo de doença para os grupos conjuntos.

RESUMO

Torres US. *Estudo de alterações estruturais cerebrais em pacientes com esquizofrenia crônica e de primeiro episódio através de imagens por ressonância magnética com morfometria baseada no voxel* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Introdução: Embora alterações estruturais cerebrais na esquizofrenia venham sendo repetidamente demonstradas em estudos de ressonância magnética (RM), ainda permanece incerto se tais alterações são estáticas ou progressivas. Enquanto estudos longitudinais são tradicionalmente utilizados na avaliação da questão da progressão, estudos transversais de neuroimagem comparando diretamente pacientes com esquizofrenia crônica e de primeiro episódio a controles saudáveis têm sido bastante raros até o presente. Com o recente interesse em meganálises combinando dados multicêntricos de RM visando-se a maior poder estatístico, o presente estudo multicêntrico de morfometria baseada no voxel (VBM) foi realizado para avaliar os padrões de alterações estruturais cerebrais segundo os diferentes estágios da doença, bem como para avaliar quais (se alguma) dessas alterações se correlacionariam especificamente a moderadores clínicos potenciais, tais como exposição cumulativa a antipsicóticos, tempo de doença e gravidade da doença. **Métodos:** Selecionou-se uma ampla amostra de pacientes com esquizofrenia (161, sendo 99 crônicos e 62 de primeiro episódio) e controles (151) a partir de quatro estudos prévios de RM (1,5T) realizados na mesma região do Brasil. O processamento e análise das imagens foi realizado usando-se o software *Statistical Parametric Mapping* (SPM8) com emprego do algoritmo DARTEL (*diffeomorphic anatomical registration through exponentiated Lie algebra*). Os efeitos de

grupo sobre os volumes regionais de substância cinzenta (SC) foram analisados através de comparações voxel-a-voxel por análises de covariância em modelos lineares gerais, inserindo-se, em todas as análises, o volume total de SC, protocolo do scanner, idade e sexo como variáveis de confusão. Por fim, foram realizadas análises de correlação entre os aludidos moderadores clínicos potenciais e os volumes cerebrais globais e regionais.

Resultados: Os pacientes com esquizofrenia de primeiro episódio apresentaram reduções volumétricas sutis em comparação aos controles, em um circuito neural circunscrito e identificável apenas em análises SVC (*small volume correction*) [$p < 0.05$, com correção *family-wise error* (FWE)], incluindo a ínsula, estruturas têmporo-límbicas e corpo estriado. Os pacientes crônicos, por outro lado, apresentaram um padrão de alterações extensas comparativamente aos controles, envolvendo os córtices frontais orbitais, superiores e inferiores bilateralmente, córtex frontal médio direito, ambos os córtices cingulados anteriores, ambas as ínsulas, e os córtices temporais superior e médio direitos ($p < 0.05$, análises *whole-brain* com correção FWE). Foram encontradas correlações negativas significantes entre exposição cumulativa a antipsicóticos e volumes globais de SC e substância branca nos pacientes com esquizofrenia, embora as correlações com reduções regionais não tenham sido significantes. Detectaram-se, ainda, correlações negativas significantes entre tempo de doença e volumes regionais relativos da ínsula esquerda, córtex cingulado anterior direito e córtices pré-frontais dorsolaterais nas análises SVC para os grupos conjuntos (esquizofrenia crônica e de primeiro episódio). **Conclusão:** Os achados supracitados indicam que: a) as alterações estruturais associadas com o diagnóstico de esquizofrenia são mais disseminadas na forma crônica em comparação à de primeiro episódio; b) reduções volumétricas regionais em áreas específicas do cérebro podem variar em função do tempo de doença; c) a exposição

cumulativa a antipsicóticos associou-se a alterações volumétricas globais, e não regionais.

Descritores: transtornos mentais; esquizofrenia; imagem por ressonância magnética; neuroimagem; estudos transversais.

ABSTRACT

Torres US. *A study on structural brain changes in patients with chronic and first-episode schizophrenia using magnetic resonance imaging with voxel-based morphometry* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2016.

Introduction: Although structural brain changes in schizophrenia have been repeatedly demonstrated in magnetic resonance imaging (MRI) studies, it remains unclear whether these are static or progressive in nature. While longitudinal MRI studies have been traditionally used to assess the issue of progression, cross-sectional neuroimaging studies directly comparing first-episode and chronic schizophrenia patients to healthy controls have been very scarce to date. With the recent interest in multisite mega-analyses combining structural MRI data from multiple centers aiming at increased statistical power, the present multisite voxel-based morphometry (VBM) study was carried out to examine patterns of brain structural changes according to the different stages of illness and to ascertain which (if any) of such structural abnormalities would be specifically correlated to potential clinical moderators, including cumulative exposure to antipsychotics, illness duration and overall illness severity. **Methods:** We gathered a large sample of schizophrenia patients (161, being 99 chronic and 62 first-episode) and controls (151) from four previous morphometric MRI studies (1.5 T) carried out in the same geographical region of Brazil. Image processing and analyses were conducted using Statistical Parametric Mapping (SPM8) software with the diffeomorphic anatomical registration through exponentiated Lie algebra (DARTEL) algorithm. Group effects on regional gray matter (GM) volumes were investigated through whole-brain voxel-wise comparisons using General Linear Model Analysis of Co-variance (ANCOVA), always including total GM

volume, scan protocol, age and gender as nuisance variables. Finally, correlation analyses were performed between the aforementioned clinical moderators and regional and global brain volumes. **Results:** First-episode schizophrenia subjects displayed subtle volumetric deficits relative to controls in a circumscribed brain regional network identified only in small volume-corrected (SVC) analyses [$p < 0.05$, family-wise error (FWE)-corrected], including the insula, temporolimbic structures and striatum. Chronic schizophrenia patients, on the other hand, demonstrated an extensive pattern of regional GM volume decreases relative to controls, involving bilateral superior, inferior and orbital frontal cortices, right middle frontal cortex, bilateral anterior cingulate cortices, bilateral insulae and right superior and middle temporal cortices ($p < 0.05$, FWE-corrected over the whole brain). Significant negative correlations were detected between life-time cumulative exposure to antipsychotics and total GM and white matter volumes in schizophrenia patients, but no significant relationship was found between indices of antipsychotic usage and relative GM volume in any specific brain region. There were also significant negative correlations between duration of illness and relative GM volumes of the left insula, and right anterior cingulate and dorsolateral prefrontal cortices on SVC analyses for conjoined (first-episode and chronic) schizophrenia groups. **Conclusion:** The above data indicate that: a) brain changes associated with the diagnosis of schizophrenia are more widespread in chronic schizophrenia compared to first-episode patients; b) relative GM volume deficits in specific brain regions may vary as a function of duration of illness; c) cumulative doses of antipsychotics usage were associated with brain volumes globally rather than regionally.

Descriptors: mental disorders; schizophrenia; magnetic resonance imaging; neuroimaging; cross-sectional studies.

1 Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Importância e aspectos gerais da doença

A esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico grave e debilitante que afeta cerca de 1% da população mundial, determinando um profundo impacto sob o ponto de vista de saúde pública e acarretando consequências devastadoras para os indivíduos afetados e suas famílias (1-4).

Embora seja difícil estimar precisamente o impacto social da doença, devido à multiplicidade e heterogeneidade dos dados e métodos empregados em diversas partes do mundo, a profundidade do impacto econômico tem sido descrita de maneira uniforme em diversos estudos (5). Calcula-se que o impacto da doença sobre os sistemas de saúde globalmente seja da ordem de 1,5% a 3% dos recursos totais anuais a eles destinados (6); ademais, como se trata de uma doença crônica, os gastos tendem a ser permanentes (6). Com efeito, pacientes com esquizofrenia ocupam cerca de 25% dos leitos de hospitais psiquiátricos e demandam cerca de 50% das internações nesses hospitais (5, 7). Rice estimou que o custo total do tratamento desses pacientes nos EUA em 1994 tenha sido de US\$ 44,9 bilhões (8). Em uma revisão sobre o custo da doença para os sistemas de saúde internacionalmente, Knapp *et al.* apontaram valores de 2,6 bilhões de libras esterlinas no Reino Unido para o ano de 1993 e de 2,35 bilhões de dólares canadenses no Canadá para o ano de 1996 (6).

Considerando-se a carga da doença segundo o indicador DALY (*disability-adjusted life-years*), que mede os anos de vida perdidos pela incapacidade, a esquizofrenia era a décima doença com maior carga no mundo em 1990, passando a ser a sétima em 2000 (9), e em 2004 a quinta entre homens e a sexta entre mulheres (10).

Em um sentido amplo, a esquizofrenia não afeta apenas a saúde mental, à medida que pacientes com esse diagnóstico morrem, em média, entre 12 e 15 anos mais cedo que a população geral, sendo que essa média vem aumentando nas últimas décadas; além disso, esses pacientes possuem um risco de mortalidade aumentado em duas a três vezes, se comparados à população geral (11). Embora o suicídio [risco estimado em torno de 4 a 4,9% ao longo da vida (12, 13)] contribua para essas taxas, várias comorbidades somáticas determinam o aumento de tal risco, em parte pelo fato de a doença desencadear uma cascata de fatores socioeconômicos e de hábitos de vida (sedentarismo, obesidade, tabagismo) que resultam, em última instância, em conseqüências adversas de saúde (11). Tem-se demonstrado, assim, que pacientes com esquizofrenia apresentam risco aumentado para dependência de álcool e outras drogas (14, 15), tabagismo (16, 17), doenças cardiovasculares (18, 19) e doenças infecciosas (hepatite C, HIV) (20, 21).

Embora tradicionalmente os estudos epidemiológicos revelassem que a incidência da doença variasse minimamente entre variados lugares, grupos culturais e por gênero, dados recentes revelam diferenças importantes entre países distintos e gêneros (22, 23). Em uma metanálise recente, McGrath *et al.*

(22) demonstraram uma incidência média da doença de 15,2 por 100.000 pessoas, com uma proporção homem/ mulher similar à encontrada por Aleman *et al.* em 2003 (23), isto é, de 1,4: 1,0, e prevalência média de 7,2 por 1000 pessoas.

Clinicamente, observa-se uma variedade de apresentação dos sintomas e um curso heterogêneo da doença, caracterizado por início insidioso, geralmente na adolescência tardia ou início da fase adulta, precedido por um comprometimento funcional, e estendendo-se por toda a vida (2, 4). Caracteristicamente ocorre um comprometimento profundo das funções mentais, das emoções e do comportamento, com alteração dos processos de percepção e julgamento (4).

Classicamente os sintomas na esquizofrenia são divididos em três categorias principais, incluindo os sintomas positivos, negativos e cognitivos. Os sintomas psicóticos (positivos) dizem respeito a características não presentes habitualmente, mas que podem aparecer como resultado do processo da doença; envolvem perda de contato com a realidade, o que compreende o delírio (persecutório, de controle, de grandeza), experiências sensoriais auditivas, visuais, táteis, olfativas ou gustativas não compartilhadas por outros indivíduos (alucinações), paranóia e comportamentos bizarros. Os sintomas negativos (de motivação e volição) dizem respeito a características normalmente presentes, mas que podem estar atenuados ou ausentes como resultado do processo da doença; compreendem, por exemplo, a avolição, retraimento social, anedonia, alogia e embotamento do afeto. Os sintomas cognitivos incluem alterações da capacidade de atenção e concentração, do aprenizado, da memória e das funções

executivas, como a capacidade de pensamento abstrato e de solução de problemas (24-27). Os sistemas diagnósticos usados atualmente para a esquizofrenia incluem a décima versão da Classificação Internacional de Doenças (CID-10) e a quinta edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V) (28).

1.2. O modelo neurodesenvolvimental

A etiologia e a fisiopatologia da esquizofrenia permanecem desconhecidas em grande parte até o momento; a descoberta de um modelo neuropatológico da doença tem suscitado um dos maiores esforços da biopsiquiatria nos últimos 100 anos (29, 30). Embora descobertas importantes tenham sido realizadas no campo de doenças como a de Alzheimer, por exemplo, não se observou este progresso nítido no campo da esquizofrenia (29); não obstante, nestas décadas de pesquisa múltiplas linhas de evidências cada vez mais claras foram reunidas para a construção de uma base neuropatológica para a esquizofrenia, resultando no modelo neurodesenvolvimental (29, 30), segundo o qual a injúria cerebral primária ou a deflagração do processo patológico ocorre ainda durante o desenvolvimento cerebral, antes das manifestações clínicas da doença (30). Ainda segundo esse modelo, a interação entre as alterações cerebrais ocorridas durante o desenvolvimento inicial e a maturação ocorrida durante a pré- adolescência e adolescência parece ser importante para desencadear a manifestação do comportamento psicótico, que tradicionalmente ocorre durante a adolescência ou

os primeiros anos da fase adulta (30, 31). Em suma, a combinação de eventos adversos pré- e perinatais, as manifestações cognitivo-comportamentais observadas durante a infância e a adolescência, e a ausência de evidências que apontem para um processo neurodegenerativo reforçam a hipótese de uma natureza neurodesenvolvimental da doença (31).

Estudos básicos para o suporte desse modelo encontraram inicialmente, por exemplo, alterações do desenvolvimento psicomotor e neuropsicológico já no primeiro ano de vida em crianças com elevado risco genético para esquizofrenia, levantando a hipótese de que as alterações cerebrais pudessem estar presentes desde o desenvolvimento intra-útero (32). Além disso, o risco aumentado em pessoas com esquizofrenia para anomalias morfológicas menores, como espaços aumentados entre o primeiro e segundo artelhos, orelhas de implantação baixa, dentes pequenos, etc., sugere ser conseqüente a alterações da organogênese ocorridas durante o primeiro trimestre da gestação (33).

Variados estudos epidemiológicos também apontam para a importância dos fatores ambientais sobre os estágios pré-natal (sobretudo durante o período crítico de formação e desenvolvimento do sistema nervoso central) e perinatal para o aumento do risco de esquizofrenia, tais como complicações obstétricas (baixo peso ao nascer, prematuridade, exposição pré-natal a infecções), deficiências nutricionais, etc. (31, 34).

Embora os fatores genéticos claramente desempenhem função importante na etiologia da doença, a identificação de fatores genéticos moleculares específicos não tem sido fácil (3). De modo geral, ainda assim a herdabilidade da

doença é notavelmente elevada (da ordem de 80%) e a suscetibilidade parece ser transmitida de modo poligênico (3, 31), de forma que o risco de desenvolvimento da doença se associa diretamente com o grau de parentesco com o indivíduo afetado (risco maior em parentes de primeiro grau e gêmeos monozigóticos, do que em parentes de segundo grau e gêmeos dizigóticos, respectivamente) (31).

O fato de cerca de 60% dos pacientes com esquizofrenia não possuírem nenhum parente de primeiro ou segundo grau com a doença e o fato de o grau de concordância para esquizofrenia entre gêmeos monozigóticos não ser tão elevado (cerca de 50%) deixam patente que, sozinha, a suscetibilidade genética não é suficiente para a manifestação da doença e que a predisposição genética para esquizofrenia é complexa (31). Deve-se ponderar, sobretudo, que a herdabilidade da doença não se deve apenas a influências genéticas, mas também a efeitos ambientais moderados por genes (interação gene - ambiente) (35).

Em favor do modelo neurodesenvolvimental, ainda, estudos recentes têm identificado genes de suscetibilidade com funções essenciais nas etapas iniciais do neurodesenvolvimento (o que inclui a diferenciação neuronal, migração, apoptose e sinaptogênese), tais como o DISC-1, NRG-1, ERBB4 e DTNBP-1 (36). Dessa forma, ao menos uma parte das alterações do desenvolvimento cerebral na esquizofrenia pode ser devida à expressão anormal de genes essenciais para os processos neurodesenvolvimentais.

Por fim, os achados histológicos mais significativos são negativos na esquizofrenia, indicando se tratar (ao menos inicialmente), possivelmente, de uma neuropatologia não degenerativa (29). Não se observam emaranhados

neurofibrilares, placas amilóides ou corpúsculos de Lewy, mesmo em pacientes com alterações cognitivas graves; além disso, também não se evidencia gliose, o que contrariaria um eventual processo degenerativo contínuo e aponta uma provável origem neurodesenvolvimental para a doença (29).

1.3. Os estudos de neuroimagem

A falta de achados neuropatológicos consistentes obtidos através dos métodos disponíveis para o estudo da esquizofrenia antes do advento dos exames mais sofisticados de neuroimagem, bem como os resultados conflitantes e desapontadores encontrados até então, diminuíram o interesse pela pesquisa da neuropatologia da doença até meados da década de 1970 (37), quando então Johnstone *et al.* publicaram o primeiro estudo demonstrando aumento ventricular significativo em pacientes com esquizofrenia através da tomografia computadorizada (38). Desde então, nesse curto espaço de tempo, sobretudo após o advento da imagem por ressonância magnética (RM) e o primeiro estudo de RM na esquizofrenia publicado por Smith *et al.* em 1984 (39), inúmeros progressos vêm sendo alcançados e levado à descoberta de mais alterações cerebrais do que em qualquer outro período da história da pesquisa da doença (37).

O envolvimento de diversas regiões cerebrais vem sendo descrito através do estudo com RM, incluindo aumento ventricular, diminuição do volume total cerebral e déficits regionais do volume cerebral nas regiões frontais, temporais e

parietais (37, 40, 41). Na ampla revisão de literatura publicada em 2001 por Shenton *et al.* (37), incluindo 193 estudos de RM, os achados mais frequentes foram aumento dos ventrículos laterais (80% dos estudos) e do terceiro ventrículo (73% dos estudos), bem como envolvimento de estruturas do lobo temporal medial (amígdala, hipocampo e giro parahipocampal) (74% dos estudos), regiões do lobo temporal neocortical (giro temporal superior) (100% dos estudos), e lobos frontal e parietal (59% e 60% dos estudos, respectivamente). Alterações de estruturas subcorticais também foram descritas, incluindo o *cavum* do septo pelúcido em 92% dos estudos, núcleos da base em 68%, corpo caloso em 63% e tálamo em 42%. Tais alterações continuam sendo descritas como significantes em metanálises mais recentes (42, 43).

Na metanálise de Wright *et al.*, por exemplo, de 2000, incluindo 58 estudos e um total de 1588 pacientes, o volume cerebral médio dos pacientes com esquizofrenia foi 2% menor que o observado em pacientes sem a doença (44). É importante mencionar que as alterações estruturais são observadas não apenas na esquizofrenia crônica, mas também na esquizofrenia de primeiro episódio, o que permite denotar que, ao menos em certo grau, tais alterações estão presentes desde o início da doença. Steen *et al.*, em metanálise de 2006, considerando 52 estudos incluindo um total de 1424 pacientes com primeiro episódio psicótico de esquizofrenia, relataram significativa redução do volume cerebral médio total e do hipocampo nesses pacientes, assim como significativo aumento do volume ventricular (45).

1.4. A introdução da análise estrutural por morfometria baseada no voxel

Inicialmente, o método empregado para definir a distribuição das alterações estruturais cerebrais na esquizofrenia consistia no exame de regiões de interesse (*ROI, regions of interest*) pré-definidas em diversas áreas cerebrais; apesar disso, tal método apresentava algumas limitações importantes. Em primeiro lugar, a delimitação manual da região de interesse em diversos cortes cerebrais demandava considerável quantidade de tempo, e prejudicava a comparação de múltiplas regiões cerebrais em diferentes imagens para determinada amostra de pacientes; assim, o número de pacientes nesses estudos tendia a ser menor, e havia a possibilidade de não se detectar alterações que porventura existissem fora da área de interesse estudada. Além disso, a variabilidade estrutural entre indivíduos distintos e a complexidade da neuroanatomia a ser estudada gerava um viés, já que a delimitação para determinada região de interesse variava entre pesquisadores (46). Dessa forma, passou-se a buscar métodos que possibilitassem uma definição automática e objetiva das diversas regiões cerebrais.

Em 1995, a partir de uma técnica morfométrica utilizada em estudos de tomografia por emissão de pósitrons (PET) que envolvia a transformação espacial de imagens suavizadas do fluxo cerebral em um espaço estereotáxico padronizado e uma subsequente análise tridimensional baseada no voxel através de mapas estatísticos paramétricos, Wright *et al.* descreveram uma nova técnica que permitia a caracterização regional de diferenças estruturais das substâncias

cinzenta e branca a partir de dados obtidos por RM em um grupo de 15 pacientes com esquizofrenia (47), que passou a se denominar morfometria baseada no voxel (*VBM, voxel-based morphometry*). Em relação ao método ROI usado até então, o método VBM passou a permitir análise de maior número de estruturas mais rapidamente e eliminou o viés do observador (46, 48, 49).

Conforme definiram Ashburner & Friston (46), o método VBM consiste em uma comparação voxel a voxel da concentração (ou densidade) local de substância cinzenta entre dois grupos de indivíduos. A técnica consiste na normalização espacial das imagens para um mesmo espaço estereotático padrão, a segmentação das imagens normalizadas em substâncias cinzenta, branca e líquido cefalorraquidiano, suavização das imagens por um filtro gaussiano, e finalmente a análise estatística baseada em um modelo linear geral (46).

Desde que foi descrito, diversos estudos vêm empregando o método VBM para identificar alterações estruturais em patologias variadas, inclusive na esquizofrenia. Em uma metanálise de 2005, Honea *et al.* (42) incluíram 15 estudos (12 estudos envolvendo pacientes com esquizofrenia crônica e 3 estudos sobre esquizofrenia de primeiro episódio), com um total de 390 pacientes e 364 controles; foram encontrados déficits de substâncias cinzenta ou branca em 50 regiões cerebrais. Contudo, apenas duas regiões se mostraram reduzidas em mais de 50% dos estudos: o lobo temporal medial esquerdo (em nove estudos) e o giro temporal superior esquerdo (em oito estudos); outras regiões se mostraram reduzidas em quase 50% dos estudos: giros frontais medial e inferior esquerdos, giro temporal superior direito e giro parahipocampal esquerdo.

1.5. A hipótese do processo neurodegenerativo associado e a importância da diferenciação entre esquizofrenia crônica e de primeiro episódio

Embora as evidências atuais apontem para o processo neurodesenvolvimental da esquizofrenia e os estudos histopatológicos não demonstrem alterações neurodegenerativas clássicas (29), alguns estudos mostram que as alterações estruturais observadas na doença podem eventualmente progredir ao longo do tempo; assim, a hipótese de um processo neurodegenerativo associado ocorrendo ao longo do curso da doença vem sendo considerada. Nesse sentido, Ho *et al.* (50) estudaram longitudinalmente 73 pacientes (53 homens e 20 mulheres) com esquizofrenia de início recente em dois momentos distintos: em um período próximo ao diagnóstico e após seguimento médio de três anos; o grupo controle se constituiu de 23 indivíduos; os autores encontraram uma redução progressiva do volume de substância branca no lobo frontal associada a um aumento concomitante do volume de líquido cefalorraquidiano desta região, em um ritmo significativamente mais rápido do que o observado entre os controles; além disso, os pacientes com pior situação clínica apresentaram maior aumento ventricular ao longo do tempo em relação aos pacientes clinicamente melhores.

Outros estudos também vêm demonstrando isoladamente a progressão das alterações cerebrais em subgrupos específicos de pacientes com esquizofrenia, incluindo-se aí pacientes com esquizofrenia de primeiro episódio (51) e esquizofrenia com primeira manifestação ocorrendo na infância (52). Kempton *et*

al. (53), em 2010, realizaram uma interessante metanálise compreendendo apenas estudos longitudinais avaliando a questão da progressão das alterações estruturais na esquizofrenia através de um dos achados mais comuns relatados nos diversos estudos, que é o aumento ventricular; treze estudos que abordaram a questão foram incluídos. Os autores confirmaram haver uma progressão significativa do volume ventricular ao longo dos anos desde a primeira manifestação da doença, e argumentam que tal constatação representa um desafio a um modelo exclusivamente neurodesenvolvimental da doença (53).

1.6 O papel da medicação sobre a progressão das alterações estruturais

A partir da demonstração pelos estudos longitudinais de que pacientes com esquizofrenia apresentam uma progressão gradual das alterações estruturais cerebrais, novos estudos passaram a buscar eventuais fatores que pudessem ser implicados nesse fenômeno; tais fatores ainda não estão claros e são objetos de debate. À medida que muitos dos estudos evidenciando progressão das alterações estruturais foram realizados em pacientes recebendo tratamento com drogas antipsicóticas, e à medida que foi se constatando que não obstante o tratamento adequado e a eficácia observada na redução dos sintomas psicóticos, ainda assim a progressiva perda tecidual se mantinha e, muitas vezes, havia ainda persistência dos sintomas negativos e cognitivos (54), o papel potencial dos antipsicóticos sobre tais alterações neurodegenerativas passou a ser estudado.

Conforme explicitou Lewis recentemente (55), passou-se a interrogar em qual medida essas alterações são acentuadas, mascaradas ou explicadas pelo tratamento com drogas antipsicóticas; ainda segundo Lewis, estabelecer conclusões a partir dos estudos existentes na literatura é desafiador e, de fato, não permite interpretações mais incisivas, talvez pela limitação fundamental no estudo desta questão, que é a impossibilidade óbvia de se comparar indivíduos com esquizofrenia recebendo drogas antipsicóticas e indivíduos saudáveis recebendo a mesma carga de drogas antipsicóticas (55), o que permitiria a avaliação isolada do impacto da medicação. Ainda assim, deve-se mencionar que se precisaria levar em consideração nessa diferenciação fatores como a especificidade da interação entre as drogas antipsicóticas e o cérebro esquizofrênico, com seu curso progressivo de alterações estruturais demonstradas ainda mesmo durante o início da doença (56).

Nesse sentido, alguns estudos experimentais realizados em animais demonstraram achados interessantes. Konopaske *et al.*, em dois estudos sucessivos, de 2007 e 2008 (57, 58), avaliaram o efeito da exposição crônica a antipsicóticos sobre o número de células no córtex parietal de macacos, demonstrando redução do volume de substância cinzenta e do número de células gliais, reforçando uma eventual importância do uso de antipsicóticos sobre as alterações cerebrais observadas na esquizofrenia.

Posteriormente, em 2009, duas revisões sistemáticas da literatura sobre o mesmo tema foram realizadas. Navari & Dazzan (59) incluíram 33 estudos que relacionavam diretamente alterações cerebrais e uso de drogas antipsicóticas ou

que comparavam pacientes com uso crônico destas drogas em relação a pacientes com diagnóstico recente ou controles saudáveis; para os autores, a literatura recente sugere que os antipsicóticos atuam mais regionalmente do que globalmente sobre o cérebro, que as alterações cerebrais são mais consistentes quando do uso de antipsicóticos típicos em relação aos atípicos, e que o tratamento antipsicótico contribui potencialmente para as alterações estruturais observadas nas psicoses (59). Smieskova *et al.* (60) incluíram 30 estudos compreendendo pacientes com esquizofrenia recebendo tratamento antipsicótico (sendo 24 estudos longitudinais); os autores reforçam a conclusão de que o tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos pode afetar regionalmente o volume de substância cinzenta (60). Mais recentemente, em uma metanálise também envolvendo estudos longitudinais, Fusar-Poli *et al.* (61) demonstraram reduções volumétricas de substância cinzenta correlacionando-se inversamente à exposição cumulativa a antipsicóticos, enquanto que as variáveis duração da doença e gravidade psicopatológica não apresentaram correlações significativas; os autores concluem que, em certa extensão, tais alterações estruturais podem estar associadas ao uso de antipsicóticos. Finalmente, em nossa própria metanálise sobre a questão (62), envolvendo dez estudos (metade dos quais longitudinais) de VBM através do método *activation likelihood estimation*, pudemos precisar as áreas cerebrais onde alterações estruturais têm sido mais significativamente e especificamente associadas ao uso de antipsicóticos; as áreas de reduções envolveram o córtex temporal lateral esquerdo, giro frontal inferior esquerdo, giro frontal superior esquerdo (com extensão para o giro frontal médio

ipsilateral) e giro reto direito; aumentos volumétricos foram encontrados no córtex cingulado anterior dorsal esquerdo, córtex cingulado anterior ventral esquerdo e putame direito.

No maior estudo longitudinal realizado até o momento abordando esta questão, Ho *et al.* (2011) (54), acompanharam por um período médio de 7,2 anos 211 pacientes com esquizofrenia (192 pacientes) ou transtorno esquizoafetivo (19 pacientes) com um total de 674 exames de RM, avaliando quatro fatores causais potenciais que pudessem mediar a progressão das alterações cerebrais, quais sejam: duração da doença, tratamento antipsicótico, gravidade da doença e uso de álcool/substâncias. Após ajuste estatístico para controle dos efeitos das três outras variáveis, a maior intensidade do tratamento antipsicótico se associou significativamente com redução regional e global do volume cerebral; os autores concluem que a associação destes achados àqueles observados em estudos experimentais com animais sugere que o uso de antipsicóticos e a duração do tratamento possuem um efeito sobre a progressão das alterações estruturais cerebrais nesses pacientes (54).

1.7 Os novos estudos colaborativos de VBM e a combinação de dados multicêntricos e de múltiplos estudos

Uma limitação considerável apresentada por estudos envolvendo pacientes com esquizofrenia diz respeito à dificuldade em se reunir grandes amostras de indivíduos; as causas principais dessa dificuldade envolvem a questão do esforço

de recrutamento e barreiras impostas pela infra-estrutura, à medida que maiores amostras demandam mais recursos humanos, logísticos e financeiros. A consequência dessa limitação é a redução do poder estatístico para detecção de alterações estruturais cerebrais (42). Recentemente, tem-se avaliado a eficácia em se combinar dados de diferentes estudos de VBM na tentativa de se obter amostras maiores, o que acarretaria o aumento do poder estatístico e a potencial detecção de diferenças estruturais sutis, mas significantes (63, 64). Embora tais estudos combinatórios de dados de RM estrutural venham sendo realizados principalmente nos campos da doença de Alzheimer e do envelhecimento (65, 66), raros estudos internacionais realizaram tal abordagem na esquizofrenia até o momento e, segundo sabemos, nenhum no Brasil.

Um importante estudo internacional nesse sentido foi publicado por Segall *et al.* em 2009 (63). Nesse estudo colaborativo, os autores reuniram dados de dois estudos multicêntricos distintos, o *Functional Biomedical Informatics Research Network* (fBIRN) e o *Mind Clinical Imaging Consortium* (MCIC). A análise foi efetuada tanto separadamente (para cada estudo) quanto conjuntamente (somando-se as 13 amostras distintas de pacientes das 9 localidades dos dois estudos). O fBIRN incluía 121 pacientes com esquizofrenia e 123 controles, ao passo que o MCIC incluía 149 pacientes com esquizofrenia e 163 controles, totalizando, após exclusão de indivíduos repetidos, uma ampla amostra com 503 indivíduos (237 pacientes e 266 controles). Cumpre-se notar a heterogeneidade dos parâmetros técnicos de RM e de protocolos adotados, já que as imagens foram obtidas em aparelhos de fabricantes diversos, com diferentes

campos de intensidade (1,5T, 3T, 4T) e emprego de diferentes sequências de pulso. Um dos achados cruciais do estudo se refere justamente ao fato de não ter havido interações significantes entre a heterogeneidade extrema dos aparelhos e protocolos empregados e as diferenças estruturais observadas entre os grupos estudados. Quanto às diferenças estruturais observadas, o estudo descreve achados descritos previamente (lobo temporal superior, medial, inferior; tálamo; regiões hipocampais; cíngulo anterior), além de áreas específicas dos lobos frontal e parietal (63). Em continuação ao estudo prévio de Segall *et al.* (63), Gupta *et al.* (64) publicaram, mais recentemente, em 2015, um estudo usando uma amostra maior, parte dela derivada do fBIRN e MCIC, mas desta vez com adição de amostras europeias, totalizando 1720 sujeitos (784 pacientes e 936 controles), detectando reduções envolvendo a totalidade das regiões cerebrais em um único cluster.

Em conclusão, os resultados desses estudos fornecem um embasamento para o emprego da análise morfométrica baseada no voxel a dados provenientes de diferentes estudos, locais e aparelhos, levando a uma detecção consistente de alterações estruturais em pacientes com esquizofrenia (63).

1.8 A importância dos estudos transversais

Embora os estudos longitudinais venham sendo preferencialmente empregados na investigação a respeito da estabilidade ou progressão das alterações estruturais cerebrais na esquizofrenia, os estudos transversos podem

fornecer contribuições úteis para melhor compreensão do tema (67). Comparações transversais de cortes de pacientes com esquizofrenia de primeiro episódio e crônica são interessantes porque, caso haja alterações cerebrais mais generalizadas na esquizofrenia crônica em relação à de primeiro episódio, poder-se-ia hipotetizar sobre uma progressão das alterações estruturais cerebrais após o início da doença (68). Além disso, se de fato a extensão dessas alterações no primeiro episódio for mais restrita, poder-se-ia identificar especificamente um circuito regional crítico a partir do qual as alterações poderiam evoluir para níveis mais generalizados (68). No entanto, a abordagem transversal tem sido aplicada, até o momento, principalmente em estudos de metanálise, que nada mais fazem que comparações indiretas entre estes dois grupos de pacientes (42, 68-71). Por outro lado, estudos transversais originais de RM comparando diretamente pacientes crônicos e de primeiro episódio a controles selecionados a partir da mesma área geográfica são bastante escassos (72).

1.9 Limitações do conhecimento atual

A despeito de décadas de estudos de neuroimagem estrutural da esquizofrenia, ainda não está claro na literatura se as alterações estruturais cerebrais repetidamente demonstradas por vários destes estudos são de caráter estático ou progressivo (4, 69-71, 73-75).

No caso de eventualmente tais alterações possuírem caráter progressivo, igualmente não se encontra claro se a progressão é inerente a uma eventual

neurodegeneração intrínseca à doença ou um produto de uma série de fatores clínicos como gravidade, uso de antipsicóticos, etc (4). De fato, os dados atuais permitem inferir que tais alterações não dependem exclusivamente da existência da doença, mas também de uma série de fatores potenciais que poderiam mediar sua progressão (50), embora quais sejam esses fatores permaneça objeto de controvérsias e estudos (50, 61, 62).

Cumprе salientar que os estudos relatando alterações estruturais na esquizofrenia muitas vezes têm incluído, sem diferenciação, uma ampla variedade de pacientes que diferem quanto a múltiplos fatores, como uso de drogas antipsicóticas, tipo de antipsicótico, duração do tratamento medicamentoso, idade de manifestação da doença, bem como gravidade clínica da doença (42). Não raramente, tais estudos incluem, sem distinção, pacientes crônicos e de primeiro episódio (76-78), não relatam explicitamente a duração da doença (79-81), ou mesmo não aplicam critérios rigorosos para definir esses grupos de pacientes em relação ao estágio temporal da doença (82).

Ademais, os próprios achados de alterações estruturais cerebrais em pacientes com esquizofrenia relatados na literatura são muitas vezes inconsistentes e variam entre as regiões cerebrais de estudo para estudo, muitas vezes não sendo identificáveis em estudos posteriores, realizados com outros grupos de pacientes (53). Além dos fatores já citados, uma série de outros parâmetros pode contribuir para essa variabilidade, incluindo diferenças nos métodos de análise empregados, variações relacionadas à própria doença, e, possivelmente, tamanho reduzido da amostra. Destaca-se que a maioria dos

estudos inclui amostras com menos de 80 indivíduos no total (somando-se os pacientes com esquizofrenia e os controles) (83), o que representa uma limitação importante e diminui o poder estatístico nas análises efetuadas. Tal limitação pode ser enfrentada não somente com a estratégia da combinação de dados de múltiplos estudos unicêntricos, mas também com a combinação de dados multicêntricos (63). Os estudos usando a metodologia da morfometria baseada no voxel claramente produzem resultados melhores em pacientes cuidadosamente distribuídos em grupos homogêneos (83); portanto, é provável que novos estudos passem a relatar alterações estruturais mais consistentes se tal metodologia for aplicada a grupos de pacientes bem caracterizados quanto a esses fatores (42, 83).

2 Justificativas

2. JUSTIFICATIVAS

1. Dada a ampla variabilidade das alterações estruturais relatadas em estudos prévios, e a notável inconsistência dos achados relatados entre os mesmos, estudos adicionais sobre o tema que incluam amostras de pacientes com melhor caracterização quanto ao tempo de doença (inclusive com diferenciação entre as formas crônica e de primeiro episódio) são fundamentais.
2. Dado que em sua maioria os estudos relatando a presença de alterações estruturais cerebrais e a progressão dessas alterações ao longo do tempo envolvem amostra limitada de indivíduos, com limitado poder estatístico e conseqüente perda de detecção de alterações sutis, são necessários novos estudos que incluam amostras maiores de pacientes e controles. A estratégia de combinação de dados de múltiplos estudos tem-se demonstrado válida e importante, mas poucos estudos internacionais a adotaram até o momento, nenhum deles tendo se realizado no Brasil ou empregando dados de populações brasileiras; além disso, não há até o presente momento estudos publicados com combinação de dados multicêntricos brasileiros de VBM na esquizofrenia.
3. O impacto do uso e do tempo de uso de medicamentos antipsicóticos sobre as alterações estruturais observadas na doença, avaliado até o momento em uma

pequena parcela de estudos, precisa ser mais bem caracterizado com estudos adicionais em diferentes populações. Outros potenciais moderadores clínicos, como gravidade da doença, também precisam ser ponderados.

4. Os estudos já publicados até o momento aplicando a morfometria baseada no voxel para detecção de alterações estruturais na esquizofrenia foram realizados empregando versões anteriores do software SPM (SPM99, SPM2 e SPM5). O lançamento da versão SPM8, em abril de 2009, proporcionou importantes melhoras algorítmicas e estruturais, e o emprego da referida versão poderá determinar um avanço na detecção de alterações estruturais em relação aos estudos prévios.

3 Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 *Objetivo primário*

O presente estudo tem por objetivo identificar e descrever padrões de alterações estruturais da substância cinzenta cerebral através de imagens por ressonância magnética com aplicação da metodologia de morfometria baseada no voxel a uma ampla amostra multicêntrica de indivíduos crônicos e de primeiro episódio, através da combinação de dados de múltiplos estudos.

3.2 *Objetivos secundários*

- ❖ Caracterizar e comparar as alterações estruturais cerebrais através da diferenciação entre as formas crônica e de primeiro episódio de esquizofrenia, permitindo o delineamento do padrão de alterações observadas na doença ao longo do tempo.
- ❖ Estimar o impacto de potenciais moderadores clínicos (uso e tempo de uso de medicamentos antipsicóticos, gravidade e duração da doença) sobre as alterações estruturais cerebrais.

4 Casuística e Métodos

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Casuística

O estudo foi do tipo transversal, multicêntrico, e incluiu exames de RM disponíveis no banco de dados do Laboratório de Neuroimagem em Psiquiatria (LIM-21) do Instituto de Psiquiatria (IPq) do Hospital das Clínicas da FMUSP (HC-FMUSP). Os dados de pacientes e controles pertencem originalmente a quatro estudos prévios realizados no HC-FMUSP, em São Paulo, bem como no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP). Todos os estudos foram originalmente desenhados com diferentes questões de pesquisa e seus resultados foram separadamente publicados na literatura médica internacional (84-87). Durante a fase de realização de cada estudo original, todos os participantes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido. O presente estudo teve sua realização aprovada pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do HC-FMUSP (Anexo A).

Foram inclusos 312 sujeitos únicos (isto é, não-repetidos entre os quatro estudos), sendo 161 pacientes com esquizofrenia (99 crônicos e 62 de primeiro episódio) e 151 controles, submetidos a exames de RM em scanners de 1,5T em que foram obtidas sequências ponderadas em T1 para estudo volumétrico.

Seguindo critérios rígidos de definição de cronicidade da amostra (70), procurou-se assegurar que nas amostras selecionadas a duração mediana da doença fosse significativamente superior no grupo dos crônicos (≥ 5 anos) (84, 85, 87) em comparação à do grupo de primeiro episódio (≤ 1 ano) (86).

Os pacientes com esquizofrenia crônica foram recrutados em unidades ambulatoriais e hospitalares do Ipq-HCFMUSP (84, 87) e do HCFMRP-USP (85). Os pacientes com esquizofrenia de primeiro episódio (86), por outro lado, foram recrutados a partir de uma amostra de indivíduos com primeiro episódio psicótico identificados em um estudo epidemiológico prévio sobre a incidência de psicoses na cidade de São Paulo (88); tal estudo epidemiológico envolveu uma área geográfica circunscrita do município (onde viviam aproximadamente 900.000 habitantes) e recrutou, por meio de busca ativa, indivíduos em episódio psicótico e em primeiro atendimento pelo respectivo serviço de atenção à saúde mental daquela região (88).

4.1.1 Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão para pacientes com esquizofrenia foram:

- a) Diagnóstico de esquizofrenia através dos critérios do DSM-IV (28) (referência à época de condução dos estudos originais) com base em avaliações pela Entrevista Clínica Estruturada para Transtornos de Eixo I do DSM-IV (*Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders, Patient Edition*, SCID-P) (89);
- b) Idade entre 18 e 50 anos em três dos estudos originais (85-87), ou entre 18 e 60 anos, em um dos estudos originais (84).

Em três dos estudos originais (84, 85, 87) os controles foram recrutados junto à comunidade local através de anúncios ou de convites pessoais por parte dos autores e/ou responsáveis pela pesquisa, sendo que um destes estudos também empregou controles que são membros e funcionários do IPq-HCFMUSP (87). O estudo de primeiro episódio (86), por outro lado, com o intuito de evitar viés de seleção, empregou uma abordagem epidemiológica para recrutamento de controles mediante a seleção randomizada de pessoas sem psicoses vivendo na mesma área geográfica (vizinhos) em que foram selecionados os pacientes (32). A ausência de psicoses nos controles saudáveis também foi avaliada pelo SCID-P.

4.1.2 Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão comuns tanto a pacientes quanto a controles foram:

- a) História de traumatismo crânio-encefálico (84-87);
- b) História de doenças neurológicas ou de doenças sistêmicas com envolvimento do sistema nervoso central (84-87);
- c) História de tratamento prévio com corticosteroides (84);
- d) Contra-indicações à realização do exame de RM (84-87);
- e) Outras doenças orgânicas relevantes (85);
- f) Uso de substâncias ilícitas (84, 85).

Além disso, pacientes com psicoses decorrentes de uma doença orgânica ou de abuso de substâncias ilícitas também foram excluídos.

4.1.3 Dados demográficos e clínicos

Para o estudo foram consideradas as seguintes variáveis gerais em relação aos pacientes e à doença:

- a) idade e sexo (também para os controles);
- b) escolaridade (também para os controles);
- c) idade de manifestação da doença;
- d) tempo de doença.

Os sintomas e a evolução clínica dos pacientes também foram variáveis consideradas, cuja avaliação deu-se através de uma ou mais das seguintes escalas nos estudos originais:

- a) *Positive and Negative Syndrome Scale* (90);
- b) *Brief Psychiatric Rating Scale* (91, 92);
- c) *Negative Symptom Rating Scale* (93).

Em função dessa heterogeneidade entre as escalas de gravidade da doença, optou-se por escolher os escores totais da escala PANSS (90) como

parâmetro de gravidade psicopatológica da doença, uma vez que este foi utilizado de maneira comum a três dos estudos (84, 86, 87), à exceção de um (85).

Em relação aos medicamentos antipsicóticos, foram abordadas as seguintes variáveis:

- a) Classe (típicos x atípicos);
- b) Tempo de uso;
- c) Dose utilizada no momento da realização do exame de RM;
- d) Dose cumulativa estimada ao longo da vida.

Considerando-se que os pacientes com esquizofrenia são mantidos em longos regimes terapêuticos medicamentosos com antipsicóticos ao longo de toda a vida, faz-se importante a estimativa da exposição cumulativa, sobretudo quando estudos recentes vêm demonstrando uma potencial associação entre alterações estruturais cerebrais e uso de antipsicóticos (54, 59, 60, 62, 94).

Os seguintes procedimentos foram realizados para cálculo da exposição cumulativa estimada aos antipsicóticos:

- a) Conversão das doses utilizadas de antipsicóticos para unidades equivalentes de clorpromazina (CPZ), conforme a tabela de equivalências proposta por Andreasen *et al.* (95) constante no Anexo B;

b) Subsequentemente, para cada paciente, a exposição cumulativa expressa em anos-dose, foi calculada com base na seguinte fórmula, conforme proposto por Andreasen *et al.* (95), onde Y é o valor estimado em anos-dose:

$$Y = \left((\text{Dose em mg/dia}) \frac{100\text{mg CPZ}}{\text{Equivalência em CPZ}} \right) \times \left((\text{Dias em uso}) \frac{1 \text{ ano}}{365,25 \text{ dias}} \right) \times \left(\frac{1 \text{ ano_dose}}{(100\text{mg CPZ/dia}) * 1 \text{ ano}} \right)$$

O conceito de anos-dose, conforme se pode apurar da expressão, é similar ao de “anos-maço” usado para indivíduos tabagistas, em que a exposição tabágica é calculada multiplicando-se o número de maços fumados por dia pelo número de anos de tabagismo. Procurou-se empregar, no presente estudo, o método proposto por Andreasen *et al.* (95) em função dos seguintes fatores: a) embora haja métodos de equivalência mais antigos, estes esbarram em algumas limitações; aquele proposto por Davis em 1974 (96), por exemplo, não contempla os antipsicóticos atípicos; b) já o proposto por Woods em 2003 (97), por exemplo, foi baseado em alguns poucos ensaios clínicos controlados por placebo e com dose fixa (alguns dos quais já não refletindo as tendências de doses da prática clínica atual), e que geralmente empregavam pacientes relativamente crônicos (logo não necessariamente extensíveis à toda população de pacientes com esquizofrenia, sobretudo em contextos mais agudos) (95). O modelo aqui empregado, portanto, tem as vantagens de ser atual, mais simples de ser calculado, é validado empírica e estatisticamente, inclusive com consenso de 47

especialistas, e é mais generalizável, podendo ser empregado a uma ampla gama de populações, de agudas a crônicas (95), escopo do presente estudo.

Ressalta-se, finalmente, que o antipsicótico e dose utilizados são escolhidos de forma naturalística pelo psiquiatra assistente dos pacientes, o que torna invivável em estudos da natureza do presente (avaliação retrospectiva de prontuários, que pode conter dados heterogêneos quanto à história medicamentosa) uma elevada acurácia sobre a dose cumulativa estimada. Portanto, a dose cumulativa estimada aqui utilizada é um produto da dose definida diária (conforme constante nos prontuários) e da duração da doença, índice que pode ser considerado uma medida relativamente aproximada da exposição cumulativa a antipsicóticos ao longo da vida (98).

4.2 Métodos

4.2.1 *Protocolo de aquisição das imagens de RM estrutural*

As imagens de RM estrutural do banco de dados do presente estudo foram adquiridas no HC-FMUSP utilizando-se os seguintes protocolos:

- a) Aparelho *Philips Gyroscan S15-ACS* 1,5 T (Philips Medical Systems, Eindhoven, Holanda); sequência T1 fast-field echo, cortes coronais com espessura de 1,2 mm, TR= 30 mseg, TE= 9 mseg, *flip angle* = 30°, field of

view (FOV)=240mm, matriz = 256x256. Este estudo envolveu 35 pacientes com esquizofrenia crônica e 15 controles, totalizando 50 sujeitos (84).

- b) Aparelho *Siemens Magnetom Vision* 1,5 T (Siemens, Erlanger, Alemanha); sequência T1-3D-FLASH (three-dimensional fast low angle shot), cortes sagitais com espessura de 1,0 mm, TR=9,7 msec, TE= 4 msec, *flip angle* = 12°, FOV= 256 mm, matriz =256x256. Este estudo envolveu 20 pacientes com esquizofrenia crônica e 16 controles, totalizando 36 sujeitos (85).
- c) Aparelho *General Electric Signa Horizon* 1,5 T (General Electric, Milwaukee, EUA); sequência T1-spoiled gradient echo, cortes axiais com espessura de 1,5 mm, TR= 21,7 msec, TE= 5,2 msec, *flip angle* = 20°, FOV= 220 mm, matriz =256x192. Este estudo envolveu 62 pacientes com esquizofrenia de primeiro episódio e 94 controles, totalizando 156 sujeitos (86).
- d) Aparelho *General Electric Signa Horizon* 1,5 T (General Electric, Milwaukee, EUA); sequência T1-spoiled gradient echo, cortes sagitais com espessura de 1,2 mm, TR= 9,0 msec, TE= 1,9 msec, *flip angle* = 20°, FOV= 220 mm, matriz =256x192. Este estudo envolveu 44 pacientes com esquizofrenia crônica e 26 controles, totalizando 70 sujeitos (87).

4.2.2 Pré-processamento das imagens

Previamente ao processamento das imagens, foi realizada inspeção visual das mesmas para detecção de alterações anatômicas e estruturais grosseiras, artefatos ou déficits de qualidade que pudessem interferir no processamento.

Em seguida as imagens de RM estrutural foram submetidas a um pré-processamento, que consistiu nas seguintes etapas:

- a) Conversão do padrão DICOM para o formato NIfTI-1 (padrão utilizado pelo software SPM8)
- b) Redefinição do ponto central da imagem através da ferramenta de visualização do software SPM8, com movimentação (em milímetros) e rotação (em radianos) nos três eixos (x, y, z). A comissura anterior (Figura 1) é determinada como ponto de origem [$f(x, y, z) = (0,0,0)$] (Figura 2).

Figura 1. Representação esquemática de um corte sagital cerebral; a comissura anterior é mostrada em vermelho, e a comissura posterior em amarelo.
(Retirado de <http://imaging.mrc-cbu.cam.ac.uk/imaging/FindingCommissures>).

Figura 2. Definição da comissura anterior como ponto de origem, que se localiza na intersecção virtual das três linhas azuis.

4.2.3 Processamento das imagens

O processamento das imagens foi realizado pelo software *Statistical Parametric Mapping*, versão 8 (SPM8, Wellcome Trust Centre for Neuroimaging, London, UK) (<http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/software/spm8/>), sob a plataforma do programa MATLAB 7.12 (R2011a). Resumidamente, as seguintes etapas foram executadas:

- a) Normalização espacial: consiste em alinhar dentro de um espaço-padrão as imagens adquiridas; tal espaço-padrão é definido por uma imagem modelo que, no software SPM, é conformada a um espaço definido com base em imagens adquiridas no projeto P-20 do *International Consortium for Brain Mapping* (ICBM) do NIH (*National Institutes of Health*, EUA), e que se aproxima do espaço descrito no atlas de Talairach e Tournoux (99). Esta etapa reduz a variabilidade individual das dimensões cerebrais para permitir comparações posteriores entre os grupos estudados.
- b) Segmentação: as imagens foram submetidas à segmentação automática em compartimentos de substância cinzenta, substância branca e líquido cefalorraquidiano, com base em três imagens probabilísticas pré-definidas (uma de cada compartimento) e no cálculo subsequente da probabilidade de haver a substância estudada em cada voxel da imagem original; assim, a intensidade de cor resultante corresponde à probabilidade de haver, em cada local, a substância estudada. O algoritmo DARTEL (Diffeomorphic Anatomical Registration using Exponentiated Lie Algebra) foi utilizado nas etapas de pré-processamento, a fim de aumentar a precisão da segmentação (100).

- c) Suavização: em seqüência, as imagens segmentadas foram submetidas a um processo de suavização pelo método de filtro gaussiano de 8mm usado pelo SPM; a suavização reduz as variações anatômicas interindividuais dos sulcos e giros cerebrais.

4.2.4 Pós-processamento

Após o processamento, procedeu-se à checagem de todos os registros (imagens geradas após o processamento) dos compartimentos c1 – substância cinzenta, c2 – substância branca, c3 - líquido, rc1 – substância cinzenta, rc2 – substância branca, rc3 - líquido, smwc1 - substância cinzenta e smwc2 – substância branca. Além disso, com o objetivo de se garantir que todas as imagens foram adequadamente segmentadas, realizou-se busca de outliers dentro de cada amostra isoladamente e através das quatro amostras em conjunto; para isso, através de correlações de Pearson, verificou-se se o volume de substância cinzenta de cada sujeito (principal variável de interesse nas análises realizadas no presente estudo) apresentava desvio superior a 2% em relação à média do mapa suavizado do grupo, conforme definição adotada por outros autores (63); nenhum outlier foi identificado.

4.2.5 Extração de volumes globais

Uma vez que para compensação dos efeitos da normalização espacial as imagens normalizadas de substância cinzenta e branca são moduladas mediante a multiplicação do valor voxel-a-voxel pelo volume relativo pré- e pós-*warping* (deformação), o que se obtém na prática, ao final, são volumes relativos voxel-a-voxel. Dessa forma, os mapas resultantes desse procedimento são imagens volumétricas das substâncias cinzenta e branca, diferentemente das imagens de concentração (densidade) que são obtidas quando se omite o processo de modulação (63, 101).

Nesse sentido, no presente estudo os volumes relativos de substâncias cinzenta, branca e líquido cefalorraquidiano foram calculados, para cada sujeito, através de um script (`get_totals`) disponível no software MATLAB (http://www.cs.ucl.ac.uk/staff/g.ridgway/vbm/get_totals.m) especificamente implementado ao SPM8. Derivou-se, a partir daí, o volume intracraniano total estimado simplesmente como sendo a soma dos três compartimentos supracitados (102-104). De maneira similar, o volume cerebral total foi calculado como sendo a soma dos compartimentos de substâncias cinzenta e branca (excluindo-se, portanto, o líquido cefalorraquidiano). Cumpre-se destacar, não obstante, que à medida que o SPM8 baseia-se em modelos compartimentais probabilísticos, não é possível haver certeza total de que a soma de tais compartimentos será exatamente consistente com as definições atualmente aceitas de volumes cerebral e intracraniano totais (104). Estudos recentes, por

exemplo, vêm demonstrando que esse método automático de estimativa de volumes globais no SPM8 tende a superestimar os referidos valores em comparação aos cálculos derivados da segmentação manual (105). Enquanto essas diferenças parecem exercer certo impacto quando se consideram estruturas diminutas (como os hipocampus, por exemplo) (105), ainda não se encontram disponíveis, na literatura atual, ferramentas comprovadamente mais eficazes nesse processo, motivo pelo qual se optou, no presente estudo, pelo método automatizado de extração de volumes globais. Espera-se que novos algoritmos de segmentação implementados à versão SPM12 possam produzir resultados mais acurados, embora sejam necessários estudos futuros para tal validação (104).

4.2.6 Métodos alternativos de covariação das análises para valores globais de substância cinzenta

Em um estudo seminal recentemente publicado (106), Peelle *et al.* demonstraram que diferenças na forma de se ajustarem os volumes regionais de substância cinzenta para valores globais (ex: substância cinzenta total, no sentido de soma de densidade de substância cinzenta através da totalidade dos voxels) podem determinar um impacto significativo nos resultados e inferências sobre alterações estruturais cerebrais regionais. Para que fossem dirimidas eventuais dúvidas quanto ao impacto de diferentes formas de covariações para valores globais sobre os resultados e inferências do presente estudo, foram realizadas

dezenas de testes experimentais adicionais usando-se três métodos alternativos de covariação para valores globais de substância cinzenta, tais conforme descritos por Peelle *et al.* (106).

Em primeiro lugar, para cada indivíduo participante do estudo, foi calculado o valor de substância cinzenta total (TGM) como a soma das densidades de substância cinzenta através do cérebro inteiro nas imagens originais não-registradas e não-filtradas (106). A seguir, usando-se as definições supracitadas de volume intracraniano total, as seguintes análises comparando pacientes e controles foram realizadas, tanto sem correção quanto com correção para múltiplas comparações: a) ausência de ajuste para TGM, com e sem ponderação para valores de volume intracraniano total; b) escalonamento global (*global scaling*), escalonando-se proporcionalmente a imagem de substância cinzenta original de cada participante pelo valor de TGM (isto é, dividindo-se a imagem normalizada de substância cinzenta de cada participante pelo valor de TGM inerente àquele participante), com e sem ponderação para valores de volume intracraniano total; c) e, finalmente, covariação local, incluindo-se o valor de TGM de cada participante como uma variável *nuisance* adicional nas análises tradicionais de covariância (ANCOVA), também com e sem ponderação para valores de volume intracraniano total (106). A mero título de exemplificação, o anexo C demonstra os resultados de uma fração dessas análises (resultados sem correção para múltiplas comparações, $p < 0.001$, reduções volumétricas, análises pacientes totais x controles). Realizou-se uma avaliação cuidadosa da totalidade dessas análises para se verificar, ao final, se o padrão neuroanatômico principal

das alterações estruturais obtido nas análises convencionais era substancialmente divergente das análises complementares que utilizaram métodos adicionais de covariação global.

4.2.7 Análise estatística

Inicialmente, as diferenças quanto às características demográficas entre os grupos (pacientes totais, pacientes crônicos, pacientes de primeiro episódio e controles) foram analisadas através do teste t de Student para variáveis contínuas e do teste do qui-quadrado para variáveis categóricas, usando-se o software IBM SPSS Statistics, version 21 (IBM, Armonk, EUA), com valor de significância estatística estabelecido a $p < 0,05$.

Em seguida, tanto para o grupo de pacientes totais (grupo conjunto, isto é, crônicos e de primeiro episódio), assim como separadamente para os grupos crônico e de primeiro episódio, foram realizadas análises de correlação de Pearson ($p < 0,05$) entre os valores volumétricos globais supradescritos (substância cinzenta, substância branca, líquido cefalorraquidiano, volume cerebral total, volume intracraniano total) e os seguintes moderadores clínicos potenciais: gravidade psicopatológica da doença (escores totais da escala PANSS após exclusão dos sujeitos de um dos estudos (85)), exposição cumulativa aos antipsicóticos ao longo da vida (expressa em anos-dose), e duração da doença (em dias).

Uma vez tendo sido constatada a adequada realização de todo o processamento, o software SPM8 foi utilizado para a realização de análise

estatística paramétrica voxel-a-voxel do volume cerebral total com base no modelo linear geral através de análises ANCOVA; os valores resultantes em cada voxel foram transformados em escores Z ($Z > 3,09$, $p < 0,001$, sem correção para múltiplas comparações) e dispostos como mapas estatísticos paramétricos, que determinam a localização espacial e a significância estatística das diferenças entre os grupos estudados. Em todas as análises foram incluídos os valores de volume total de substância cinzenta, protocolo de scanner de RM, idade e sexo como variáveis *nuisances* (variáveis de confusão). Em todas as análises, outrossim, foram considerados como significantes apenas os clusters com 20 ou mais voxels contíguos (107, 108). Para todas essas análises foram identificadas as coordenadas de alterações estruturais cerebrais no padrão MNI através da ferramenta *wholebrain* do SPM8; a seguir foi efetuada a identificação anatômica dessas áreas através da ferramenta *toolbox*, *modelaal*; e finalmente a identificação dessas alterações em um mapa (*overlay*) anatômico padrão.

Na análise visual preliminar dos mapas gerados não foram considerados como significantes os voxels com padrões espaciais situados primariamente nas zonas periféricas do cérebro, notadamente nas regiões sabidamente sujeitas a artefatos de volume parcial e a problemas de segmentação deficiente (onde podem ser incluídos voxels oriundos de estruturas ósseas e de partes moles da calota craniana) (64, 78).

Os níveis de inferência estatística aceitos e tabulados nas análises voxel-a-voxel foram conduzidos em duas etapas. Primeiramente, adotou-se um limiar mais rígido de significância estatística, considerando-se como válidos apenas os

resultados sobreviventes às correções para múltiplas comparações (FWE, *familywise error-correction*) através de todo o cérebro. Em um segundo momento, foram realizadas centenas de análises adicionais usando-se a ferramenta SVC (*small volume correction*), buscando-se especificamente alterações em uma série de regiões cerebrais onde estas foram preditas *a priori*. Para isso, um rol de regiões foi identificado mediante consulta a meganálises e metanálises recentes envolvendo estudos de RM estrutural em esquizofrenia (70, 109, 110). As regiões pesquisadas foram, a saber, bilateralmente: ínsula, cortex pré-frontal dorsolateral, giro temporal superior, amígdala, hipocampo/ giro para-hipocampal, córtex cingulado anterior, tálamo e corpo estriado. Essas regiões foram espacialmente delimitadas aplicando-se máscaras de volumes anatômicos normalizados de interesse (disponíveis no SPM) sobre os mapas estatísticos paramétricos. Ainda que esse seja um nível de inferência mais flexível, todas as análises SVC foram aceitas como gerando resultados estatisticamente significantes apenas caso os mesmos tenham sobrevivido a correções para múltiplas comparações (FWE-corrected, $p < 0,05$ sobre o volume SVC em questão, também com limiar de 20 voxels contíguos).

5 Resultados

5. RESULTADOS

5.1 *Dados clínicos e demográficos*

Os dados clínicos e demográficos dos sujeitos envolvidos no estudo encontram-se descritos na Tabela 1. Os grupos de pacientes e controles não diferiram significativamente quanto às médias de idade. O grupo de sujeitos com esquizofrenia apresentou, por outro lado, uma proporção significativamente maior de indivíduos do sexo masculino em comparação ao grupo controle ($p=0,038$), bem como menor escolaridade ($p=0,011$) (Tabela 1).

Na comparação entre pacientes com esquizofrenia crônica e de primeiro episódio não foram observadas diferenças estatisticamente significantes quanto ao sexo, embora os pacientes crônicos tenham apresentado idade ($p=0,001$), escolaridade ($p=0,01$) e escores de gravidade ($p<0,0001$) significativamente maiores, assim como menor idade de início da doença ($p<0,0001$) (Tabela 1).

Os atípicos foram a principal classe de antipsicóticos utilizada no tratamento de pacientes com esquizofrenia crônica, ao passo que os pacientes com esquizofrenia de primeiro episódio foram tratados predominantemente com antipsicóticos típicos ($p<0,0001$) (Tabela 1). Igualmente, devido à cronicidade da doença, os pacientes com esquizofrenia crônica apresentaram maiores índices de exposição cumulativa a antipsicóticos ao longo da vida, na comparação aos pacientes com esquizofrenia de primeiro episódio ($p<0,0001$) (Tabela 1).

Tabela 1. Variáveis clínico-demográficas dos sujeitos incluídos no estudo

Variável	Esquizofrenia			Análise estatística ^a			Controles (N=151)	Análise estatística ^b		
	Crônicos (N=99)	Primeiro episódio (N=62)	Total (N=161)	t ou χ^2	df	p		t ou χ^2	df	p
Sexo, n (%)										
Masculino	67 (67,7)	44 (31,0)	111 (68,9)	0,19	1	0,728	87 (57,6)	4,31 ^a	1	0,038
Feminino	32 (32,3)	18 (29,0)	50 (31,1)				64 (42,4)			
Idade (anos): média ± DP	32,1 ± 8,0	27,7 ± 8,1	30,4 ± 8,3	3,42	129,45	0,001	30,6 ± 9,0	-0,18	304,15	0,857
Escolaridade (anos): média ± DP	10,1 ± 3,1	8,6 ± 3,8	9,5 ± 3,5	2,47	110,17	0,01	10,7 ± 4,7	-2,57	310	0,011
Idade de início (anos): média ± DP	20,2 ± 5,2	26,8 ± 8,1	22,7 ± 7,2	-6,21	159	<0,0001				
Tempo de doença (anos): média ± DP	11,0 ± 8,2	0,48 ± 1,2	5,0 ± 8,5	10,7	159	<0,0001				
Escores PANSS total ^c : média ± DP	62,6 ± 18,4 ^c	47,8 ± 11,9	56,1 ± 17,4 ^c	5,48	139	<0,0001				
Antipsicóticos										
Típicos, n (%)	15 (15,2)	43 (69,4)	58 (36,0)	48,6	1	<0,0001				
Atípicos, n (%)	84 (84,8)	19 (30,6)	103 (64,0)							
Exposição cumulativa estimada ao longo da vida, em anos-dose ^d : média ± DP	4331,5 ± 4988,2	162,4 ± 568,5	2726,0 ± 4416,5	6,55	159	<0,0001				

(a) Pacientes com esquizofrenia crônica x esquizofrenia de primeiro episódio e (b) pacientes com esquizofrenia (grupos total + primeiro episódio) x controles. Variáveis contínuas analisadas pelo teste *t* de Student e variáveis categóricas pelo teste do qui-quadrado.

(c) Dados não disponíveis para uma das amostras (85).

(d) Anos-dose expressos após transformação em equivalentes de CPZ, pelo método descrito por Andreasen *et al.* (95).

DP= desvio-padrão.

5.2 *Análises de volumes globais*

Não houve diferenças estatisticamente significantes entre pacientes e controles no que diz respeito aos volumes de substâncias cinzenta e branca, volume cerebral total e volume intracraniano total (Tabela 2). Quanto ao líquido cefalorraquidiano, entretanto, pacientes com esquizofrenia apresentaram volumes maiores em comparação aos controles ($p < 0,0001$).

Em relação à comparação entre pacientes com esquizofrenia crônica e de primeiro episódio, os pacientes crônicos também apresentaram maiores volumes apenas de líquido cefalorraquidiano ($p < 0,0001$), sem diferenças estatisticamente significantes no que diz respeito aos volumes de substâncias cinzenta e branca, volume cerebral total e volume intracraniano total (Tabela 2).

Quanto à relação entre volumes globais e moderadores clínicos potenciais, as análises de correlação de Pearson revelaram correlações negativas estatisticamente significantes entre exposição cumulativa estimada a antipsicóticos ao longo da vida e volumes globais para o grupo conjunto de pacientes com esquizofrenia [(substância cinzenta, $r = -0,244$, $p = 0,002$); (substância branca, $r = -0,177$, $p = 0,025$); (volume cerebral total, $r = -0,218$, $p = 0,005$); (volume intracraniano total, $r = -0,157$, $p = 0,047$)], bem como para o grupo de pacientes apenas com esquizofrenia crônica [(substância cinzenta, $r = -0,372$, $p = 0,000$); (substância branca, $r = -0,208$, $p = 0,039$); (volume cerebral total, $r = -0,305$, $p = 0,002$); (volume intracraniano total, $r = -0,271$, $p = 0,007$)].

Além disso, para o grupo conjunto de pacientes com esquizofrenia, encontrou-se uma correlação positiva estatisticamente significativa entre os volumes de líquido cefalorraquidiano e tempo de doença ($r=0,237$; $p=0,002$). Não foram encontradas correlações significativas entre os escores de gravidade psicopatológica pela escala PANSS total e volumes globais em nenhum dos grupos estudados.

Tabela 2. Comparação de volumes globais entre pacientes e controles

Volumes globais	Esquizofrenia			Análise estatística ^a			Controles (N=151)	Análise estatística ^b		
	Crônicos (N=99)	Primeiro episódio (N=62)	Total (N=161)	<i>t</i>	df	<i>p</i>		<i>t</i>	df	<i>p</i>
Substância cinzenta (mm ³): média ± DP	667,71 ± 65,6	671,39 ± 79,2	669,13 ± 70,9	- 0,32	159	0,750	661,94 ± 70,2	0,90	310	0,369
Substância branca (mm ³): média ± DP	507,21 ± 55,3	520,10 ± 64,1	512,17 ± 59,0	-1,31	115,56	0,194	509,77 ± 57,7	0,36	310	0,717
Líquido cefalorraquidiano (mm ³): média ± DP	301,05 ± 36,9	275,55 ± 37,1	291,23 ± 38,9	4,25	159	<0,0001	276,79 ± 41,9	3,14	310	0,002
Volume cerebral total (mm ³): média ± DP	1174,93 ± 117,7	1191,49 ± 141,8	1181,31 ± 127,3	- 0,80	159	0,424	1171,71 ± 124,7	0,67	309	0,502
Volume intracraniano total (mm ³): média ± DP	1475,98 ± 146,6	1467,05 ± 174,0	1472,54 ± 157,3	0,35	159	0,727	1448,51 ± 158,0	1,34	308	0,180

DP= desvio-padrão.

5.3 Análises de volumes regionais: achados de VBM nas comparações intergrupos

Os pacientes com esquizofrenia (grupo conjunto) apresentaram um padrão de déficits corticais regionais restrito às ínsulas, corpo estriado direito e giro frontal inferior esquerdo em comparação aos controles (análises *whole-brain*, correção FWE, $p < 0,05$) (Tabela 3, Figura 3). As análises com SVC, adicionalmente, revelaram reduções volumétricas regionais nas seguintes regiões preditas *a priori*: córtex pré-frontal dorsolateral (bilateral), córtex cingulado anterior (bilateral), tálamo (bilateral) e hipocampo/ giro para-hipocampal esquerdo (Tabela 3, Figura 3).

Tabela 3. Análise de VBM: reduções volumétricas regionais em pacientes com esquizofrenia (crônicos + primeiro episódio) em comparação a controles

Coordenadas do voxel com significância estatística máxima (espaço MNI)	Número de voxels no cluster	Escore Z (pico)	Região anatômica
Análise <i>whole-brain</i> (correção FWE, $p < 0,05$)			
-35, 23, 1	706	6,03	Ínsula esquerda, giro frontal inferior esquerdo
45, 11, -6	104	5,09	Ínsula direita, corpo estriado direito
Achados adicionais baseados em análises de SVC (correção FWE, $p < 0,05$)			
21, 59, 6	1051	4,23	Córtex pré-frontal dorsolateral direito
-38, 35, 1	643	5,96	Córtex pré-frontal dorsolateral esquerdo
2, 51, 13	165	3,66	Córtex cingulado anterior direito
-3, 53, 12	61	4,46	Córtex cingulado anterior esquerdo
2, -13, 6	179	4,03	Tálamo direito
0, -13, 6	90	3,94	Tálamo esquerdo
-30, -30, 15	120	3,75	Hipocampo/ giro para-

Figura 3. Análise de VBM: reduções volumétricas regionais em pacientes com esquizofrenia (crônicos + primeiro episódio) em comparação a controles.

Os pacientes com esquizofrenia de primeiro episódio não apresentaram reduções volumétricas significantes em comparação aos controles sob o limiar estatístico rígido das análises *whole-brain* com correção FWE e $p < 0,05$. As análises SVC, entretanto, revelaram reduções volumétricas significativas nas

seguintes regiões preditas *a priori*: ínsula (bilateral), amígdala direita, corpo estriado direito e hipocampo/ giro para-hipocampal direito (Tabela 4, Figura 4).

Tabela 4. Análise de VBM: reduções volumétricas regionais em pacientes com esquizofrenia de primeiro episódio em comparação a controles

Coordenadas do voxel com significância estatística máxima (espaço MNI)	Número de voxels no cluster	Escore Z (pico)	Região anatômica
Achados baseados em análises de SVC (correção FWE, $p < 0,05$)			
27, 5, -11	49	3,67	Corpo estriado direito
33, -34, -17	199	4,23	Hipocampo/ giro para-hipocampal direito
27, 5, -15	84	4,04	Amígdala direita
42, 11, -14	28	3,55	Ínsula direita
-35, 15, -17	29	3,64	Ínsula esquerda

Figura 4. Análise de VBM: reduções volumétricas regionais em pacientes com esquizofrenia de primeiro episódio em comparação a controles

Os pacientes com esquizofrenia crônica apresentaram, por outro lado, um extenso padrão de reduções cerebrais regionais em comparação aos controles, mesmo sob os limiares estatísticos mais rígidos (análises *whole-brain*, correção FWE, $p < 0,05$), envolvendo os córtices frontais superior, inferior e orbital

bilateralmente, o córtex frontal médio direito, os córtices cingulados anteriores bilateralmente, ambas as ínsulas, os córtices temporal superior e médio direitos, o giro pós-central esquerdo, o giro fusiforme esquerdo, o tálamo direito, o giro supramarginal direito, o giro pré-central esquerdo, o giro calcarino direito, os giros cingulado mediano e paracingulado esquerdos, e o hipocampo/ giro para-hipocampal esquerdo (Tabela 5, Figura 5). As análises complementares com SVC revelaram, adicionalmente, reduções nas seguintes regiões preditas *a priori*: tálamo esquerdo, hipocampo/ giro para-hipocampal direito, e giro temporal superior direito (Tabela 5, Figura 5).

Tabela 5. Análise de VBM: reduções volumétricas regionais em pacientes com esquizofrenia crônica em comparação a controles

Coordenadas do voxel com significância estatística máxima (espaço MNI)	Número de voxels no cluster	Escore Z (pico)	Região anatômica
Análise <i>whole-brain</i> (correção FWE, $p < 0,05$)			
11, 47, 10	8616	7,01	Cluster hemisférico bilateral, incluindo: córtices frontais superior e orbital bilaterais, córtex frontal médio direito, córtices cingulados anteriores bilaterais
-38, 35, 1	1203	6,43	Ínsula esquerda, córtex frontal inferior esquerdo
44, 18, -5	510	6,19	Ínsula direita, córtex frontal inferior direito
53, -24, -5	1496	5,84	Córtices temporais superior e médio direitos
-41, -24, 43	49	5,54	Giro pós-central esquerdo
-36, -43, -14	77	5,22	Giro fusiforme esquerdo
11, -10, 3	25	5,19	Tálamo direito
46, -45, 42	46	5,01	Giro supramarginal direito
-48, -3, 37	20	4,92	Giro pré-central esquerdo
11, -63, 10	28	4,88	Giro calcarino direito
-9, -7, 48	22	4,87	Giro cingulado mediano esquerdo e giro paracingulado esquerdo
-27, -34, -12	27	4,78	Hipocampo/ giro para-hipocampal esquerdo
Achados adicionais baseados em análises de SVC (correção FWE, $p < 0,05$)			
-9, -7, 3	129	6,43	Tálamo esquerdo
14, -6, -20	69	5,19	Hipocampo/ giro para-hipocampal direito
53, -24, -5	898	4,26	Giro temporal superior direito

Figura 5. Análise de VBM: reduções volumétricas regionais em pacientes com esquizofrenia crônica em comparação a controles.

Em comparação aos pacientes com esquizofrenia de primeiro episódio, os pacientes com esquizofrenia crônica igualmente demonstraram um extenso padrão de reduções volumétricas regionais nas análises *whole-brain* com correção FWE e $p < 0,05$, envolvendo as seguintes áreas: córtices temporais superior e médio bilaterais (com extensão para o giro para-hipocampal esquerdo, bem como para estruturas parieto-occipitais, tais como giros angulares bilaterais, giro

supramarginal direito, e córtices lingual, fusiforme e occipital inferior esquerdos); outras regiões encontradas foram o córtex frontal inferior esquerdo, os córtices parietais superior e inferior esquerdos, os córtices pré- e pós-centrais esquerdos, e ínsula esquerda (Tabela 6, Figura 6). As análises complementares usando SVC revelaram novos achados de reduções nas seguintes regiões preditas *a priori*: tálamo direito e amígdala direita (Tabela 6, Figura 6).

Tabela 6. Análise de VBM: reduções volumétricas regionais em pacientes com esquizofrenia crônica em comparação a pacientes com esquizofrenia de primeiro episódio

Coordenadas do voxel com significância estatística máxima (espaço MNI)	Número de voxels no cluster	Escore Z (pico)	Região anatômica
Análise <i>whole-brain</i> (correção FWE, $p < 0,05$)			
-41, -25, 6	2642	7,42	Córtex temporal superior esquerdo, com extensão para os córtices pré- e pós-centrais esquerdos
46, -46, 48	5830	7,22	Córtices temporais superior e médio direitos, com extensão para os giros supramarginal e angular direitos
-44, -64, 22	841	7,15	Córtex temporal médio esquerdo, com extensão para o giro angular esquerdo
-29, -48, 54	665	7,06	Córtices parietais superior e inferior esquerdos
-36, -52, -3	1508	6,79	Córtex temporal inferior esquerdo, com extensão para o giro para-hipocampal esquerdo e para os córtices lingual, fusiforme e occipital inferior esquerdos
-30, -13, 45	245	6,42	Córtex pré-central esquerdo
-33, -31, 54	256	6,26	Córtex pós-central esquerdo
-29, 33, -3	294	5,89	Córtex frontal inferior esquerdo
-41, 5, 12	108	5,12	Ínsula esquerda
Achados adicionais baseados em análises de SVC (correção FWE, $p < 0,05$)			
11, -10, 3	905	6,16	Tálamo direito
-6, 6, -3	330	5,42	Amígdala direita

Finalmente, com relação aos diferentes métodos de covariação global para substância cinzenta, a análise cuidadosa dos achados (parte dos quais demonstrados no anexo C) demonstrou que, embora variações de magnitude e extensão dos achados fossem observadas entre as análises, o padrão neuroanatômico principal dessas alterações se manteve preservado, sugerindo que os resultados e principais inferências obtidos no presente estudo não foram comprometidos substancialmente pelo método escolhido de covariação global.

5.4 Análises de volumes regionais: achados de VBM nas correlações intragrupo

Não foram encontradas correlações positivas ou negativas significativas entre os moderadores clínicos potenciais avaliados no presente estudo (gravidade psicopatológica medida pelos escores PANSS total; exposição cumulativa a antipsicóticos ao longo da vida, expressa em anos-dose; tempo de doença) e alterações estruturais regionais cerebrais para todos os subgrupos de pacientes, sob o limiar estatístico das análises whole-brain com correção FWE e $p < 0,05$.

As análises SVC, no entanto, demonstraram correlações negativas significativas entre tempo de doença e os volumes das seguintes regiões: ínsula esquerda e córtex cingulado anterior direito (grupo conjunto, isto é, pacientes com esquizofrenia crônica e de primeiro episódio, após correção para a variável *nuisance* exposição cumulativa a antipsicóticos); e córtex pré-frontal dorsolateral direito e córtex cingulado anterior direito [conjunção de três grupos com escores disponíveis de PANSS total (84, 86, 87), após correção para as variáveis de

confusão exposição cumulativa a antipsicóticos e gravidade psicopatológica] (Tabela 7, Figuras 7 e 8).

Tabela 7. Resultados das análises com SVC (correção FWE, $p < 0,05$) evidenciando correlações negativas entre volumes regionais de substância cinzenta e tempo de doença para os grupos conjuntos

Coordenadas do voxel com significância estatística máxima (espaço MNI)	Número de voxels no cluster	Escore Z (pico)	Região anatômica
Pacientes (crônicos + primeiro episódio) *			
-42, 5, 10	770	3,65	Ínsula esquerda
8, 26, 21	226	3,86	Córtex cingulado anterior direito
Conjunção de três grupos de pacientes com escores de PANSS total disponíveis ^Ω			
20, 44, 22	340	4,05	Córtex pré-frontal dorsolateral direito
8, 24, 19	94	3,51	Córtex cingulado anterior direito

(*) Após correção para os efeitos da exposição cumulativa a antipsicóticos ao longo da vida.

(Ω) Após correção para os efeitos da exposição cumulativa a antipsicóticos ao longo da vida e escores de gravidade psicopatológica (PANSS total).

Figura 7. Resultados das análises de correlação intragrupo revelando áreas onde foram encontradas correlações negativas estatisticamente significantes entre tempo de doença e volumes regionais (grupo conjunto de pacientes crônicos e de primeiro episódio, com correção para os efeitos de exposição cumulativa a antipsicóticos ao longo da vida).

Figura 8. Resultados das análises de correlação intragrupo revelando áreas onde foram encontradas correlações negativas estatisticamente significantes entre tempo de doença e volumes regionais (análise conjunta de três grupos com escores de PANSS total disponíveis, com correção para os efeitos de exposição cumulativa a antipsicóticos ao longo da vida e gravidade psicopatológica).

6 Discussão

6. DISCUSSÃO

A presente meganálise transversal de VBM comparou uma ampla corte de sujeitos com esquizofrenia (n=161) e controles (n=151) recrutados em uma mesma região geográfica do mundo. Enquanto os pacientes com esquizofrenia de primeiro episódio demonstraram reduções volumétricas regionais bastante sutis e altamente focais, os pacientes com esquizofrenia crônica demonstraram reduções volumétricas corticais mais extensas e generalizadas. Em algumas regiões cerebrais foi possível demonstrar, ainda, especificamente, uma correlação negativa com o tempo de doença. Por fim, identificou-se que os volumes globais na esquizofrenia foram inversamente correlacionados ao grau de exposição cumulativa a antipsicóticos ao longo da vida.

6.1 Reduções volumétricas regionais de substância cinzenta no grupo de primeiro episódio

As análises de VBM comparando pacientes com esquizofrenia de primeiro episódio a controles identificou reduções volumétricas regionais envolvendo uma rede altamente circunscrita na esquizofrenia, composta pela ínsula, estruturas têmporo-límbicas (amígdala, hipocampo e giro para-hipocampal) e corpo estriado. Reduções volumétricas envolvendo esse circuito têm sido relatadas, ainda que com algum grau de variação de magnitude e frequência, por uma série de estudos

originais e metanálises na literatura (42, 44, 68, 70, 111). No presente estudo, contudo, as alterações no referido circuito foram bastante sutis, sendo reveladas apenas quando se adotou o limiar estatístico mais flexível das análises SVC.

O envolvimento da ínsula na fisiopatologia da esquizofrenia tem sido encarado, algumas vezes, meramente como uma extensão do processo primário afetando os lobos frontal e temporal (70, 112). Contudo, os achados aqui demonstrados, à medida que circunscritos e independentes de envolvimento fronto-temporal, não são consistentes com esse entendimento. Pelo contrário, os achados sugerem que as alterações insulares possam corresponder a focos críticos do ponto de vista neuropatológico, a partir dos quais as alterações estruturais podem se desenvolver e evoluir para um caráter mais extenso e generalizado com a evolução temporal da doença (68, 113).

A ínsula possui um papel importante no processamento emocional, na integração dos estímulos sensoriais visuais e auditivos com o sistema límbico, na nocicepção, na interocepção e na representação mental do eu (112). A representação mental do eu, vale destacar, é fundamental para a diferenciação, por parte do indivíduo, entre estímulos internos e externos. Logo, é possível que alterações e disfunções insulares estejam na gênese das alucinações, manifestação cardeal da esquizofrenia (112). A ínsula, ainda, possui comunicações extensas com uma série de áreas corticais cerebrais, podendo atuar como interface entre os lobos frontal e temporal.

As estruturas têmporo-límbicas, por sua vez, são parte de um circuito neural que integra e relaciona estímulos externos e internos, mediando, por

consequência, as respostas fisiológicas, comportamentais e psicológicas a esses estímulos, sendo ainda fundamental para o processo de tomada de decisões com base em estímulos emocionais, essenciais para adaptação do indivíduo ao ambiente com base em suas experiências pessoais prévias (114). Por fim, o córtex temporal medial, por sua vez, é parte importante da rede neural envolvida no binômio prazer e recompensa (114). Com base nessas informações é possível supor que a disfunção do circuito têmporo-límbico possa influenciar de maneira decisiva para o aparecimento de algumas características essenciais da esquizofrenia, como é o caso dos sintomas negativos e positivos, por exemplo (114).

Embora nenhum estudo transversal multicêntrico de VBM em esquizofrenia tenha analisado separadamente os pacientes de primeiro episódio, alguns estudos originais de centro único têm avaliado amostras relativamente substanciais (72, 115-118). No maior desses estudos transversais de centro único até o momento, Meisenzahl *et al.* (72) demonstraram reduções volumétricas regionais na esquizofrenia de primeiro episódio em uma série de áreas, as mais significantes delas sendo as peri-sylvianas bilateralmente, ínsula esquerda, giro temporal superior, amígdala e hipocampo. Além disso, outras reduções bilaterais foram demonstradas nos córtices cingulados, órbito-frontais, pré-frontais dorsolaterais e dorsomediais, giros retos e tálamos (72). Não obstante a ausência de alterações envolvendo o giro temporal superior no presente estudo [uma das estruturas mais consistentemente descritas como reduzidas na esquizofrenia (42)], os demais circuitos neuroanatômicos aqui encontrados encontram-se substancialmente de

acordo com os relatados por Meisenzahl *et al.* (72). Outro ponto importante de consistência entre os presentes resultados e a literatura atual diz respeito ao caráter circunscrito (e não disseminado) das alterações na esquizofrenia de primeiro episódio (72, 115-118).

A amostra de pacientes com esquizofrenia de primeiro episódio empregada no presente estudo é a mesma avaliada em um estudo prévio já publicado e que utilizou uma versão menos otimizada do SPM (SPM2) (86). Apesar disso, os resultados aqui obtidos relativos a essa amostra de pacientes, diferentemente do estudo original (86), não demonstraram reduções em duas áreas importantes originalmente encontradas: giro temporal superior esquerdo (conforme anteriormente discutido) e o córtex pré-frontal inferior lateral. À medida que em ambos os estudos (no original e no presente) foram adotados os mesmos parâmetros de análises estatísticas, essas interessantes discrepâncias de resultados ressaltam o fato de que os achados de VBM podem variar em função dos procedimentos de normalização espacial e/ou das rotinas de processamento de imagens (119-124). Além disso, diferentemente do estudo original, os pacientes de primeiro episódio foram aqui comparados a um grupo relativamente maior de controles, adicionando-se inclusive indivíduos saudáveis que não foram recrutados nas mesmas vizinhanças dos pacientes, tal como ocorreu no estudo original (86). Por outro lado, o fato de os achados insulares e têmporo-límbicos terem se mantido consistentes, independentemente das rotinas de processamento e do número de controles empregados, constitui elemento que aponta a favor da robustez e importância desse circuito na esquizofrenia de primeiro episódio.

6.2 Maior extensão das reduções volumétricas regionais de substância cinzenta no grupo crônico

A questão sobre se a esquizofrenia é ou não caracterizada pela progressão têmporo-espacial das alterações estruturais cerebrais é de fundamental importância para a melhor compreensão sobre a fisiopatologia da doença. Conforme discutido previamente, por um lado há o modelo neurodesenvolvimental propondo uma disrupção ocorrendo de forma muito precoce, ainda durante o desenvolvimento cerebral inicial (125, 126). Como suporte ao modelo neurodesenvolvimental há as evidências associando complicações pré e perinatais com um diagnóstico posterior de esquizofrenia, bem como o fato de não se encontrar gliose nos cérebros de indivíduos com esquizofrenia nos estudos de necropsia, e finalmente a detecção de alterações estruturais cerebrais pela RM antes mesmo do aparecimento clínico da doença (127-130). Contudo, muitas vezes a doença é também caracterizada por um curso clínico de deterioração progressiva, sugerindo que possa haver neurodegeneração associada (73, 131). Com efeito, as evidências que passaram a surgir com os estudos de neuroimagem têm demonstrado repetidamente a progressão dessas alterações, seja como reduções volumétricas regionais de substância cinzenta ou progressão do aumento dos sistemas ventriculares (132).

A hipótese de neurodegeneração, não obstante, também tem sido objeto de controvérsias, notadamente pela inconsistência dos resultados de alguns estudos, que vão desde a ausência de achados de progressão (133) até mesmo à própria

reversão das reduções regionais (134). É possível que diferenças técnicas quanto aos processos de análises das imagens, diferenças quanto aos intervalos de seguimento dos sujeitos e quanto às inúmeras variáveis clínico-demográficas dos mesmos possam explicar, ao menos parcialmente, a heterogeneidade e inconsistência dos resultados obtidos neste campo.

Em concordância com as hipóteses iniciais originalmente levantadas no presente estudo, detectou-se de fato um padrão mais disseminado de alterações estruturais nos cérebros dos pacientes com esquizofrenia crônica em comparação com os de primeiro episódio e com os controles. Esse padrão de maior extensão e disseminação dos achados em função do fator temporal parece conferir algum suporte à ideia de progressão.

Os achados aqui relatados de extensos déficits corticais regionais entre os pacientes com esquizofrenia crônica são, outrossim, consistentes com os resultados de múltiplas metanálises prévias que realizaram comparações indiretas entre grupos crônicos e de primeiro episódio (42, 68-71). Os resultados são concordantes, ainda, com o estudo aludido anteriormente, de Meisenzahl *et al.* (72), que com um desenho amostral similar ao presente, demonstraram, entre os crônicos, extensas reduções volumétricas corticais envolvendo as ínsulas, córtices pré-frontais dorso e ventrolaterais, córtex cingulado anterior, estruturas têmporo-límbicas, giro temporal superior e núcleos caudados. É interessante notar a estreita similaridade dos circuitos neuroanatômicos observada na análise comparativa entre esses estudos, sobretudo no que diz respeito ao padrão de progressão dos déficits nas regiões insulares e têmporo-límbicas na forma crônica.

Essa mesma progressão foi demonstrada em uma metanálise seminal realizada por Ellison-Wright *et al.* (68).

Quanto às meganálises anteriores, Segall *et al.* (63) relataram um padrão de reduções volumétricas ocorrendo mais extensamente no giro frontal inferior, ínsula, giro para-hipocampal, giro temporal superior e giro reto. No braço maior que deu sequência à essa meganálise, por Gupta *et al.* (64), sempre envolvendo pacientes crônicos, as alterações foram ainda mais pronunciadas e difusas, cobrindo o cérebro inteiro em um gigantesco cluster único (isto é, redução volumétrica cerebral *in totum*).

Uma vez assentada a convergência dos achados de déficits regionais entre diversos estudos na esquizofrenia crônica, sobretudo no que tange às regiões fronto-têmporo-límbicas (63, 64, 72) é razoável concordar com a relevância atribuída a essas estruturas na fisiopatologia da doença (69). As regiões fronto-temporais têm sido tradicionalmente implicadas em uma série de processos cognitivos tidos como afetados na esquizofrenia, incluindo-se aí a atenção, linguagem, memória de trabalho e outros aspectos do funcionamento executivo do cérebro (135).

Outro fator que parece corroborar a relevância frontal na esquizofrenia crônica no presente estudo diz respeito às correlações negativas estatisticamente significantes entre tempo de doença e os volumes do córtex cingulado anterior e pré-frontal dorsolateral, além da ínsula. O córtex cingulado anterior tem sido encarado como uma estação central nos processos cognitivos, sendo essencial para seleção de respostas, detecção de erros e monitoramento de recompensas

contingentes (70). O córtex cingulado anterior possui ainda conexões recíprocas com os córtices frontais e têmporo-límbicos, sendo crucial para a integração entre emoções e funções executivas que se encontra alterada na esquizofrenia (136-139).

Outro aspecto essencial que deve ser levado em conta ao se interpretar os achados de reduções volumétricas regionais disseminadas na esquizofrenia é a avaliação sobre até que ponto esses achados possam estar relacionados à gravidade da doença, mais do que simplesmente ao fator evolutivo temporal intrínseco.

É provável que no presente estudo as diferentes estratégias de recrutamento e seleção dos sujeitos participantes possam ter favorecido a inclusão de indivíduos com maior gravidade psicopatológica no grupo crônico do que no grupo primeiro episódio. Para o recrutamento dos indivíduos do grupo de primeiro episódio uma equipe de pesquisadores buscou ativamente serviços de atenção à saúde mental em uma região geográfica pré-definida na cidade de São Paulo (86), (selecionando possivelmente, por conseguinte, um espectro menos enviesado de gravidade da doença, com casos ao longo de toda a extensão do espectro); um estudo recente de acompanhamento desses indivíduos após um ano e meio revelou, inclusive, casos de remissão dos sintomas em uma minoria de casos (140). O grupo crônico, diferentemente, foi recrutado em um contexto de assistência hospitalar terciária, potencialmente enviesando a gravidade dos sujeitos em direção à extremidade mais grave do espectro (alguns dos pacientes inclusive contam com repetidas necessidades de internações hospitalares). É

razoável assumir, destarte, que os achados de reduções corticais mais extensas e disseminadas nos pacientes crônicos possam se dever, ao menos em parte, a vieses de recrutamento que resultaram na inclusão de casos com maior gravidade no grupo crônico, mais do que simplesmente refletir pura e simplesmente apenas os efeitos do tempo de doença.

Nesse sentido deve-se mencionar que a ideia de que as alterações estruturais cerebrais mais exacerbadas na esquizofrenia crônica possam depender da gravidade clínica mais do que simplesmente estarem relacionadas à duração da doença encontra suporte em uma série de estudos longitudinais recentes de RM, os quais vêm sugerindo que a progressão significativa dos déficits corticais possa ser uma característica ocorrente predominantemente em um subgrupo mais grave de doentes, com pior prognóstico (69, 141). Entre esses estudos se encontra um em que um subgrupo dos pacientes de primeiro episódio aqui estudados foram re-examinados por RM após uma média de 5 anos, e cujos resultados demonstraram que a progressão da redução se fez observar apenas em uma parcela de sujeitos com um curso clínico mais grave (142).

Há que se notar finalmente, não obstante, que o presente estudo buscou correlações com a gravidade clínica da doença e estas não foram significativas. Isso sugere que o referido moderador clínico potencial possa fazer parte de uma interação mais complexa (e menos esmiuçável) de fatores que atuam com diferentes pesos e importâncias sobre as alterações estruturais cerebrais.

6.3 A relação entre alterações estruturais cerebrais na esquizofrenia e o uso de antipsicóticos

Conforme anteriormente mencionado, o uso contínuo de antipsicóticos tem sido apontado na literatura como um fator contributivo em potencial sobre a progressão das alterações estruturais cerebrais na esquizofrenia (61, 62, 143-145). Tal possibilidade, com efeito, encontra suporte em alguns estudos experimentais realizados em animais, que demonstram associação entre alterações estruturais e administração de antipsicóticos por períodos prolongados (57, 58, 146). Uma metanálise recente que abordou apenas estudos longitudinais de RM relatou, por exemplo, que a progressão das reduções corticais de substância cinzenta nos pacientes com esquizofrenia apresentou uma correlação negativa com os índices de exposição cumulativa a antipsicóticos, mesmo após consideração dos efeitos de confusão de variáveis como tempo de doença e gravidade psicopatológica (61). Uma outra metanálise, também de estudos longitudinais de RM, desta vez com foco na classe dos antipsicóticos, demonstrou igualmente uma correlação estatisticamente significativa entre exposição cumulativa a antipsicóticos e progressão dos déficits corticais, ainda que tais alterações tenham sido menos expressivas nos indivíduos em uso de antipsicóticos atípicos de segunda geração (144).

Diferentemente das meganálises anteriores (63, 64), que não avaliaram o impacto do uso de antipsicóticos sobre os achados estruturais, no presente estudo foi possível realizar uma avaliação cuidadosa dessa variável, tendo sido

demonstrada a ocorrência de correlação negativa estatisticamente significativa entre exposição cumulativa a antipsicóticos e volumes globais. Esse padrão de resultados corrobora a hipótese de que o uso crônico desse tipo de medicação pode, de fato, influenciar na progressão das alterações estruturais cerebrais na esquizofrenia (75). No entanto, ao mesmo tempo o presente estudo não demonstrou correlações significantes entre uso de antipsicóticos e reduções volumétricas regionais. Dessa forma, não é possível atribuir os achados de reduções volumétricas fronto-temporais da presente amostra ao uso contínuo de antipsicóticos (61, 62, 143-145). À luz dos resultados da metanálise realizada por Vita *et al.* (144), é possível que o predomínio de pacientes em uso de antipsicóticos atípicos de segunda geração na presente amostra (64%) possa ter contribuído, em algum grau, para ausência de achados significativos no nível das alterações regionais.

Os achados do presente estudo em relação ao uso de antipsicóticos, com demonstração de efeitos globais (e não regionais) sobre os volumes cerebrais, são pioneiros para uma meganálise transversal de VBM. Ainda assim, essa questão permanece em aberto (147, 148), devendo ser objeto de novas investigações transversais e longitudinais.

6.4 Vantagens e limitações

O presente estudo possui uma série de vantagens do ponto de vista metodológico. O emprego de um desenho multicêntrico permitiu a conjunção de

uma amostra de amplas dimensões e seleção de controles pareados demograficamente, com conseguinte ganho de poder estatístico.

Ademais, os efeitos de confusão potencialmente advindos dos distintos protocolos técnicos de aquisição das imagens entre as quatro amostras foram levados em conta e compensados mediante o emprego de um novo processamento uniforme das imagens e a consideração da variável scanner como variável de confusão dentro do modelo linear geral utilizado nas análises estatísticas. Estudos técnicos prévios nesse sentido têm demonstrado que os resultados oriundos das análises que congregam bancos de dados multicêntricos de RM não são afetados pelas diferenças de scanner e protocolo quando tal correção metodológica é realizada (65, 149). Com efeito, estratégias similares foram empregadas nas duas meganálises prévias em esquizofrenia (63, 64).

Além disso, o presente estudo também teve o cuidado pioneiro de conduzir repetidas análises volumétricas regionais com diferentes estratégias de covariação para valores globais de substância cinzenta. A consistência do padrão neuroanatômico principal de alterações obtidas nessas análises permitiu assegurar que os achados aqui relatados não foram substancialmente influenciados por diferenças globais que afetam variavelmente os compartimentos cerebrais na esquizofrenia e nos controles.

Por fim, diferentemente das meganálises prévias de VBM na esquizofrenia publicados até o momento, que congregaram sujeitos de extensas e diferentes áreas geográficas ao redor dos EUA e Europa (63, 64), os participantes do presente estudo foram recrutados em apenas dois centros urbanos no estado de

São Paulo, separados por distância inferior a 500 km. Dessa forma, acredita-se ter reduzido o problema das variações potenciais relacionadas à mensuração dos volumes cerebrais em diferentes áreas geográficas (150).

Uma das limitações do presente estudo diz respeito ao fato de, apesar do esforço para covariar o peso de vários moderadores clínicos potenciais sobre as alterações estruturais cerebrais, uma série de outros moderadores potenciais atualmente relatados na literatura não foram levados em consideração, tais como mudanças nos padrões de uso de antipsicóticos ao longo do tempo, adesão ao tratamento, tempo transcorrido de psicose sem tratamento, abuso de substâncias, etc. (4). Além disso, outros fatores que variam sistematicamente entre pacientes com transtornos psiquiátricos e controles, tais como tabagismo, fatores de risco cardiovasculares e comorbidades metabólicas, por exemplo, também não foram considerados (151).

Finalmente, embora o desenho transversal aqui adotado tenha propiciado o estudo de dados de uma amostra grande, é preciso ter em mente que as associações encontradas não implicam necessariamente em conexões causais, e inferências nesse sentido devem ser realizadas com cautela.

7 Conclusão

7. CONCLUSÃO

Os achados da presente meganálise multicêntrica de VBM em esquizofrenia corroboram a ideia de que as alterações estruturais cerebrais associadas ao efeito do diagnóstico são mais extensas e disseminadas na forma crônica em comparação à de primeiro episódio, afetando principalmente estruturas fronto-temporais e a ínsula. As análises de correlação identificaram que em circuitos neuroanatômicos específicos (ínsula, córtex cingulado anterior e córtex pré-frontal dorsolateral) essas alterações variam especificamente em função da cronicidade, e não da gravidade da doença. E, por fim, os achados permitem delinear os efeitos potencialmente complexos do uso de antipsicóticos sobre as alterações estruturais cerebrais na doença, que assumem um padrão essencialmente global de envolvimento, e não regional.

8 Anexos

ANEXO A. Aprovação do protocolo de pesquisa pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do HC-FMUSP.

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0824/11

Título: ESTUDO DE ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS CEREBRAIS EM PACIENTES COM ESQUIZOFRENIA CRÔNICA E DE PRIMEIRO EPISÓDIO ATRAVÉS DE IMAGENS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA COM MORFOMETRIA BASEADA NO Voxel

Pesquisador Responsável: Geraldo Busatto Filho

Pesquisador Executante: Ulysses dos Santos Torres

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Departamento: PSIQUIATRIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 14/12/2011, o protocolo acima.

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) a elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 16 de Dezembro de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Recebido: 21/12/11, às 10h
Impressão: 21/12/11, às 10h

ANEXO B. Tabela de equivalências dos principais antipsicóticos em 100 miligramas de clorpromazina [Baseado em Andreasen *et al.*, 2010, ref. (95)].

Atípicos	
Nome	Equivalência
Aripiprazol	6,42
Clozapina	108
Olanzapina	4,75
Quetiapina	142
Risperidona	1,32
Ziprasidone	50,5
Típicos	
Nome	Equivalência
Clorpromazina	100
Flufenazina	1,76
Haloperidol	1,84
Perfenazina	6,9
Tioridazina	87,3
Tiotixeno	4,91
Trifluoperazina	5,09

ANEXO C. Exemplificação dos resultados de uma parcela das análises adicionais realizadas com métodos alternativos de covariação para valores globais de substância cinzenta (resultados sem correção FWE, $p < 0.001$, reduções regionais, análises pacientes totais x controles).

Sem ajuste para TGM, sem ponderação para TIV:

Statistics: p-values adjusted for search volume

set-level		cluster-level				peak-level					mm mm mm		
p	c	p _{FWE-corr}	q _{FDR-corr}	k _E	p _{uncorr}	p _{FWE-corr}	q _{FDR-corr}	T	(Z _{max})	p _{uncorr}			
0.000	20	0.004	0.017	1982	0.001	0.001	0.005	5.51	5.38	0.000	-36	35	1
						0.002	0.005	5.37	5.24	0.000	-33	24	3
						0.393	0.353	3.92	3.87	0.000	-35	18	16
		0.051	0.106	1023	0.011	0.115	0.213	4.33	4.26	0.000	44	12	-6
						0.560	0.408	3.77	3.72	0.000	36	18	-9
		0.521	0.625	277	0.149	0.144	0.213	4.26	4.20	0.000	-33	44	19
						0.728	0.593	3.61	3.57	0.000	-39	38	22
		0.537	0.625	267	0.156	0.374	0.353	3.94	3.89	0.000	2	-13	6
		0.873	0.911	86	0.418	0.401	0.353	3.91	3.86	0.000	-41	-22	40
		0.880	0.911	82	0.430	0.403	0.353	3.91	3.86	0.000	43	-40	34
		0.321	0.522	429	0.078	0.483	0.370	3.83	3.79	0.000	20	59	4
						0.856	0.759	3.47	3.44	0.000	17	59	18
		0.938	0.911	46	0.563	0.491	0.370	3.83	3.78	0.000	-42	-52	37
		0.864	0.911	91	0.404	0.827	0.739	3.51	3.47	0.000	-32	-31	-15
		0.973	0.911	18	0.735	0.879	0.771	3.44	3.41	0.000	-20	44	22
		0.933	0.911	49	0.549	0.908	0.818	3.40	3.36	0.000	-36	-12	48
		0.977	0.911	15	0.762	0.942	0.904	3.33	3.30	0.000	24	30	48
		0.985	0.911	7	0.849	0.967	0.904	3.26	3.23	0.001	-32	54	-11
		0.930	0.911	51	0.540	0.969	0.904	3.26	3.23	0.001	-3	53	15
		0.984	0.911	8	0.836	0.975	0.904	3.24	3.21	0.001	-35	-64	42
		0.979	0.911	13	0.781	0.976	0.904	3.23	3.20	0.001	-35	-49	-9

table shows 3 local maxima more than 8.0mm apart

Height threshold: T = 3.12, p = 0.001 (0.993)

Extent threshold: k = 0 voxels, p = 1.000 (0.993)

Expected voxels per cluster, <k> = 140.351

Expected number of clusters, <c> = 4.93

FWEp: 4.561, FDRp: 5.367, FWEc: 1982, FDRc: 1982

Degrees of freedom = [1.0, 307.0]

FWHM = 16.2 16.3 15.6 mm mm mm; 10.8 10.8 10.4 {voxels}

Volume: 1704932 = 505165 voxels = 383.3 resels

Voxel size: 1.5 1.5 1.5 mm mm mm; (resel = 1212.39 voxels)

Page 1

Statistics: *p-values adjusted for search volume*

set-level		cluster-level				peak-level					mm mm mm		
p	c	$p_{FWE\text{-}corr}$	$q_{FDR\text{-}corr}$	k_E	p_{uncorr}	$p_{FWE\text{-}corr}$	$q_{FDR\text{-}corr}$	T	$(Z_{\equiv})$	p_{uncorr}			
0.984		0.911	0.911	8	0.836	0.983	0.912	3.19	3.17	0.001	42	33	19
0.989		0.911	0.911	3	0.911	0.984	0.912	3.19	3.16	0.001	-12	38	36
0.988		0.911	0.911	4	0.893	0.990	0.958	3.14	3.11	0.001	-2	53	24
0.987		0.911	0.911	5	0.877	0.991	0.958	3.13	3.11	0.001	47	-25	-6

table shows 3 local maxima more than 8.0mm apart

Height threshold: $T = 3.12$, $p = 0.001$ (0.993)
Extent threshold: $k = 0$ voxels, $p = 1.000$ (0.993)
Expected voxels per cluster, $\langle k \rangle = 140.351$
Expected number of clusters, $\langle c \rangle = 4.93$
FWEp: 4.561, FDRp: 5.367, FWEc: 1982, FDRc: 1982

Degrees of freedom = [1.0, 307.0]
FWHM = 16.2 16.3 15.6 mm mm mm; 10.8 10.8 10.4 {voxels}
Volume: 1704932 = 505165 voxels = 383.3 resels
Voxel size: 1.5 1.5 1.5 mm mm mm; (resel = 1212.39 voxels)
Page 2/2

Statistics: *p-values adjusted for search volume*

set-level		cluster-level				peak-level					mm mm mm		
p	c	$p_{\text{FWE-corr}}$	$q_{\text{FDR-corr}}$	k_E	p_{uncorr}	$p_{\text{FWE-corr}}$	$q_{\text{FDR-corr}}$	T	(Z_{Ξ})	p_{uncorr}			
		0.978	0.889	35	0.528	0.798	0.390	3.67	3.63	0.000	-12	38	36
		0.913	0.775	78	0.337	0.894	0.512	3.56	3.52	0.000	36	-36	-14
		0.959	0.792	51	0.441	0.922	0.549	3.51	3.48	0.000	-35	53	4
		0.958	0.792	52	0.436	0.932	0.554	3.50	3.46	0.000	42	33	19
		0.905	0.775	82	0.325	0.936	0.554	3.49	3.45	0.000	-36	-12	48
		0.928	0.775	70	0.363	0.955	0.584	3.45	3.41	0.000	-2	41	-20
		0.986	0.903	26	0.593	0.956	0.584	3.44	3.41	0.000	36	29	12
		0.982	0.889	31	0.555	0.984	0.748	3.34	3.31	0.000	9	63	-8
		0.815	0.745	121	0.233	0.988	0.748	3.31	3.28	0.001	48	-25	-6
		0.992	0.938	17	0.674	0.989	0.748	3.31	3.28	0.001	15	-4	-20
		0.990	0.924	21	0.635	0.989	0.748	3.31	3.27	0.001	62	-33	10
		0.997	0.939	8	0.788	0.996	0.876	3.22	3.19	0.001	48	0	33
		0.998	0.939	3	0.883	0.996	0.876	3.22	3.19	0.001	33	51	9
		0.997	0.939	6	0.821	0.997	0.876	3.20	3.17	0.001	-8	24	46
		0.997	0.939	7	0.804	0.997	0.876	3.20	3.17	0.001	-41	44	4
		0.998	0.939	5	0.840	0.997	0.876	3.20	3.17	0.001	44	45	-2
		0.998	0.939	4	0.861	0.998	0.876	3.19	3.17	0.001	-32	-66	-3
		0.999	0.939	2	0.910	0.998	0.925	3.16	3.14	0.001	17	5	46
		0.999	0.939	2	0.910	0.999	0.925	3.16	3.13	0.001	37	11	18
		0.999	0.942	1	0.942	0.999	0.993	3.12	3.09	0.001	49	-60	15

table shows 3 local maxima more than 8.0mm apart

Height threshold: $T = 3.12$, $p = 0.001$ (0.999)
Extent threshold: $k = 0$ voxels, $p = 1.000$ (0.999)
Expected voxels per cluster, $\langle k \rangle = 91.348$
Expected number of clusters, $\langle c \rangle = 7.25$
FWERp: 4.663, FDRp: 4.750, FWERc: 941, FDRc: 941

Degrees of freedom = [1.0, 306.0]
FWHM = 14.0 14.1 13.5 mm mm mm; 9.3 9.4 9.0 {voxels}
Volume: 1704932 = 505165 voxels = 588.8 resels
Voxel size: 1.5 1.5 1.5 mm mm mm; (resel = 789.15 voxels)
Page 2/2

Covariação local, sem ponderação para TIV

Statistics: *p-values adjusted for search volume*

set-level		cluster-level					peak-level					mm mm mm		
p	C	$p_{FWE-corr}$	$q_{FDR-corr}$	k_E	p_{uncorr}	$p_{FWE-corr}$	$q_{FDR-corr}$	T	(Z)	p_{uncorr}				
0.278	8	0.007	0.010	1439	0.001	0.002	0.005	5.37	5.24	0.000	-36	35	1	
						0.006	0.006	5.15	5.04	0.000	-33	24	3	
						0.843	0.500	3.57	3.53	0.000	-35	18	16	
		0.244	0.182	448	0.045	0.367	0.290	4.02	3.96	0.000	44	12	-6	
						0.950	0.575	3.40	3.36	0.000	36	18	-9	
						0.423	0.290	3.96	3.91	0.000	-33	44	19	
		0.836	0.586	112	0.293	0.991	0.757	3.23	3.20	0.001	-39	38	22	
						0.648	0.441	3.76	3.72	0.000	2	-13	6	
						0.815	0.500	3.60	3.56	0.000	43	-40	34	
		0.978	0.710	27	0.622	0.850	0.500	3.56	3.52	0.000	-41	-22	40	
						0.937	0.710	3.51	3.47	0.000	20	59	4	
						0.990	0.747	3.47	3.43	0.000	-42	-52	37	

table shows 3 local maxima more than 8.0mm apart

Height threshold: $T = 3.12$, $p = 0.001$ (0.998)
Extent threshold: $k = 0$ voxels, $p = 1.000$ (0.998)
Expected voxels per cluster, $\langle k \rangle = 109.509$
Expected number of clusters, $\langle c \rangle = 6.16$
FWEp: 4.620, FDRp: 5.148, FWEc: 1439, FDRc: 1439

Degrees of freedom = [1.0, 306.0]
FWHM = 14.9 15.0 14.3 mm mm mm; 9.9 10.0 9.6 {voxels}
Volume: 1704932 = 505165 voxels = 491.2 resels
Voxel size: 1.5 1.5 1.5 mm mm mm; (resel = 946.04 voxels)

Covariação local, com ponderação para TIV

Statistics: *p-values adjusted for search volume*

set-level		cluster-level				peak-level					mm mm mm		
p	c	$p_{FWE-corr}$	$q_{FDR-corr}$	k_E	p_{uncorr}	$p_{FWE-corr}$	$q_{FDR-corr}$	T	$(Z_{\equiv})$	p_{uncorr}			
0.000	23	0.000	0.000	2766	0.000	0.000	0.000	6.07	5.90	0.000	-35	23	3
						0.000	0.001	5.92	5.75	0.000	-38	35	1
						0.234	0.131	4.23	4.16	0.000	-35	18	16
		0.000	0.000	2307	0.000	0.009	0.015	5.08	4.97	0.000	41	12	-0
						0.036	0.033	4.76	4.67	0.000	35	20	-8
						0.155	0.102	4.36	4.29	0.000	35	30	-5
		0.064	0.041	690	0.009	0.022	0.025	4.87	4.78	0.000	-33	44	19
						0.466	0.217	3.98	3.92	0.000	-41	38	22
						0.893	0.527	3.57	3.53	0.000	-20	44	22
		0.419	0.242	284	0.074	0.143	0.102	4.38	4.31	0.000	-32	54	-11
						0.955	0.619	3.45	3.42	0.000	-35	65	-5
		0.151	0.085	501	0.022	0.156	0.102	4.35	4.28	0.000	2	-15	6
		0.062	0.041	697	0.009	0.216	0.131	4.25	4.19	0.000	-3	53	15
						0.473	0.217	3.97	3.92	0.000	-11	57	7
		0.880	0.600	94	0.287	0.355	0.183	4.08	4.03	0.000	-41	-22	40
		0.025	0.026	913	0.003	0.453	0.217	3.99	3.94	0.000	21	60	4
						0.620	0.250	3.84	3.80	0.000	20	62	19
						0.959	0.619	3.44	3.41	0.000	18	53	22
		0.868	0.600	99	0.275	0.500	0.221	3.95	3.90	0.000	43	-42	36
		0.968	0.893	45	0.466	0.596	0.250	3.86	3.81	0.000	-42	-52	37
		0.633	0.391	190	0.136	0.610	0.250	3.85	3.80	0.000	36	-36	-14

table shows 3 local maxima more than 6.0mm apart

Height threshold: $T = 3.12$, $p = 0.001$ (0.999)

Extent threshold: $k = 0$ voxels, $p = 1.000$ (0.999)

Expected voxels per cluster, $\langle k \rangle = 89.605$

Expected number of clusters, $\langle c \rangle = 7.38$

FWEp: 4.668, FDRp: 4.756, FWEc: 913, FDRc: 690

Degrees of freedom = [1.0, 305.0]

FWHM = 13.9 14.0 13.4 mm mm mm; 9.3 9.3 8.9 (voxels)

Volume: 1704932 = 505165 voxels = 600.3 resels

Voxel size: 1.5 1.5 1.5 mm mm mm; (resel = 774.15 voxels)

Page 1

Statistics: p -values adjusted for search volume

set-level		cluster-level				peak-level					mm mm mm		
p	C	$p_{FWE-corr}$	$q_{FDR-corr}$	k_E	p_{uncorr}	$p_{FWE-corr}$	$q_{FDR-corr}$	T	$(Z_{\equiv})$	p_{uncorr}			
		0.768	0.506	139	0.198	0.800	0.396	3.68	3.64	0.000	-32	-30	-15
		0.989	0.937	23	0.614	0.941	0.613	3.49	3.45	0.000	24	30	48
		0.994	0.937	15	0.693	0.976	0.671	3.39	3.35	0.000	-36	-66	43
		0.986	0.937	27	0.581	0.982	0.700	3.36	3.32	0.000	8	66	-8
		0.992	0.937	19	0.651	0.988	0.727	3.32	3.29	0.001	42	33	18
		0.993	0.937	16	0.682	0.993	0.791	3.28	3.25	0.001	-2	39	-20
		0.999	0.941	2	0.909	0.998	0.959	3.19	3.16	0.001	-44	-7	-17
		0.998	0.941	4	0.859	0.999	0.987	3.17	3.14	0.001	17	-90	-5
		0.999	0.941	1	0.941	0.999	0.994	3.14	3.11	0.001	8	45	37
		0.999	0.941	1	0.941	0.999	0.994	3.13	3.10	0.001	-35	53	4
		0.999	0.941	1	0.941	0.999	0.994	3.12	3.10	0.001	-12	38	36
		0.999	0.941	1	0.941	0.999	0.994	3.12	3.09	0.001	15	-4	-20

table shows 3 local maxima more than 8.0mm apart

Height threshold: $T = 3.12$, $p = 0.001$ (0.999)
Extent threshold: $k = 0$ voxels, $p = 1.000$ (0.999)
Expected voxels per cluster, $\langle k \rangle = 89.605$
Expected number of clusters, $\langle C \rangle = 7.38$
FWEp: 4.668, FDRp: 4.756, FWEc: 913, FDRc: 690

Degrees of freedom = [1.0, 305.0]
FWHM = 13.9 14.0 13.4 mm mm mm; 9.3 9.3 8.9 {voxels}
Volume: 1704932 = 505165 voxels = 600.3 resels
Voxel size: 1.5 1.5 1.5 mm mm mm; (resel = 774.15 voxels)
Page 2/2

Escalonamento global, sem ponderação para TIV

Statistics: *p-values adjusted for search volume*

set-level		cluster-level				peak-level					mm mm mm		
<i>p</i>	<i>c</i>	<i>p</i> _{FWE-corr}	<i>q</i> _{FDR-corr}	<i>k</i> _E	<i>p</i> _{uncorr}	<i>p</i> _{FWE-corr}	<i>q</i> _{FDR-corr}	<i>T</i>	(<i>Z</i>)	<i>p</i> _{uncorr}			
0.029	19	0.000	0.001	1968	0.000	0.000	0.001	5.87	5.71	0.000	-35	24	1
						0.001	0.001	5.82	5.66	0.000	-38	35	1
						0.877	0.328	3.75	3.70	0.000	-35	18	16
		0.008	0.006	1217	0.001	0.201	0.106	4.41	4.34	0.000	42	11	-2
						0.231	0.106	4.37	4.30	0.000	36	20	-9
		0.612	0.308	244	0.081	0.243	0.106	4.35	4.28	0.000	-33	45	19
						0.967	0.440	3.58	3.54	0.000	-41	38	22
		0.152	0.067	538	0.014	0.359	0.140	4.22	4.16	0.000	-3	53	15
						0.972	0.440	3.57	3.53	0.000	-11	57	7
		0.093	0.053	642	0.008	0.428	0.152	4.16	4.10	0.000	20	60	4
						0.936	0.389	3.66	3.62	0.000	18	60	18
						0.996	0.609	3.41	3.37	0.000	18	53	21
		0.993	0.618	49	0.423	0.703	0.265	3.92	3.87	0.000	-42	-52	37
		0.993	0.618	49	0.423	0.730	0.265	3.90	3.85	0.000	-41	-22	40
		0.962	0.618	88	0.280	0.863	0.328	3.77	3.72	0.000	-21	-90	4
		0.984	0.618	65	0.353	0.864	0.328	3.76	3.72	0.000	43	-42	36
		0.990	0.618	54	0.399	0.865	0.328	3.76	3.72	0.000	-32	54	-11
		0.751	0.378	190	0.119	0.890	0.328	3.73	3.69	0.000	3	-13	6
		0.989	0.618	57	0.386	0.968	0.440	3.58	3.54	0.000	14	69	-20
						1.000	0.752	3.26	3.23	0.001	18	71	-12
		0.992	0.618	51	0.413	0.976	0.440	3.55	3.51	0.000	-9	-30	-38

table shows 3 local maxima more than 8.0mm apart

Height threshold: $T = 3.12$, $p = 0.001$ (1.000)

Extent threshold: $k = 0$ voxels, $p = 1.000$ (1.000)

Expected voxels per cluster, $\langle k \rangle = 81.479$

Expected number of clusters, $\langle c \rangle = 11.66$

FWEp: 4.792, FDRp: 5.820, FWEc: 1217, FDRc: 1217

Degrees of freedom = [1.0, 307.0]

FWHM = 13.1 13.7 13.3 mm mm mm; 8.7 9.1 8.8 {voxels}

Volume: 2711725 = 803474 voxels = 1091.3 resels

Voxel size: 1.5 1.5 1.5 mm mm mm; (resel = 703.84 voxels)

Page 1

PCglobalscaling..nuiSexo..nuildade..nuiProtocol..11000

Statistics: *p-values adjusted for search volume*

set-level		cluster-level				peak-level					mm mm mm		
p	C	$p_{FWE\text{-}corr}$	$q_{FDR\text{-}corr}$	k_E	p_{uncorr}	$p_{FWE\text{-}corr}$	$q_{FDR\text{-}corr}$	T	(Z)	p_{uncorr}			
0.999		0.801		19	0.633	0.984	0.471	3.51	3.48	0.000	-20	44	22
1.000		0.817		14	0.688	0.998	0.630	3.37	3.33	0.000	-36	-64	42
1.000		0.846		9	0.757	0.999	0.683	3.32	3.29	0.001	24	30	48
0.999		0.795		24	0.586	0.999	0.711	3.29	3.26	0.001	-32	-31	-15
1.000		0.850		4	0.850	1.000	0.905	3.16	3.13	0.001	-35	-49	-9
1.000		0.850		5	0.829	1.000	0.905	3.16	3.13	0.001	11	47	12

table shows 3 local maxima more than 8.0mm apart

Height threshold: $T = 3.12$, $p = 0.001$ (1.000)
Extent threshold: $k = 0$ voxels, $p = 1.000$ (1.000)
Expected voxels per cluster, $\langle k \rangle = 81.479$
Expected number of clusters, $\langle C \rangle = 11.66$
FWEP: 4.792, FDRp: 5.820, FWEc: 1217, FDRc: 1217

Degrees of freedom = [1.0, 307.0]
FWHM = 13.1 13.7 13.3 mm mm mm; 8.7 9.1 8.8 {voxels}
Volume: 2711725 = 803474 voxels = 1091.3 resels
Voxel size: 1.5 1.5 1.5 mm mm mm; (resel = 703.84 voxels)
Page 2/2

Escalonamento global, com ponderação para TIV

Statistics: p-values adjusted for search volume

set-level		cluster-level				peak-level					mm mm mm		
p	C	p _{FWE-corr}	q _{FDR-corr}	k _E	p _{uncorr}	p _{FWE-corr}	q _{FDR-corr}	T	(Z _≡)	p _{uncorr}			
0.032	19	0.000	0.001	1983	0.000	0.000	0.001	5.87	5.71	0.000	-35	24	1
						0.001	0.001	5.81	5.66	0.000	-38	35	1
						0.872	0.294	3.76	3.71	0.000	-35	18	16
		0.007	0.005	1238	0.001	0.156	0.095	4.49	4.41	0.000	44	11	-5
						0.235	0.095	4.36	4.30	0.000	36	20	-9
		0.609	0.265	244	0.080	0.239	0.095	4.36	4.29	0.000	-33	45	19
						0.970	0.433	3.58	3.54	0.000	-41	38	22
		0.105	0.045	611	0.009	0.243	0.095	4.35	4.29	0.000	-3	53	15
						0.832	0.294	3.80	3.76	0.000	-11	57	7
		0.070	0.039	696	0.006	0.416	0.155	4.17	4.11	0.000	20	60	4
						0.924	0.350	3.68	3.64	0.000	18	62	18
						0.996	0.614	3.41	3.37	0.000	18	53	21
		0.989	0.614	57	0.383	0.675	0.242	3.95	3.90	0.000	-41	-22	40
		0.959	0.614	90	0.272	0.686	0.242	3.94	3.89	0.000	-32	54	-11
		0.993	0.614	49	0.420	0.714	0.243	3.92	3.87	0.000	-42	-52	37
		0.626	0.265	237	0.084	0.781	0.275	3.86	3.81	0.000	3	-13	6
		0.958	0.614	91	0.270	0.863	0.294	3.77	3.72	0.000	-21	-90	4
		0.984	0.614	65	0.351	0.872	0.294	3.76	3.71	0.000	43	-42	36
		0.983	0.614	66	0.347	0.957	0.407	3.62	3.58	0.000	14	69	-20
						0.999	0.668	3.31	3.27	0.001	18	71	-12
		0.992	0.614	52	0.405	0.978	0.452	3.55	3.51	0.000	-9	-30	-38

table shows 3 local maxima more than 6.0mm apart

Height threshold: T = 3.12, p = 0.001 (1.000)

Extent threshold: k = 0 voxels, p = 1.000 (1.000)

Expected voxels per cluster, <k> = 80.583

Expected number of clusters, <c> = 11.78

FWEp: 4.795, FDRp: 5.815, FWEc: 1238, FDRc: 611

Degrees of freedom = [1.0, 306.0]

FWHM = 13.0 13.7 13.2 mm mm mm; 8.7 9.1 8.8 {voxels}

Volume: 2711725 = 803474 voxels = 1103.4 resels

Voxel size: 1.5 1.5 1.5 mm mm mm; (resel = 696.15 voxels)

Page 1

PCglobalscaling..nuiSexo..nuildade..nuiProtocol..nuiTIV..-110000

Statistics: *p-values adjusted for search volume*

set-level		cluster-level				peak-level					mm mm mm		
p	C	$p_{FWE-corr}$	$q_{FDR-corr}$	k_E	p_{uncorr}	$p_{FWE-corr}$	$q_{FDR-corr}$	T	$(Z_{\equiv})$	p_{uncorr}			
0.999		0.798		19	0.630	0.986	0.485	3.51	3.47	0.000	-20	44	22
1.000		0.815		14	0.686	0.998	0.621	3.37	3.34	0.000	-36	-64	42
1.000		0.827		10	0.740	0.999	0.643	3.35	3.31	0.000	24	30	48
0.998		0.747		28	0.550	0.999	0.668	3.31	3.28	0.001	-32	-31	-15
1.000		0.849		6	0.807	1.000	0.899	3.17	3.14	0.001	11	47	12
1.000		0.849		4	0.849	1.000	0.899	3.16	3.13	0.001	-35	-49	-9

table shows 3 local maxima more than 8.0mm apart

Height threshold: $T = 3.12$, $p = 0.001$ (1.000)
Extent threshold: $k = 0$ voxels, $p = 1.000$ (1.000)
Expected voxels per cluster, $\langle k \rangle = 80.583$
Expected number of clusters, $\langle C \rangle = 11.78$
FWEP: 4.795, FDRp: 5.815, FWEc: 1238, FDRc: 611

Degrees of freedom = [1.0, 306.0]
FWHM = 13.0 13.7 13.2 mm mm mm; 8.7 9.1 8.8 {voxels}
Volume: 2711725 = 803474 voxels = 1103.4 resels
Voxel size: 1.5 1.5 1.5 mm mm mm; (resel = 696.15 voxels)
Page 2/2

9 Referências Bibliográficas

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carpenter WT Jr, Buchanan RW. Schizophrenia. N Engl J Med. 1994;330(10):681-90.
2. Freedman R. Schizophrenia. N Engl J Med. 2003;349(18):1738-49.
3. Ross CA, Margolis RL, Reading SA, Pletnikov M, Coyle JT. Neurobiology of schizophrenia. Neuron. 2006;52(1):139-53.
4. van Haren NE, Cahn W, Hulshoff Pol HE, Kahn RS. Schizophrenia as a progressive brain disease. Eur Psychiatry. 2008;23(4):245-54.
5. Terkelsen KG, Menikoff A. Measuring the costs of schizophrenia. Implications for the post-institutional era in the US. Pharmacoeconomics. 1995;8(3):199-222.
6. Knapp M, Mangalore R, Simon J. The global costs of schizophrenia. Schizophr Bull. 2004;30(2):279-93.
7. Geller JL. A historical perspective on the role of state hospitals viewed from the era of the “revolving door”. Am J Psychiatry. 1992;149(11):1526-33.
8. Rice DP. Economic burden of mental disorders in the United States. Economics Neuroscience 1999; 1: 40–44.
9. WHO. Global burden of schizophrenia in the year 2000: Version 1 estimates. GBD 2000 Working Paper. Disponível em:

http://www.who.int/healthinfo/statistics/bod_schizophrenia.pdf (Acessado em 11/02/2016).

10. WHO. The global burden of disease: 2004 update. Disponível em http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf (Acessado em 11/02/2016).
11. Saha S, Chant D, McGrath J. A systematic review of mortality in schizophrenia: is the differential mortality gap worsening over time? *Arch Gen Psychiatry*. 2007;64(10):1123-31.
12. Inskip HM, Harris EC, Barraclough C. Lifetime risk of suicide for alcoholism, affective disorder and schizophrenia. *Br J Psychiatry* 1998;172: 35–37.
13. Palmer BA, Pankratz VS, Bostwick JM. The lifetime risk of suicide in schizophrenia: a reexamination. *Arch Gen Psychiatry*. 2005;62(3):247-53.
14. Jones RM, Lichtenstein P, Grann M, Långström N, Fazel S. Alcohol use disorders in schizophrenia: a national cohort study of 12,653 patients. *J Clin Psychiatry*. 2011;72(6):775-9.
15. Batki SL, Meszaros ZS, Strutynski K, Dimmock JA, Leontieva L, Ploutz-Snyder R, Canfield K, Drayer RA. Medical comorbidity in patients with schizophrenia and alcohol dependence. *Schizophr Res*. 2009;107(2-3):139-46.
16. Salokangas RK, Honkonen T, Stengård E, Koivisto AM, Hietala J. Cigarette smoking in long-term schizophrenia. *Eur Psychiatry*. 2006;21(4):219-23.
17. Shinozaki Y, Nakao M, Takeuchi T, Yano E. Relationship between smoking and family history of smoking in schizophrenia patients. *Int J Psychiatry Med*. 2011;41(2):203-14.

18. Hennekens CH, Hennekens AR, Hollar D, Casey DE. Schizophrenia and increased risks of cardiovascular disease. *Am Heart J*. 2005;150(6):1115-21.
19. Auquier P, Lançon C, Rouillon F, Lader M. Mortality in schizophrenia. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2007;16(12):1308-12.
20. Weiser SD, Wolfe WR, Bangsberg DR. The HIV epidemic among individuals with mental illness in the United States. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2004;1(4):186-92.
21. Cournos F, McKinnon K, Sullivan G. Schizophrenia and comorbid human immunodeficiency virus or hepatitis C virus. *J Clin Psychiatry*. 2005;66 Suppl 6:27-33.
22. McGrath J, Saha S, Chant D, Welham J. Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality. *Epidemiol Rev*. 2008;30:67-76.
23. Aleman A, Kahn RS, Selten JP. Sex differences in the risk of schizophrenia: evidence from meta-analysis. *Arch Gen Psychiatry*. 2003;60(6):565-71.
24. Crow TJ. Positive and negative schizophrenic symptoms and the role of dopamine. *Br J Psychiatry* 1980;137:383–86.
25. Elvevag B, Goldberg TE. Cognitive impairment in schizophrenia is the core of the disorder. *Crit. Rev. Neurobiol*. 2000;14:1–21.
26. Liddle PF. The symptoms of chronic schizophrenia: a re-examination of the positive-negative dichotomy. *Br J Psychiatry* 1987;151:145–51.

27. Andreasen NC, Arndt S, Alliger R, Miller D, Flaum M. Symptoms of schizophrenia. Methods, meanings, and mechanisms. *Arch Gen Psychiatry*. 1995;52(5):341-51.
28. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. American Psychiatric Association, Washington, D.C., 2013, 5th ed.
29. Harrison PJ. Neuropathology of schizophrenia. *Psychiatry* 2008;7(10):421–24.
30. Rapoport JL, Addington AM, Frangou S, Psych MR. The neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2005. *Mol Psychiatry*. 2005;10(5):434-49.
31. Lewis DA, Levitt P. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu Rev Neurosci*. 2002;25:409-32.
32. Fish B, Marcus J, Hans SL, Auerbach JG, Perdue S. Infants at risk for schizophrenia: sequelae of a genetic neurointegrative defect. A review and replication analysis of pandysmaturation in the Jerusalem Infant Development Study. *Arch Gen Psychiatry*. 1992;49(3):221-35.
33. Lloyd T, Dazzan P, Dean K, Park SB, Fearon P, Doody GA, Tarrant J, Morgan KD, Morgan C, Hutchinson G, Leff J, Harrison G, Murray RM, Jones PB. Minor physical anomalies in patients with first-episode psychosis: their frequency and diagnostic specificity. *Psychol Med*. 2008;38(1):71-7.
34. McDonald C, Murray RM. Early and late environmental risk factors for schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev*. 2000;31(2-3):130-7.
35. van Os J, Rutten BP, Poulton R. Gene–environment interactions in schizophrenia: review of epidemiological findings and future directions. *Schizophr Bull* 2008;34:1066–82.

36. Le Strat Y, Ramoz N, Gorwood P. The role of genes involved in neuroplasticity and neurogenesis in the observation of a gene-environment interaction (GxE) in schizophrenia. *Curr Mol Med*. 2009;9(4):506-18.
37. Shenton ME, Dickey CC, Frumin M, McCarley RW. A review of MRI findings in schizophrenia. *Schizophr Res*. 2001;49(1-2):1-52.
38. Johnstone EC, Crow TJ, Frith CD, Husband J, Kreel L. Cerebral ventricular size and cognitive impairment in chronic schizophrenia. *Lancet*. 1976;2(7992):924-6.
39. Smith RC, Calderon M, Ravichandran GK, Largent J, Vourilis G, Shvartsburd A, Gordon J, Schoolar JC. Nuclear magnetic resonance in schizophrenia: a preliminary study. *Psychiatry Res*. 1984;12(2):137-47.
40. McCarley RW, Wible CG, Frumin M, Hirayasu Y, Levitt JJ, Fischer IA, Shenton ME. MRI anatomy of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1999; 45:1099–1119.
41. Lawrie SM, Abukmeil SS. Brain abnormality in schizophrenia: a systematic and quantitative review of volumetric magnetic resonance imaging studies. *Br J Psychiatry* 1998;172:110–20.
42. Honea R, Crow TJ, Passingham D, Mackay CE. Regional deficits in brain volume in schizophrenia: a meta-analysis of voxel-based morphometry studies. *Am J Psychiatry*. 2005;162(12):2233-45.
43. Antonova E, Sharma T, Morris R, Kumari V. The relationship between brain structure and neurocognition in schizophrenia: a selective review. *Schizophr Res*. 2004;70(2-3):117-45.

44. Wright IC, Rabe-Hesketh S, Woodruff PW, David AS, Murray RM, Bullmore ET. Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2000;157(1):16-25.
45. Steen RG, Mull C, McClure R, Hamer RM, Lieberman JA. Brain volume in first-episode schizophrenia: systematic review and meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *Br J Psychiatry*. 2006;188:510-8.
46. Ashburner J, Friston KJ. Voxel-based morphometry - the methods. *Neuroimage*. 2000;11(6 Pt 1):805-21.
47. Wright IC, McGuire PK, Poline JB, Traverso JM, Murray RM, Frith CD, Frackowiak RS, Friston KJ. A voxel-based method for the statistical analysis of gray and white matter density applied to schizophrenia. *Neuroimage*. 1995;2(4):244-52.
48. Sigmundsson T, Suckling J, Maier M, Williams S, Bullmore E, Greenwood K, Fukuda R, Ron M, Toone B. Structural abnormalities in frontal, temporal, and limbic regions and interconnecting white matter tracts in schizophrenic patients with prominent negative symptoms. *Am J Psychiatry*. 2001;158(2):234-43.
49. Sowell ER, Levitt J, Thompson PM, Holmes CJ, Blanton RE, Kornsand DS, Caplan R, McCracken J, Asarnow R, Toga AW. Brain abnormalities in early-onset schizophrenia spectrum disorder observed with statistical parametric mapping of structural magnetic resonance images. *Am J Psychiatry*. 2000;157(9):1475-84.
50. Ho BC, Andreasen NC, Nopoulos P, Arndt S, Magnotta V, Flaum M. Progressive structural brain abnormalities and their relationship to clinical outcome: a longitudinal magnetic resonance imaging study early in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 2003;60(6):585-94.

51. DeLisi LE, Sakuma M, Tew W, Kushner M, Hoff AL, Grimson R. Schizophrenia as a chronic active brain process: a study of progressive brain structural change subsequent to the onset of schizophrenia. *Psychiatry Res.* 1997;74:129-140
52. Giedd JN, Jeffries NO, Blumenthal J, Castellanos FX, Vaituzis AC, Fernandez T, Hamburger SD, Liu H, Nelson J, Bedwell J, Tran L, Lenane M, Nicolson R, Rapoport JL. Childhood-onset schizophrenia: progressive brain changes during adolescence. *Biol Psychiatry.* 1999;46:892-898.
53. Kempton MJ, Stahl D, Williams SC, DeLisi LE. Progressive lateral ventricular enlargement in schizophrenia: a meta-analysis of longitudinal MRI studies. *Schizophr Res.* 2010;120(1-3):54-62.
54. Ho BC, Andreasen NC, Ziebell S, Pierson R, Magnotta V. Long-term antipsychotic treatment and brain volumes: a longitudinal study of first-episode schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* 2011;68(2):128-37.
55. Lewis DA. Brain volume changes in schizophrenia: how do they arise? what do they mean? *Psychol Med.* 2009;39(11):1779-1780.
56. Vita A, De Peri L. The effects of antipsychotic treatment on cerebral structure and function in schizophrenia. *Int Rev Psychiatry.* 2007;19(4):429-436.
57. Konopaske GT, Dorph-Petersen KA, Pierri JN, Wu Q, Sampson AR, Lewis DA. Effect of chronic exposure to antipsychotic medication on cell numbers in the parietal cortex of macaque monkeys. *Neuropsychopharmacology.* 2007;32(6):1216-23.

58. Konopaske GT, Dorph-Petersen KA, Sweet RA, Pierri JN, Zhang W, Sampson AR, Lewis DA. Effect of chronic antipsychotic exposure on astrocyte and oligodendrocyte numbers in macaque monkeys. *Biol Psychiatry*. 2008;63(8):759-65.
59. Navari S, Dazzan P. Do antipsychotic drugs affect brain structure? a systematic and critical review of MRI findings. *Psychol Med*. 2009;39(11):1763-1777.
60. Smieskova R, Fusar-Poli P, Allen P, Bendfeldt K, Stieglitz RD, Drewe J, Radue EW, McGuire PK, Riecher-Rössler A, Borgwardt SJ. The effects of antipsychotics on the brain: what have we learnt from structural imaging of schizophrenia? a systematic review. *Curr Pharm Des*. 2009;15(22):2535-2549.
61. Fusar-Poli P, Smieskova R, Kempton MJ, Ho BC, Andreasen NC, Borgwardt S. Progressive brain changes in schizophrenia related to antipsychotic treatment? A meta-analysis of longitudinal MRI studies. *Neurosci Biobehav Rev*. 2013;37(8):1680-91.
62. Torres US, Portela-Oliveira E, Borgwardt S, Busatto GF. Structural brain changes associated with antipsychotic treatment in schizophrenia as revealed by voxel-based morphometric MRI: an activation likelihood estimation meta-analysis. *BMC Psychiatry*. 2013;13:342.
63. Segall JM, Turner JA, van Erp TG, White T, Bockholt HJ, Gollub RL, Ho BC, Magnotta V, Jung RE, McCarley RW, Schulz SC, Lauriello J, Clark VP, Voyvodic JT, Diaz MT, Calhoun VD. Voxel-based morphometric multisite collaborative study on schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2009;35(1):82-95.
64. Gupta CN, Calhoun VD, Rachakonda S, Chen J, Patel V, Liu J, Segall J, Franke B, Zwiers MP, Arias-Vasquez A, Buitelaar J, Fisher SE, Fernandez G, van Erp TG, Potkin S, Ford J,

- Mathalon D, McEwen S, Lee HJ, Mueller BA, Greve DN, Andreassen O, Agartz I, Gollub RL, Sponheim SR, Ehrlich S, Wang L, Pearlson G, Glahn DC, Sprooten E, Mayer AR, Stephen J, Jung RE, Canive J, Bustillo J, Turner JA. Patterns of Gray Matter Abnormalities in Schizophrenia Based on an International Mega-analysis. *Schizophr Bull.* 2015;41(5):1133-42.
65. Stonnington CM, Tan G, Klöppel S, Chu C, Draganski B, Jack CR Jr, Chen K, Ashburner J, Frackowiak RS. Interpreting scan data acquired from multiple scanners: a study with Alzheimer's disease. *Neuroimage.* 2008;39(3):1180-5.
66. Fennema-Notestine C, Gamst AC, Quinn BT, Pacheco J, Jernigan TL, Thal L, Buckner R, Killiany R, Blacker D, Dale AM, Fischl B, Dickerson B, Gollub RL. Feasibility of multi-site clinical structural neuroimaging studies of aging using legacy data. *Neuroinformatics.* 2007;5(4):235-45.
67. Pantelis C, Yücel M, Wood SJ, Velakoulis D, Sun D, Berger G, Stuart GW, Yung A, Phillips L, McGorry PD. Structural brain imaging evidence for multiple pathological processes at different stages of brain development in schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2005;31(3):672-96.
68. Ellison-Wright I, Glahn DC, Laird AR, Thelen SM, Bullmore E. The anatomy of first-episode and chronic schizophrenia: an anatomical likelihood estimation meta-analysis. *Am J Psychiatry.* 2008;165(8):1015-23.
69. Vita A, De Peri L, Deste G, Sacchetti E. Progressive loss of cortical gray matter in schizophrenia: a meta-analysis and meta-regression of longitudinal MRI studies. *Transl Psychiatry.* 2012;2:e190.
70. Chan RC, Di X, McAlonan GM, Gong QY. Brain anatomical abnormalities in high-risk individuals, first-episode, and chronic schizophrenia: an activation

- likelihood estimation meta-analysis of illness progression. *Schizophr Bull.* 2011;37(1):177-88.
71. Olabi B, Ellison-Wright I, McIntosh AM, Wood SJ, Bullmore E, Lawrie SM. Are there progressive brain changes in schizophrenia? A meta-analysis of structural magnetic resonance imaging studies. *Biol Psychiatry.* 2011;70(1):88-96.
72. Meisenzahl EM, Koutsouleris N, Bottlender R, Scheuerecker J, Jäger M, Teipel SJ, Holzinger S, Frodl T, Preuss U, Schmitt G, Burgermeister B, Reiser M, Born C, Möller HJ. Structural brain alterations at different stages of schizophrenia: a voxel-based morphometric study. *Schizophr Res.* 2008;104(1-3):44-60.
73. DeLisi LE. The concept of progressive brain change in schizophrenia: implications for understanding schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2008;34(2):312-21.
74. Weinberger DR, McClure RK. Neurotoxicity, neuroplasticity, and magnetic resonance imaging morphometry: what is happening in the schizophrenic brain? *Arch Gen Psychiatry.* 2002;59(6):553-8.
75. Zipursky RB, Reilly TJ, Murray RM. The myth of schizophrenia as a progressive brain disease. *Schizophr Bull.* 2013;39(6):1363-72.
76. Meda SA, Giuliani NR, Calhoun VD, Jagannathan K, Schretlen DJ, Pulver A, Cascella N, Keshavan M, Kates W, Buchanan R, Sharma T, Pearlson GD. A large scale (N=400) investigation of gray matter differences in schizophrenia using optimized voxel-based morphometry. *Schizophr Res.* 2008;101(1-3):95-105.

77. Antonova E, Kumari V, Morris R, Halari R, Anilkumar A, Mehrotra R, Sharma T. The relationship of structural alterations to cognitive deficits in schizophrenia: a voxel-based morphometry study. *Biol Psychiatry*. 2005;58(6):457-67.
78. Honea RA, Meyer-Lindenberg A, Hobbs KB, Pezawas L, Mattay VS, Egan MF, Verchinski B, Passingham RE, Weinberger DR, Callicott JH. Is gray matter volume an intermediate phenotype for schizophrenia? A voxel-based morphometry study of patients with schizophrenia and their healthy siblings. *Biol Psychiatry*. 2008;63(5):465-74.
79. García-Martí G, Aguilar EJ, Lull JJ, Martí-Bonmatí L, Escartí MJ, Manjón JV, Moratal D, Robles M, Sanjuán J. Schizophrenia with auditory hallucinations: a voxel-based morphometry study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008;32(1):72-80.
80. Moorhead TW, Job DE, Whalley HC, Sanderson TL, Johnstone EC, Lawrie SM. Voxel-based morphometry of comorbid schizophrenia and learning disability: analyses in normalized and native spaces using parametric and nonparametric statistical methods. *Neuroimage*. 2004;22(1):188-202.
81. Tregellas JR, Shatti S, Tanabe JL, Martin LF, Gibson L, Wylie K, Rojas DC. Gray matter volume differences and the effects of smoking on gray matter in schizophrenia. *Schizophr Res*. 2007;97(1-3):242-9.
82. Keshavan MS, Schooler NR. First-episode studies in schizophrenia: criteria and characterization. *Schizophr Bull*. 1992;18(3):491-513.
83. Kakeda S, Korogi Y. The efficacy of a voxel-based morphometry on the analysis of imaging in schizophrenia, temporal lobe epilepsy, and Alzheimer's disease/mild cognitive impairment: a review. *Neuroradiology*. 2010;52(8):711-21.

84. Sallet PC, Elkis H, Alves TM, Oliveira JR, Sassi E, Campi de Castro C, Busatto GF, Gattaz WF. Reduced cortical folding in schizophrenia: an MRI morphometric study. *Am J Psychiatry*. 2003;160(9):1606-13.
85. de Souza Crippa JA, Zuardi AW, Busatto GF, Sanches RF, Santos AC, Araújo D, Amaro E, Hallak JE, Ng V, McGuire PK. Cavum septum pellucidum and adhesio interthalamica in schizophrenia: an MRI study. *Eur Psychiatry*. 2006;21(5):291-9.
86. Schaufelberger MS, Duran FL, Lappin JM, Scazufca M, Amaro E Jr, Leite CC, de Castro CC, Murray RM, McGuire PK, Menezes PR, Busatto GF. Grey matter abnormalities in Brazilians with first-episode psychosis. *Br J Psychiatry Suppl*. 2007;51:s117-22.
87. Bassitt DP, Neto MR, de Castro CC, Busatto GF. Insight and regional brain volumes in schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2007;257(1):58-62.
88. Menezes PR, Scazufca M, Busatto G, Coutinho LM, McGuire PK, Murray RM. Incidence of first-contact psychosis in São Paulo, Brazil. *Br J Psychiatry Suppl*. 2007;51:s102-6.
89. First MB, Spitzer RL, Gibbon M, Williams JBW. Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders, Patient Edition (SCIDP), version 2. New York, New York State Psychiatric Institute, Biometrics Research, 1996.
90. Kay SR, Fiszbein A, Opler LA. The Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) for schizophrenia. *Schizophr Bull* 1987;13:261–276.

91. Overall JE, Gorham DR. The Brief Psychiatric Rating Scale. *Psychol Rep* 1962;10:799–812.
92. Woerner M, Manuzza S, Kane J. Anchoring the BPRS: an aid to improve reliability. *Psychopharmacol Bull* 1988;24:112–117.
93. Iager AC, Kirch DG, Wyatt RJ. A negative symptom rating scale. *Psychiatr Res* 1985;16:27–36.
94. Moncrieff J, Leo J. A systematic review of the effects of antipsychotic drugs on brain volume. *Psychol Med*. 2010;40(9):1409-22.
95. Andreasen NC, Pressler M, Nopoulos P, Miller D, Ho BC. Antipsychotic dose equivalents and dose-years: a standardized method for comparing exposure to different drugs. *Biol Psychiatry*. 2010;67(3):255-62.
96. Davis JM. Dose equivalence of the antipsychotic drugs. *J Psychiatr Res*. 1974;11:65-9.
97. Woods SW. Chlorpromazine equivalent doses for the newer atypical antipsychotics. *J Clin Psychiatry*. 2003;64(6):663-7.
98. Palaniyappan L, Park B, Balain V, Dangi R, Liddle P. Abnormalities in structural covariance of cortical gyrification in schizophrenia. *Brain Struct Funct*. 2015;220(4):2059-71.
99. Talairach J, Tournoux P. Co-planar Stereotaxic Atlas of the Human Brain: 3-Dimensional Proportional System - an Approach to Cerebral Imaging. Thieme Medical Publishers, New York, NY, 1988.

100. Ashburner J. A fast diffeomorphic image registration algorithm. *Neuroimage*. 2007;38(1):95-113.
101. Sundram F, Cannon M, Doherty CP, Barker GJ, Fitzsimons M, Delanty N, Cotter D. Neuroanatomical correlates of psychosis in temporal lobe epilepsy: voxel-based morphometry study. *Br J Psychiatry*. 2010;197(6):482-92.
102. Ansell EB, Rando K, Tuit K, Guarnaccia J, Sinha R. Cumulative adversity and smaller gray matter volume in medial prefrontal, anterior cingulate, and insula regions. *Biol Psychiatry*. 2012;72(1):57-64.
103. Benedetti F, Poletti S, Radaelli D, Bernasconi A, Cavallaro R, Falini A, Lorenzi C, Pirovano A, Dallspezia S, Locatelli C, Scotti G, Smeraldi E. Temporal lobe grey matter volume in schizophrenia is associated with a genetic polymorphism influencing glycogen synthase kinase 3- β activity. *Genes Brain Behav*. 2010;9(4):365-71.
104. Malone IB, Leung KK, Clegg S, Barnes J, Whitwell JL, Ashburner J, Fox NC, Ridgway GR. Accurate automatic estimation of total intracranial volume: a nuisance variable with less nuisance. *Neuroimage*. 2015;104:366-72.
105. Nordenskjöld R, Malmberg F, Larsson EM, Simmons A, Brooks SJ, Lind L, Ahlström H, Johansson L, Kullberg J. Intracranial volume estimated with commonly used methods could introduce bias in studies including brain volume measurements. *Neuroimage*. 2013;83:355-60.
106. Peelle JE, Cusack R, Henson RN. Adjusting for global effects in voxel-based morphometry: gray matter decline in normal aging. *Neuroimage*. 2012;60(2):1503-16.

107. Uwatoko T, Yoshizumi M, Miyata J, Ubukata S, Fujiwara H, Kawada R, Kubota M, Sasamoto A, Sugihara G, Aso T, Urayama S, Fukuyama H, Murai T, Takahashi H. Insular Gray Matter Volume and Objective Quality of Life in Schizophrenia. *PLoS One*. 2015;10(11):e0142018.
108. Fusar-Poli P, Radua J, McGuire P, Borgwardt S. Neuroanatomical maps of psychosis onset: voxel-wise meta-analysis of antipsychotic-naïve VBM studies. *Schizophr Bull*. 2012;38(6):1297-307.
109. Bora E, Fornito A, Radua J, Walterfang M, Seal M, Wood SJ, Yücel M, Velakoulis D, Pantelis C. Neuroanatomical abnormalities in schizophrenia: a multimodal voxelwise meta-analysis and meta-regression analysis. *Schizophr Res*. 2011;127(1-3):46-57.
110. Kuhn S, Gallinat J. Resting-state brain activity in schizophrenia and major depression: a quantitative meta-analysis. *Schizophr Bull*. 2013;39(2):358-65.
111. Arnone D, Cavanagh J, Gerber D, Lawrie SM, Ebmeier KP, McIntosh AM. Magnetic resonance imaging studies in bipolar disorder and schizophrenia: meta-analysis. *Br J Psychiatry*. 2009;195(3):194-201.
112. Wylie KP, Tregellas JR. The role of the insula in schizophrenia. *Schizophr Res*. 2010;123(2-3):93-104.
113. Smieskova R, Fusar-Poli P, Aston J, Simon A, Bendfeldt K, Lenz C, Stieglitz RD, McGuire P, Riecher-Rössler A, Borgwardt SJ. Insular volume abnormalities associated with different transition probabilities to psychosis. *Psychol Med*. 2012;42(8):1613-25.
114. White T, Cullen K, Rohrer LM, Karatekin C, Luciana M, Schmidt M, Hongwanishkul D, Kumra S, Charles Schulz S, Lim KO. Limbic structures and

- networks in children and adolescents with schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2008;34(1):18-29.
115. Chua SE, Cheung C, Cheung V, Tsang JT, Chen EY, Wong JC, Cheung JP, Yip L, Tai KS, Suckling J, McAlonan GM. Cerebral grey, white matter and csf in never-medicated, first-episode schizophrenia. *Schizophr Res.* 2007;89(1-3):12-21.
 116. Lui S, Deng W, Huang X, Jiang L, Ma X, Chen H, Zhang T, Li X, Li D, Zou L, Tang H, Zhou XJ, Mechelli A, Collier DA, Sweeney JA, Li T, Gong Q. Association of cerebral deficits with clinical symptoms in antipsychotic-naïve first-episode schizophrenia: an optimized voxel-based morphometry and resting state functional connectivity study. *Am J Psychiatry.* 2009;166(2):196-205.
 117. Janssen J, Reig S, Parellada M, Moreno D, Graell M, Fraguas D, Zabala A, Garcia Vazquez V, Desco M, Arango C. Regional gray matter volume deficits in adolescents with first-episode psychosis. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2008;47(11):1311-20.
 118. Job DE, Whalley HC, McConnell S, Glabus M, Johnstone EC, Lawrie SM. Structural gray matter differences between first-episode schizophrenics and normal controls using voxel-based morphometry. *Neuroimage.* 2002;17(2):880-9.
 119. Henley SM, Ridgway GR, Scahill RI, Klöppel S, Tabrizi SJ, Fox NC, Kassubek J; EHDN Imaging Working Group. Pitfalls in the use of voxel-based morphometry as a biomarker: examples from huntington disease. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2010;31(4):711-9.

120. Radua J, Canales-Rodriguez EJ, Pomarol-Clotet E, Salvador R. Validity of modulation and optimal settings for advanced voxel-based morphometry. *NeuroImage*. 2014;86:81-90.
121. Shen S, Sterr A. Is DARTEL-based voxel-based morphometry affected by width of smoothing kernel and group size? A study using simulated atrophy. *J Magn Reson Imaging*. 2013;37(6):1468-75.
122. Callaert DV, Ribbens A, Maes F, Swinnen SP, Wenderoth N. Assessing age-related gray matter decline with voxel-based morphometry depends significantly on segmentation and normalization procedures. *Front Aging Neurosci*. 2014;6:124.
123. Bergouignan L, Chupin M, Czechowska Y, Kinkingnéhun S, Lemogne C, Le Bastard G, Lepage M, Garnero L, Colliot O, Fossati P. Can voxel based morphometry, manual segmentation and automated segmentation equally detect hippocampal volume differences in acute depression? *Neuroimage*. 2009;45(1):29-37.
124. Tahmasebi AM¹, Abolmaesumi P, Zheng ZZ, Munhall KG, Johnsrude IS. Reducing inter-subject anatomical variation: effect of normalization method on sensitivity of functional magnetic resonance imaging data analysis in auditory cortex and the superior temporal region. *Neuroimage*. 2009;47(4):1522-31.
125. Weinberger DR. Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 1987;44(7):660-9.
126. Murray RM. Neurodevelopmental schizophrenia: the rediscovery of dementia praecox. *Br J Psychiatry Suppl*. 1994;(25):6-12.

127. Jones PB, Rantakallio P, Hartikainen AL, Isohanni M, Sipila P. Schizophrenia as a long-term outcome of pregnancy, delivery, and perinatal complications: a 28-year follow-up of the 1966 north Finland general population birth cohort. *Am J Psychiatry*. 1998;155(3):355-64.
128. Falkai P, Honer WG, David S, Bogerts B, Majtenyi C, Bayer TA. No evidence for astrogliosis in brains of schizophrenic patients. A post-mortem study. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1999;25(1):48-53.
129. Fusar-Poli P, Borgwardt S, Crescini A, Deste G, Kempton MJ, Lawrie S, McGuire P, Sacchetti E. Neuroanatomy of vulnerability to psychosis: a voxel-based meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011;35(5):1175-85.
130. Smieskova R, Fusar-Poli P, Allen P, Bendfeldt K, Stieglitz RD, Drewe J, Radue EW, McGuire PK, Riecher-Rössler A, Borgwardt SJ. Neuroimaging predictors of transition to psychosis--a systematic review and meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev*. 2010;34(8):1207-22.
131. Lieberman JA, Sheitman BB, Kinon BJ. Neurochemical sensitization in the pathophysiology of schizophrenia: deficits and dysfunction in neuronal regulation and plasticity. *Neuropsychopharmacology*. 1997;17(4):205-29.
132. Borgwardt SJ, Dickey C, Hulshoff Pol H, Whitford TJ, DeLisi LE. Workshop on defining the significance of progressive brain change in schizophrenia: December 12, 2008 American College of Neuropsychopharmacology (ACNP) all-day satellite, Scottsdale, Arizona. The rapporteurs' report. *Schizophr Res*. 2009;112(1-3):32-45.
133. Whitworth AB, Kemmler G, Honeder M, Kremser C, Felber S, Hausmann A, Walch T, Wanko C, Weiss EM, Stuppaeck CH, Fleischhacker WW. Longitudinal

- volumetric MRI study in first- and multiple-episode male schizophrenia patients. *Psychiatry Res.* 2005;140(3):225-37.
134. Keshavan MS, Haas GL, Kahn CE, Aguilar E, Dick EL, Schooler NR, Sweeney JA, Pettegrew JW. Superior temporal gyrus and the course of early schizophrenia: progressive, static, or reversible? *J Psychiatr Res.* 1998;32(3-4):161-7.
 135. Cobia DJ, Smith MJ, Wang L, Csernansky JG. Longitudinal progression of frontal and temporal lobe changes in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2012;139(1-3):1-6.
 136. Stevens FL, Hurley RA, Taber KH. Anterior cingulate cortex: unique role in cognition and emotion. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2011;23(2):121-5.
 137. Orellana G, Slachevsky A. Executive functioning in schizophrenia. *Front Psychiatry.* 2013;4:35.
 138. Fornito A, Yucel M, Dean B, Wood SJ, Pantelis C. Anatomical abnormalities of the anterior cingulate cortex in schizophrenia: bridging the gap between neuroimaging and neuropathology. *Schizophr Bull.* 2009;35(5):973-93.
 139. Yucel M, Wood SJ, Fornito A, Riffkin J, Velakoulis D, Pantelis C. Anterior cingulate dysfunction: implications for psychiatric disorders? *J Psychiatry Neurosci.* 2003;28(5):350-4.
 140. Schaufelberger MS, Lappin JM, Duran FL, Rosa PG, Uchida RR, Santos LC, Murray RM, McGuire PK, Scazufca M, Menezes PR, Busatto GF. Lack of progression of brain abnormalities in first-episode psychosis: a longitudinal magnetic resonance imaging study. *Psychol Med.* 2011;41(8):1677-89.

141. van Haren NE, Schnack HG, Cahn W, van den Heuvel MP, Lepage C, Collins L, Evans AC, Hulshoff Pol HE, Kahn RS. Changes in cortical thickness during the course of illness in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 2011;68(9):871-80.
142. Rosa PG, Zanetti MV, Duran FL, Santos LC, Menezes PR, Scazufca M, Murray RM, Busatto GF, Schaufelberger MS. What determines continuing grey matter changes in first-episode schizophrenia and affective psychosis? *Psychol Med*. 2015;45(4):817-28.
143. Veijola J, Guo JY, Moilanen JS, Jääskeläinen E, Miettunen J, Kyllönen M, Haapea M, Huhtaniska S, Alaräisänen A, Mäki P, Kiviniemi V, Nikkinen J, Starck T, Remes JJ, Tanskanen P, Tervonen O, Wink AM, Kehagia A, Suckling J, Kobayashi H, Barnett JH, Barnes A, Koponen HJ, Jones PB, Isohanni M, Murray GK. Longitudinal changes in total brain volume in schizophrenia: relation to symptom severity, cognition and antipsychotic medication. *PLoS One*. 2014;9(7):e101689.
144. Vita A, De Peri L, Deste G, Barlati S, Sacchetti E. The Effect of Antipsychotic Treatment on Cortical Gray Matter Changes in Schizophrenia: Does the Class Matter? A Meta-analysis and Meta-regression of Longitudinal Magnetic Resonance Imaging Studies. *Biol Psychiatry*. 2015;78(6):403-12.
145. Guo JY, Huhtaniska S, Miettunen J, Jääskeläinen E, Kiviniemi V, Nikkinen J, Moilanen J, Haapea M, Mäki P, Jones PB, Veijola J, Isohanni M, Murray GK. Longitudinal regional brain volume loss in schizophrenia: Relationship to antipsychotic medication and change in social function. *Schizophr Res*. 2015;168(1-2):297-304.
146. Dorph-Petersen KA, Pierri JN, Perel JM, Sun Z, Sampson AR, Lewis DA. The influence of chronic exposure to antipsychotic medications on brain size

- before and after tissue fixation: a comparison of haloperidol and olanzapine in macaque monkeys. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30(9):1649-61.
147. Ziermans TB, Schothorst PF, Schnack HG, Koolschijn PC, Kahn RS, van Engeland H, Durston S. Progressive structural brain changes during development of psychosis. *Schizophr Bull*. 2012;38(3):519-30.
 148. Haijma SV, Van Haren N, Cahn W, Koolschijn PC, Hulshoff Pol HE, Kahn RS. Brain volumes in schizophrenia: a meta-analysis in over 18 000 subjects. *Schizophr Bull*. 2013;39(5):1129-38.
 149. Pardoe H, Pell GS, Abbott DF, Berg AT, Jackson GD. Multi-site voxel-based morphometry: methods and a feasibility demonstration with childhood absence epilepsy. *Neuroimage*. 2008;42(2):611-6.
 150. Kirkbride JB, Errazuriz A, Croudace TJ, Morgan C, Jackson D, Boydell J, Murray RM, Jones PB. Incidence of schizophrenia and other psychoses in England, 1950-2009: a systematic review and meta-analyses. *PLoS One*. 2012;7(3):e31660.
 151. Weinberger DR, Radulescu E. Finding the Elusive Psychiatric "Lesion" With 21st-Century Neuroanatomy: A Note of Caution. *Am J Psychiatry*. 2016;173(1):27-33.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Structural brain changes associated with antipsychotic treatment in schizophrenia as revealed by voxel-based morphometric MRI: an activation likelihood estimation meta-analysis

Ulysses S Torres^{1,2,3*}, Eduardo Portela-Oliveira⁴, Stefan Borgwardt^{5,6} and Geraldo F Busatto^{1,2,3}

Abstract

Background: The results of multiple studies on the association between antipsychotic use and structural brain changes in schizophrenia have been assessed only in qualitative literature reviews to date. We aimed to perform a meta-analysis of voxel-based morphometry (VBM) studies on this association to quantitatively synthesize the findings of these studies.

Methods: A systematic computerized literature search was carried out through MEDLINE/PubMed, EMBASE, ISI Web of Science, SCOPUS and PsycINFO databases aiming to identify all VBM studies addressing this question and meeting predetermined inclusion criteria. All studies reporting coordinates representing foci of structural brain changes associated with antipsychotic use were meta-analyzed by using the activation likelihood estimation technique, currently the most sophisticated and best-validated tool for voxel-wise meta-analysis of neuroimaging studies.

Results: Ten studies (five cross-sectional and five longitudinal) met the inclusion criteria and comprised a total of 548 individuals (298 patients on antipsychotic drugs and 250 controls). Depending on the methodologies of the selected studies, the control groups included healthy subjects, drug-free patients, or the same patients evaluated repeatedly in longitudinal comparisons (i.e., serving as their own controls). A total of 102 foci associated with structural alterations were retrieved. The meta-analysis revealed seven clusters of areas with consistent structural brain changes in patients on antipsychotics compared to controls. The seven clusters included four areas of relative volumetric decrease in the left lateral temporal cortex [Brodmann area (BA) 20], left inferior frontal gyrus (BA 44), superior frontal gyrus extending to the left middle frontal gyrus (BA 6), and right rectal gyrus (BA 11), and three areas of relative volumetric increase in the left dorsal anterior cingulate cortex (BA 24), left ventral anterior cingulate cortex (BA 24) and right putamen.

Conclusions: Our results identify the specific brain regions where possible associations between antipsychotic drug usage and structural brain changes in schizophrenia patients are more consistently reported. Additional longitudinal VBM studies including larger and more homogeneous samples of schizophrenia patients may be needed to further disentangle such alterations from those possibly linked to the intrinsic pathological progressive process in schizophrenia.

Keywords: Schizophrenia, Antipsychotics, Voxel-based morphometry, Magnetic resonance imaging, Neuroimaging

* Correspondence: utorres@usp.br

¹Post-Graduate Program in Radiology, Institute of Radiology (INRAD), University of Sao Paulo Medical School, Sao Paulo, Brazil

²Laboratory of Neuroimaging in Psychiatry (LIM-21), Institute of Psychiatry, University of Sao Paulo Medical School, Centro de Medicina Nuclear, 3º andar, Rua Dr. Ovídio Pires Campos, s/n, 05403-010 Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

Background

Schizophrenia is a common, complex and severe psychiatric disorder affecting approximately 1% of the world population. The disorder remains a major cause of chronic disability among young and working-age individuals and is associated with a significant health, social and economic burden internationally [1-4]. Whereas finding an etiology for schizophrenia has been considered the “Holy Grail” of biological psychiatry research for more than one hundred years [5,6], its neurobiological basis mostly remains elusive in terms of its major neuropathologic, pathophysiologic, psychopharmacologic and genetic aspects [1,7].

In the last decades, with the advent of more sophisticated neuroimaging techniques such as magnetic resonance imaging (MRI), which allows *in vivo* studies of the brains of individuals with schizophrenia, structural brain changes in schizophrenia have been extensively characterized [8-10]. Some of these findings include smaller mean cerebral volumes and greater mean total ventricular volume in patients with schizophrenia, with significant decreases in both gray and white matter [11].

These findings initially have favored a dominant “neurodevelopmental” model of the origin of the disease: in the model, schizophrenia is basically a consequence of a disruption in early brain development, long before the clinical manifestations of disease that typically occur in adolescence or early adulthood. Moreover, an interaction between these early brain insults and environmental factors delineating the brain maturation in adolescence would be necessary to trigger psychotic behavior [7,12-17].

However, as these structural brain changes are often subtle and their course is difficult to appreciate in an evolving manner, it is only after robust and longitudinal MRI studies that the possibility of progressive structural brain changes over time has been strengthened (favoring the addition of a “neurodegenerative” hypothesis to the dominant “neurodevelopmental” model) [18-25]. The advent of voxel-based morphometry (VBM) was of crucial importance in this sense, as VBM represents an automated method of measuring whole-brain morphometry by comparing groups of images on the relative local concentration or density of gray or white matter in a voxel-by-voxel way, thus reducing investigator bias and providing highly reproducible results, among other benefits [26-28].

Although a neurodevelopmental insult does not preclude an associated neurodegenerative process [29], the idea of progressive structural changes in the brain over time, which could denote neurodegeneration, has been a controversial issue [30-32], particularly because the findings of different studies have at times seemed inconsistent. A notable example is the question of lateral ventricles: whereas some longitudinal MRI and CT studies

showed no enlargement over time [33-35], others have shown significant progression [36]; a recent meta-analysis comprising 13 studies regarding this question identified evidence of a progressive ventricular enlargement, concluding that the exclusively neurodevelopmental model of schizophrenia is now challenged [30].

While the progressive nature of structural brain changes in schizophrenia is not yet fully understood, they are thought to be in some degree due to a combination of abnormalities of synaptic plasticity, abnormal brain maturation and distinct environmental factors [37]. For many years, although a significant number of individuals involved in neuroimaging studies had used antipsychotic drugs, the role of drug treatment as a cause of these changes has been scarcely investigated [38]. Thus, among the environmental factors, a major current question is the role of antipsychotic medications in the progression of structural abnormalities, i.e., to determine to what extent these global brain volume changes are uniquely a consequence of schizophrenia (a progressive pathophysiology of the illness) or an effect of antipsychotics (including the potentially different role of typical and atypical classes) [38-43].

Antipsychotic medications are the cornerstone of the treatment of schizophrenia and have a positive effect on the prognosis, not only by leading to a general improvement in the long-term outcomes of patients but also by reducing the severity and frequency of positive and negative psychotic symptoms, including suicide risk as well as behavioral disturbances [44-49]. Classical (typical) antipsychotics (e.g., haloperidol) predominantly act by blocking dopamine D₂ receptors in mesostriatal, mesolimbic and mesocortical regions and the thalamus, directly contributing to the amelioration of psychotic symptoms that are thought to be a result of abnormally increased dopaminergic activity in these pathways [50-53]. New-generation (atypical) antipsychotics (e.g., clozapine), despite their activity in reducing dopaminergic activity through dopamine D₂ receptors blockade, have binding activity at various others receptors, including a higher affinity for the serotonergic 5-HT_{2A} receptors (high 5-T_{2A}/D₂ binding ratio) involved in the treatment of positive and negative symptoms [53,54]. Although this differentiation has clinical relevance, especially with regard to distinct side-effect patterns, the mechanisms of action of these drugs are not yet fully understood, and the definition of atypicality remains a matter of discussion [53-55].

Neuroimaging has a potential role in research aimed at a better understanding of structural brain changes secondary to antipsychotic usage. In the last years, numerous studies have been undertaken to address these questions, involving variable subsets of schizophrenia patients with different disease duration, age of onset, time of exposition to antipsychotics and degrees of

clinical severity [30,56,57]. In addition, an important limitation of most of these studies is the small sample size used [57], which decreases statistical power and limits more definitive conclusions. Finally, only a few studies have used the VBM approach [39,57]. All these aforementioned factors make data interpretation difficult, reinforcing the need for meta-analytic studies in this area using homogeneous morphometric methodologies and including multiple samples of patients.

A tool for voxel-wise meta-analysis of neuroimaging studies is the anatomic likelihood estimation technique (ALE). ALE incorporates multiple data sets of published coordinates generated by different VBM studies of a given disorder, automatically identifying through a whole-brain activation likelihood map those statistically significant (i.e., the most consistent) brain differences reported across these studies [58-60]. By avoiding the bias inherent in those studies employing manual ROIs and allowing the application of a statistical procedure, by depicting regional brain differences with good spatial resolution and by affording more definitive conclusions than single VBM studies, ALE is considered the most sophisticated and best-validated method of coordinate-based voxel-wise meta-analysis [61,62].

Although a number of well-written and comprehensive literature reviews have been conducted in recent years addressing the role of antipsychotics in the progression of structural brain changes over time in schizophrenia [38,39,41,43], these approaches to date have been only qualitative. No published study to date has used the ALE quantitative approach to conduct meta-analyses of VBM investigations comparing schizophrenia patients on antipsychotics versus unmedicated patients and healthy controls, or comparing schizophrenia patients before and after antipsychotic usage. Considering that some VBM studies have investigated samples comprised of as few as 15 schizophrenia patients, it is timely to apply a meta-analytic approach addressing this question, to quantitatively synthesize the findings of different studies, thus affording greater statistical power through the use of larger samples.

In this study, therefore, we sought to quantitatively review the relevant literature on the association between antipsychotics and structural brain changes in schizophrenia through a meta-analytic approach of VBM studies by using the ALE method. By quantitatively integrating the different foci of structural changes reported in each study, our objective was to establish whether a consistent anatomical pattern across these reported foci can be observed and determine the clusters of significant topographic convergence, ultimately providing a neuro-anatomical basis for these changes. We also questioned whether the meta-analytic approach might aid in differentiating between the effects of antipsychotics and those

solely related to the disease itself. Alternatively, it might help to organize the data from distinct studies even without further clarifying this dilemma. In this sense, we hypothesized that the quantitative meta-analytic approach, by more consistently identifying the regions affected by antipsychotics, might help to delineate the regional patterns of brain involvement associated with antipsychotic medications and to verify the overlaps with the classical patterns of brain involvement associated with the pathophysiological process during the development of psychosis. The identification of areas of structural brain alterations associated with antipsychotic exposure that differ from those areas commonly associated with the disease would aid in achieving a better understanding of this question.

Methods

Data sources and paper selection

We conducted a systematic computerized literature search via the MEDLINE/PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), EMBASE (<http://www.embase.com>), ISI Web of Science (<http://newisiknowledge.com/wos>), SCOPUS (<http://www.scopus.com>) and PsycINFO (<http://www.apa.org/psycinfo>) databases for VBM studies investigating the role of antipsychotic drugs in structural brain changes in samples of patients with schizophrenia. We used the following search keywords in different combinations to generate a list of potentially useful studies: “schizophrenia” (as well as variants, including “psychosis” and “schizoaffective”), crossed with “antipsychotics”, “antipsychotic agents” or “neuroleptics” and neuroimaging stems, including “MRI”, “magnetic resonance imaging”, “VBM” and “voxel-based morphometry”. The search was performed through August 2012, and no restrictions on date of publication or language were applied. We carefully examined all titles and abstracts resulting from these searches to determine which articles met the criteria for inclusion. The full text of all selected articles was evaluated, and the references for each article were also screened to identify additional eligible papers. All studies were obtained from peer-reviewed journals.

We selected studies considering the following inclusion criteria: a) original research articles; b) quantitative automated whole-brain analyses were performed; c) the VBM method was used [26,63]; c) the samples included subjects with schizophrenia using typical or atypical antipsychotics, and comparisons were performed with healthy controls or medication-free subjects, or schizophrenic patients were compared through serial MRI examinations both at baseline and after specific treatment with an antipsychotic; d) the results were normalized to the Talairach [64] or Montreal Neurological Institute (MNI) [65,66] standardized stereotactic spaces; e) after

VBM analyses, the peak coordinates of structural brain changes specifically associated with antipsychotics (i.e., after controlling for confounding effects such as the effects of disease, disease duration, etc.) were explicitly reported. In cases where the coordinates were not reported, attempts were made to contact the corresponding author for further details (e-mail and phone contact). The PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) flowchart detailing all the steps of the systematic review is provided in Figure 1.

Meta-analytic techniques

As aforementioned, meta-analysis was carried out by using the ALE method as introduced by Turkeltaub in

2002 [58], with revision by Laird in 2005 [59], Eickhoff in 2009 [60] and Turkeltaub in 2011 [67]; data processing was performed through the GingerALE 2.1 program [59,60,67] (<http://www.brainmap.org>). The analyses were conducted in Talairach space [64], and, when necessary, we spatially renormalized the MNI coordinates [65,66] published in some studies to Talairach coordinates [64], using the Lancaster's transform ("icbm2tal") [68,69].

Briefly, ALE is a method that determines the existence of anatomical convergence among results from different samples and studies, assuming an uncertainty in the location of each reported focus, which should be considered in terms of Gaussian probability density distributions that surround themselves. Therefore, the focus of

maximal activation (peak coordinates) represents the center of a three-dimensional Gaussian probability [58]. As recently proposed in the revised ALE algorithm, the use of pre-determined full-width half maximum (FWHM) values for the Gaussian probability distributions in the analyses is no longer required. The values are now empirically determined on the basis of a quantitative uncertainty model whereby the coordinates reported by studies with larger samples are more spatially accurate than those from smaller ones, thus requiring smaller FWHM values [60].

As ALE seeks to determine statistically significant convergence of activation probabilities between experiments, refuting the null hypothesis that the foci are homogeneously distributed throughout the brain [70], the modeled three-dimensional Gaussian probabilities of all foci reported in each experiment are summed in a voxel-wise manner, resulting in modeled activation (MA) maps [60,70]. The voxel-wise union of each computed MA map yields the “true ALE scores”, which demonstrate the convergence of foci through the whole brain across the entire set of studies. Permutation analyses conducted in ALE meta-analyses (using GingerALE, for example) are anatomically unconstrained, including not only the predominant foci within gray matter but also the foci within the deep white matter. Thus, it is a whole-brain analysis that allows conjoint analysis of gray and white matter foci. Finally, to determine the statistical significance, i.e., to assess the validity of convergence found in the true ALE scores over a random convergence (noise), an automated comparison is performed with a computed empirical null distribution of random ALE scores. For this purpose, from each MA map, a voxel is randomly selected and its probability is computed, and the union of these probabilities (as done for the true scores) yields the random score [60].

As described in previous meta-analyses of VBM studies, we adopted a threshold for the map of final ALE scores with a false discovery rate (FDR) corrected at $p < 0.05$ [71-73] and a cluster extent threshold of 100 mm^3 [72,74]. In addition, we chose the resultant coordinates to be reported for all submaxima in a single ALE cluster (all extrema). Significant clusters were overlaid onto an anatomical Talairach template, Colin1.1.nii (<http://www.brainmap.org/ale>), using the Mango software (version 2.6, 2012, Research Imaging Institute, University of Texas Health Science Center, USA; <http://ric.uthscsa.edu/mango>).

Results

The systematic search yielded 1163 abstracts, of which 68 were initially selected for a full-text screening. One study, by Massana et al. [75], was excluded, as the stereotactic coordinates were not reported in the paper nor provided by the authors after request (personal

communication). Another study, by Schaulfelberger et al. [76], was excluded because significant peak coordinates of structural brain changes were found only with small volume correction analysis.

Finally, ten studies [77-86] met the inclusion criteria (PRISMA flowchart in Figure 1). Additional data were necessary for the maps and peak coordinates reported in the study by Molina et al. [86] and were provided by the authors after submitting a request via e-mail (personal communication). Table 1 illustrates the clinical and demographic variables of the subjects included in the ten selected studies, which encompassed a total of 548 individuals (298 patients using typical or atypical antipsychotics and 250 controls). For the effect of reported coordinates included in this meta-analysis, five selected studies were classified as longitudinal [78,79,81,82,84] and five as cross-sectional [77,80,83,85,86]. Table 2 provides details on the methodologies of each selected study.

Most of the patients enrolled were using atypical antipsychotics (234; 78.5%), which in these samples included olanzapine, risperidone, quetiapine, sertindole, amisulpride, clozapine and ziprasidone. From the subset of studies which specifically described the number of patients who had taken each antipsychotic [77,78,80,82-86], olanzapine and risperidone were the most frequently used drugs among these 179 patients treated with atypicals, being used for 40.7% (73) and 30.1% (54) of the patients, respectively. Typical antipsychotics used when considering all the selected studies were chlorpromazine, sulpiride, haloperidol, thioridazine, droperidol, trifluoperazine, zuclopenthixol, fluphenazine and clotiapine. Additional file 1 summarizes the data concerning the antipsychotic drugs used by the patients of these selected studies.

Overall, 105 foci were retrieved in the analysis of the ten studies, 71 of which were related to volumetric gray matter and/or white matter deficits, and 34 to volumetric excesses. Additional file 2 demonstrates in the stereotactic space the foci of reported structural brain changes according to the class of antipsychotics (when available) and the type of alteration in the meta-analyzed studies. As some of the selected studies showed different effects for the use of antipsychotics, i.e., showed areas of both volumetric excesses and volumetric deficits, the meta-analysis was performed separately for those coordinates related to volumetric deficits and for those related to volumetric excesses. Patients using antipsychotic medications had four significant clusters of volumetric deficits in comparison to controls: 1) a cluster of 408 mm^3 located in the left lateral temporal cortex, BA 20 (peak voxel at Talairach coordinate -48, -16, -20); 2) a cluster of 192 mm^3 located in the left inferior frontal gyrus, BA 44 (peak voxel at Talairach coordinate -48, 6, 22); 3) a cluster of 120 mm^3 located in the left superior frontal

Table 1 Clinical and demographical data from subjects included in the selected studies

Reference	Subjects (n)						Gender of patients (F/M)	Age of patients (years) ^a	Education (years) ^a	Duration of illness	Handedness (R/L/A)
	Patients		Controls			Total					
	Typical	Atypical	Healthy subjects [*]	SP	MF						
Dazzan <i>et al.</i> 2005 [77]	32	30	–	–	22	84	21/41	25 ± 8 to 28.4 ± 7.8	12.3 ± 1.8 to 12.3 ± 2.1	19 to 22 weeks ^b	54/8
Girgis <i>et al.</i> 2006 [78]	–	15	15	15	–	30	8/7	23.6 ± 5.9	13.1 ± 3.2	105.3 ± 94.6 weeks ^a	NA
Whitford <i>et al.</i> 2006 [79]	–	25	26	25	–	51	10/15	22.1 ± 3.2	NA	5.9 ± 8.2 months ^a	21/4
Douaud <i>et al.</i> 2007 [80]	–	25	25	–	–	50	7/18	15.9 ± 1.5 to 16.5 ± 1.3	NA	1.4 ± 0.7 year ^a	20/5
Théberge <i>et al.</i> 2007 [81]	16		16	16	–	32	2/14	25 ± 8	11-13	243 ± 120 weeks ^a	12/3/1
Stip <i>et al.</i> 2009 [82]	–	15	–	15	–	15	4/11	28.3 ± 9.07	10.6 ± 3.5	5.8 ± 6.2 years ^a	NA
Tomelleri <i>et al.</i> 2009 [83]	25	45	79	–	–	149	25/45	39.73 ± 10.94	NA	14.13 ± 10.7 years ^a	67/3
Deng <i>et al.</i> 2009 [84]	6	14	11	–	–	31	11/9	26 ± 10 to 29.9 ± 13.5	NA	NA	18/2
Chua <i>et al.</i> 2009 [85]	15	5	–	–	25	45	10/10	29 ± 8.6	12 ± 2.9	40.8 ± 50.8 weeks ^a	NA
Molina <i>et al.</i> 2011 [86]	–	30	31	–	–	61	14/16	34.1 ± 10.6	NA	13.4 ± 5.9 years ^a	NA

*Matched for age and gender to the patients groups; a= mean ± SD; b = median (±SD); NA= data not available; SP = same patients evaluated repeatedly in longitudinal comparisons; MF = medication-free subjects.

gyrus, extending to the left middle frontal gyrus, BA 6 (peak voxel at Talairach coordinate –22, 12, 48); and 4) a cluster of 104 mm³ located in the right rectal gyrus, BA 11 (peak voxel at Talairach coordinate 4, 38, –24). In addition, patients using antipsychotic medications also had three significant clusters of volumetric excesses in comparison to controls: 1) a cluster of 416 mm³ located in the left dorsal anterior cingulate cortex, BA 24 (peak voxel at Talairach coordinate –2, 24, 6); 2) a cluster of 152 mm³ located in the left ventral anterior cingulate cortex, BA 24 (peak voxel at Talairach coordinate –4, 2, 26); and 3) a cluster of 264 mm³ located in the right putamen (peak voxel at Talairach coordinate 24, –4, 4). The final maps with the resultant significant areas of volumetric deficits and excesses in patients using antipsychotics through the selected studies are displayed in Figures 2 and 3, respectively.

We also conducted sub-analyses comparing the effects of typical and atypical antipsychotics. Three studies did not report peak coordinates according to typicality and were excluded from these sub-analyses [81,84,85]. Volumetric decreases with typicals were found in only one study [77], and thus these foci could not be meta-analyzed. Volumetric increases with typicals were found in two studies [77,83], but no significant clusters were found. Volumetric decreases with atypicals were reported in three studies [79,80,86], retrieving one

significant cluster of 456 mm³ located in the left temporal lobe, BA 20 (peak voxel at Talairach coordinate –48, –16, –20). Finally, volumetric increases with atypicals were reported in five studies [77,78,82,83,87], retrieving two significant clusters: 1) a cluster of 160 mm³ located in the right putamen (peak voxel at Talairach coordinate 26, –10, 8); and 2) a cluster of 112 mm³ located in the left thalamus (peak voxel at Talairach coordinate –2, –26, 4).

Discussion

Among the several variables that could possibly determine or contribute to the brain structural changes observed in patients with schizophrenia in the numerous neuroimaging studies performed in recent years – including those specifically related to the illness (age of onset, duration, severity) and the individual (age, gender, scholasticity) – it is the role of antipsychotics that remains a critical question, although possibly still beyond a definitive answer.

A relatively low number of studies have addressed this issue, which is made more difficult by the complex task of harmonizing or balancing the effects of all the other possible variables, and by the crucial necessity of more homogeneous samples of patients, not only with respect to the variables related to the illness and individuals but also to those related to antipsychotics (class, years of

Table 2 Summary of the methodologies used for each selected study

Reference	Design	Methods	Stereotactic space	Statistical threshold	Full-width half-maximum kernel	Type of analysis	P value	Controlling for
Dazzan et al. 2005 [77]	Cross-sectional	Comparison of subjects using typical and atypical antipsychotics versus drug-free patients	Talairach	Corr	NA	Whole-brain analysis	$P \leq 0.002$	Age, gender, duration of illness, total symptom scores, length of treatment, premorbid IQ, years of education
Girgis et al. 2006 [78]	Longitudinal	Comparison between patients using atypical antipsychotics (from baseline to 6-week follow-up) versus healthy controls	Talairach	Unc	12mm	Whole-brain analysis	$P \leq 0.001$	Age, gender, follow-up interval, years of education, socioeconomic status, duration of illness, total symptom scores
Whitford et al. 2006 [79]	Longitudinal	Comparison between patients using atypical antipsychotics (at first episode psychosis and at 2-3-year follow-up) versus healthy controls	Talairach	Corr	12mm	Whole-brain analysis	$P < 0.05$	Age, gender, handedness, follow-up interval
Douaud et al. 2007 [80]	Cross-sectional	Comparison of subjects using atypical antipsychotics versus healthy controls	MNI	Corr	8mm	Whole-brain analysis	$P < 0.01$	Age, gender, handedness, socioeconomic status
Théberge et al. 2007 [81]	Longitudinal	Comparison between patients using antipsychotics (at first episode psychosis and at 30-month follow-up) versus healthy controls	Talairach	Corr	12mm	Whole-brain analysis	$P < 0.001$	Age, gender, handedness, parental education
Stip et al. 2009 [82]	Longitudinal	Comparison between patients using atypical antipsychotics at baseline and at 5.5-month follow-up	MNI	Corr	8mm	Whole-brain analysis	$P < 0.01$	Non specified
Tomelleri et al. 2009 [83]	Cross-sectional	Comparison of subjects using atypical and typical antipsychotics versus healthy controls	Talairach	Corr	12mm	Whole-brain analysis	$P < 0.01$	Gender, duration of illness, total symptom scores
Deng et al. 2009 [84]	Longitudinal	Comparison between patients using atypical and typical antipsychotics (from baseline to 8-week follow-up) versus healthy controls	MNI	Unc	8mm	Whole-brain analysis	$p < 0.001$	Age, gender, height, handedness
Chua et al. 2009 [85]	Cross-sectional	Comparison of subjects using atypical and typical antipsychotics versus drug-free patients	Talairach	Corr	4.4mm	Whole-brain analysis	$p < 0.002$	Age, gender, handedness, ethnicity, height, years of education, paternal socioeconomic status, total symptom scores
Molina et al. 2011 [86]	Cross-sectional	Comparison of subjects using atypical antipsychotics versus healthy controls	Talairach	Corr	NA	Whole-brain analysis	$p < 0.05$	Age, gender, parental socioeconomic status, duration of illness

Corr = corrected for multiple comparisons; Unc = uncorrected for multiple comparisons.

exposure, dosages, withdrawals). Indeed, the additional difficulty of recruiting subjects with a psychiatric disease that has a low prevalence rate [88] has led to studies with relatively small numbers of patients. Considering also that the volumetric structural brain alterations in schizophrenia are often very subtle, thus requiring large samples to sufficiently increase the statistical power that would allow for the detection of such alterations [88], it is not surprising that sometimes the results of these distinct studies are somewhat confusing or even contradictory [38,39,41,43].

Whereas studies on the progression of structural brain changes in schizophrenia over time have been consistently replicated through recent years, as previously addressed in the introduction, studies on the role of antipsychotics have been presenting results ranging from brain volumetric reductions [89] to “no effect” [90] to volumetric enlargement [91], for example. Evidence from studies including larger samples of subjects, however, suggests a progressive correlation between brain volumetric reduction and antipsychotic use. In a multi-site

Figure 2 Areas of statistically significant brain volumetric decreases across the selected studies (displayed in the axial, coronal and sagittal plans) in patients with schizophrenia receiving antipsychotic medications. Peak coordinates (x;y;z) in the Talairach stereotactic space are presented. L left; R right.

longitudinal randomized study carried out with 161 first-episode psychosis patients and 62 healthy controls, Lieberman et al. [92] allocated patients, after a baseline MRI scan and subsequent randomization, to haloperidol or olanzapine groups; they found that patients using haloperidol had a significant grey matter reduction after 12 and 52 weeks in comparison to controls, whereas olanzapine patients did not. Also Cahn et al. [89] prospectively studied 34 first-episode schizophrenia patients (who had taken antipsychotics for up to 16 weeks) and 36 healthy controls who underwent an MRI scan at admission and after 1 year; a higher cumulative dosage of antipsychotics (typicals and atypicals were used in the study) was significantly and independently correlated with total brain volume and gray matter volume reductions, as well as increased volume of lateral ventricles. A longitudinal study by Nakamura et al. [93] (29 first-episode schizophrenia patients, 34 first-episode affective psychosis and 26 healthy controls) showed that schizophrenia patients had smaller gray matter volumes and larger sulcal cerebrospinal fluid and lateral ventricles in comparison to controls. Jayakumar et al. [94] studied 18 antipsychotic-naïve schizophrenia patients and 18 healthy controls; results showed gray-matter volumetric reductions and larger cerebrospinal fluid volumes, as also observed by Davatzikos et al. [95] (32 first-episode neuroleptic-naïve schizophrenia patients, 37 patients treated with antipsychotics and 79 controls). Conversely,

some studies on this question have not found significant structural brain changes (volumetric reductions or excesses) when comparing patients and controls. Studies with large samples, for example, such as those by Molina et al. [87] (16 schizophrenia patients and 42 healthy controls), Tauscher-Wisniewski et al. [96] (37 first-episode patients and 37 controls), and Puri et al. [97] (24 first-episode patients and 12 controls), did not identify significant volumetric differences. Recently, Ho et al. [98] performed a large longitudinal MRI study that followed 211 schizophrenia patients over a mean of 7.2 years, aiming to assess four potential variables (illness duration, illness severity, use of antipsychotics and substance abuse) that could have an effect on brain volumes. The authors found that even considering the effects of the other three variables, after statistical controlling, there was still a relationship between the amount of exposure to antipsychotics and brain volumetric reductions. Interestingly, these brain volumetric changes were not solely related to a specific antipsychotic class, but were observed both with typical and atypical [98].

The distinct pattern of effects on the brain induced either by typical or atypical drugs was a matter of discussion in some literature reviews, which showed that volumetric brain changes are more related to typicals than atypical [39,41]. Another review, however, concluded that the literature on structural brain changes and antipsychotic effects is inconsistent (as about half of

Figure 3 Areas of statistically significant brain volumetric increases across the selected studies (displayed in the axial, coronal and sagittal plans) in patients with schizophrenia receiving antipsychotic medications. Peak coordinates (x,y,z) in the Talairach stereotactic space are presented. L left; R right.

the longitudinal studies did not find or report progressive brain changes), and the distinct patterns of effects determined by typicals or atypicals were inconsistent as well [38].

To the best of our knowledge, this is the first study to quantitatively assess with a meta-analytic approach the question of structural brain changes and antipsychotic use in schizophrenia by reviewing those studies which directly assessed this question. In 2011, Leung et al. [71] published a meta-analysis of VBM studies using the ALE method to detect antipsychotic-related gray-matter alterations in first-episode schizophrenia patients; however, in contrast to our study, these authors employed an indirect approach, by using subtraction analysis to compare structural brain changes between two separate subsets of meta-analyzed studies, i.e., a subset of studies involving neuroleptic-naïve first-episode schizophrenia patients and another subset of studies involving neuroleptic-treated first-episode schizophrenia patients. Additionally, literature reviews have hitherto been only qualitative, encompassing a large variety of studies

carried out through distinct methodologies concerning volume measurement techniques.

The chosen voxel-wise approach using the ALE method confers at least one special advantage over previous reviews, which is the homogeneity of techniques employed by the selected studies regarding volumetry (i.e., the VBM method). Our results revealed a consistent volumetric reduction across the selected studies in the left temporal and frontal lobes, all of them being previously implicated areas reported to be of significance in studies involving patients with schizophrenia and first-episode psychosis [10,25,56,99-104]. Indeed, there is, for example, a body of evidence in the literature associating typical antipsychotics and also risperidone with decreased frontal metabolism in schizophrenia patients [105-108]. In the study by Leung et al. [71], subtraction analysis between the neuroleptic-treated and neuroleptic-naïve groups of first-episode psychosis patients revealed more extensive gray matter volumetric deficits in neuroleptic-treated patients in bilateral insula, medial frontal and inferior frontal gyrus, left parahippocampal

gyrus, superior temporal gyrus and right precentral gyrus; of interest, while there were significant gray matter deficits in the frontal lobe of neuroleptic-naïve patients (a finding not related to drug exposure), treated patients also showed still more extensive frontal volumetric reductions, which notes a possible overlapping between the disease-related structural alterations and the effects of antipsychotics.

Another point of interest is the question of volumetric excesses. The finding of volumetric increases in subcortical regions (and in basal ganglia, more specifically) is widely described in the ROI literature and thought to be related to dopaminergic blockade [39] and increased striatal blood flow [109]. Antipsychotic-related increased volumes in the putamen, nucleus caudatus, globus pallidus and thalamus were found in several studies in the literature, both among typicals and atypicals, even after few weeks of treatment [39]. In previously neuroleptic-naïve patients treated with atypicals, however, these basal ganglia alterations are not usually described [39], and atypicals seem to even reverse this effect after patients switch to them [39,43]. In this meta-analysis, the findings of volumetric excesses were observed across studies employing mainly atypical [77,78,82,83,86] but also typical antipsychotics [77,83]. Significant volumetric increases were observed in the cingulate gyrus and putamen, in concordance with some previous findings in the literature. Cumulative exposure to typical antipsychotics, for example, has been associated with a larger cingulate gyrus, an important region for the pathophysiology of schizophrenia [110-112]. McCormick et al. found an increase in anterior cingulate volume with use of typicals after 2-3 years in previously neuroleptic-naïve subjects; increased atypical medication exposure, in contrast, was correlated to decreased anterior cingulate volume [112]. Kopelman et al. also found greater anterior cingulate cortex volumes directly related to typical medication exposure [113]. This follows the same pattern of findings reported in regard to changes in the volume of basal ganglia structures [112], and these similarities may be related to the fact that the anterior cingulate cortex and basal ganglia are structurally and functionally connected, both structures receiving direct dopaminergic innervation from the ventral tegmental area and the substantia nigra [112]. In addition, the reported antipsychotic-induced hypertrophy in putamen, thalamus and caudate nucleus (observed both with typicals and atypicals) may also be related to changes in the synaptic organization of these D2 receptor-rich areas [84,86]. Indeed, the results of our sub-analysis carried out with atypical antipsychotics are in concordance with these findings, indicating significant volumetric increases in the thalamus and putamen.

In considering the results of this meta-analysis, we have to acknowledge a number of limitations. The main

limitation concerns the challenge faced by all the selected studies in this field, which is the difficulty of disentangling the effects of drug treatment from those related to the underlying pathology; the results of various studies on this topic allow us currently only to make hypotheses, without reaching definitive conclusions, as is summarized in the last literature reviews [38,39,41,43]. In addition, ethical issues preclude more insightful study designs involving, for example, placebo-treated individuals with schizophrenia and antipsychotic-exposed healthy controls because there is no therapeutic benefit to justify the exposure of a healthy population to the effects of antipsychotics. Thus, we acknowledge that the results currently available in the literature are merely associative and inferential, and they do not necessarily imply causality. Independent of such facts, however, it should be noted that the current study does not intend primarily to question the internal validity of each published work reporting that these changes might be associated to antipsychotics; despite any concerns, these studies point to a possible association, and, methodologically, they represent the best that the current literature has to offer.

Yet, despite the strictness of the eligibility criteria that we applied, which led to a low number of selected studies, other limitations relate to the heterogeneity of search space (variability both in type of antipsychotic examined and in study designs). However, we aimed with this study to establish whether there were clusters of significant topographic convergence of structural brain changes reported in the selected VBM studies, independent of their designs. It is also possible that some factors (such as smoothing kernel, absence of correction for multiple comparisons and cluster size thresholds) that vary across different VBM studies may exert an influence on the final coordinates generated in each study, thus also affecting the results of ALE meta-analyses [71]. It is important to emphasize, however, that the revised ALE algorithm employed in this meta-analysis accounts for the inter-subject and inter-laboratory variability observed in neuroimaging experiments, also employing a null distribution of spatial independence across studies [70].

Due to the limited reported data, we could not control for the effect of potential moderators such as illness duration and illness severity. However, the relatively large overall sample size, combined with strict quality control, yielded a robust meta-analytical approach. Additionally, when meta-analyzing the available foci according to the class of antipsychotics or type of study design in relation to the resultant brain effect (i.e., volumetric excesses, volumetric decreases), excessive fragmentation of the data prevented the findings of significant foci of convergence with typicals. Notably, however, there is currently no clear evidence regarding the effects of typicality on

brain regional changes associated with antipsychotics in schizophrenia [38,98].

Other limitations are related to the ALE method, as only those studies reporting peak coordinates can be incorporated into the meta-analysis; thus, those studies that found no significant differences between patients and controls (and consequently did not report peak coordinates) are not included and therefore cannot influence the meta-analysis results. Thus, by considering only studies with positive findings, ALE meta-analyses may carry a bias that overemphasizes the idea of structural brain changes in schizophrenia [71]. In addition, although it is known that the number of included foci affects the analyses using the ALE method, the ideal number of foci for adequate analyses is still undetermined [59].

Conclusions

In light of the current literature, despite the growing number of studies, the difficulty in reaching more incisive conclusions on this topic is still apparent. However, it seems clear that the idea of antipsychotics as potential agents contributing to the structural brain changes in schizophrenia should certainly be taken into account. These cautious conclusions are necessary based mainly on the fact that the correlations between brain volumes and antipsychotic use reported by some studies do not necessarily imply any causality [98]. Indeed, it remains elusive whether brain structural alterations in schizophrenia are due to the intrinsic pathologic process, antipsychotic use, other variables, or even a combination of all those [42].

Answering these questions is of great clinical importance. If antipsychotics really induce potentially harmful brain volumetric reductions in patients with schizophrenia, then the risks and benefits of these drugs should be carefully considered before prescription; in addition, patients should be appropriately informed about these particular risks and benefits [38]. More consistent answers could be achieved by studies with high statistical power performed longitudinally, homogeneously, with large samples, ideally multicentric. For now, some practical approaches such as closely assessing the side effects of these drugs for each patient, trying to prescribe the minimal amount that is sufficient to reach the therapeutical objectives, and also considering the inclusion of nonpharmacological treatments [114] seem adequate. For the future, we expect the research to find new drugs with distinct mechanisms of action [114] that could not only induce fewer undesirable effects but could also act on the underlying disease process rather than on just one dimension or symptom.

Additional files

Additional file 1: Details of the antipsychotic treatment employed among the subjects enrolled in the selected studies.

Additional file 2: Foci of reported brain structural changes (cluster center described in the stereotactic space: x,y,z) * according to type of alteration (increase/decrease of gray and white matter) and class of antipsychotics (typicals/atypicals) in the selected studies.

Competing interests

The author declares that they have no competing interests.

Authors' contributions

UST and GFB contributed to the study design. UST and EPO contributed to the data collection. UST, EPO, SB and GFB interpreted the data and drafted the manuscript. All authors participated in critical revision of the manuscript drafts and approved the final version.

Acknowledgements

We thank Dr. Vicente Molina for kindly sharing additional information about his study.

Funding

U.S.T. is supported by a PhD grant from the Foundation for the Support of Research in the State of São Paulo (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP), Brazil (process 11/18631-1). G.F.B. is partly funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author details

¹Post-Graduate Program in Radiology, Institute of Radiology (INRAD), University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil. ²Laboratory of Neuroimaging in Psychiatry (LIM-21), Institute of Psychiatry, University of São Paulo Medical School, Centro de Medicina Nuclear, 3º andar, Rua Dr. Ovídio Pires Campos, s/n, 05403-010 São Paulo, São Paulo, Brazil. ³Center for Interdisciplinary Research on Applied Neurosciences (NAPNA), University of São Paulo, São Paulo, Brazil. ⁴Department of Radiology, Hospital de Base, São José do Rio Preto Medical School, São Paulo, Brazil. ⁵Department of Psychiatry, University of Basel, Basel, Switzerland. ⁶Department of Psychosis Studies, Institute of Psychiatry, King's College, London, UK.

Received: 22 June 2013 Accepted: 9 December 2013

Published: 20 December 2013

References

- Ross CA, Margolis RL, Reading SA, Pletnikov M, Coyle JT: **Neurobiology of schizophrenia.** *Neuron* 2006, **52**(1):139–153.
- Tamminga CA, Holcomb HH: **Phenotype of schizophrenia: a review and formulation.** *Mol Psychiatry* 2005, **10**(1):27–39.
- Murray CJL, Lopez AD: *The global burden of disease. A comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries and risk factors in 1990 and projected to 2020*, GBD series Vol. I. Harvard school of public health on behalf of the world health organization and the world bank. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press; 1996.
- Knapp M, Mangalore R, Simon J: **The global costs of schizophrenia.** *Schizophr Bull* 2004, **30**(2):279–293.
- Bennet L, Gunn A: **The fetal origins of adult mental illness.** In *Early life origins of health and disease (advances in experimental medicine and biology)*. Edited by Wintour-Coghlan M, Owens J. New York, NY, USA: Springer; 2006:204–211.
- Harrison PJ: **Neuropathology of schizophrenia.** *Psychiatry* 2008, **71**(10):421–424.
- Meyer U, Feldon J: **Epidemiology-driven neurodevelopmental animal models of schizophrenia.** *Prog Neurobiol* 2010, **90**(3):285–326.
- Lawrie SM, Abukmeil SS: **Brain abnormality in schizophrenia. A systematic and quantitative review of volumetric magnetic resonance imaging studies.** *Br J Psychiatry J Mental Sci* 1998, **172**:110–120.
- McCarley RW, Wible CG, Frumin M, Hirayasu Y, Levitt JJ, Fischer IA, Shenton ME: **MRI anatomy of schizophrenia.** *Biol Psychiatry* 1999, **45**(9):1099–1119.

10. Shenton ME, Dickey CC, Frumin M, McCarley RW: **A review of MRI findings in schizophrenia.** *Schizophr Res* 2001, **49**(1-2):1-52.
11. Wright IC, Rabe-Hesketh S, Woodruff PW, David AS, Murray RM, Bullmore ET: **Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia.** *Am J Psychiatry* 2000, **157**(1):16-25.
12. Weinberger DR: **Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia.** *Arch Gen Psychiatry* 1987, **44**(7):660-669.
13. Jones P, Murray RM: **The genetics of schizophrenia is the genetics of neurodevelopment.** *Br J Psychiatry J Mental Sci* 1991, **158**:615-623.
14. Murray RM: **Neurodevelopmental schizophrenia: the rediscovery of dementia praecox.** *Br J Psychiatry Suppl* 1994, **25**:6-12.
15. Lewis DA, Levitt P: **Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment.** *Annu Rev Neurosci* 2002, **25**:409-432.
16. McGrath JJ, Murray RM: **Risk factors for schizophrenia: from conception to birth.** In *Schizophrenia*. 2nd edition. Edited by Hirsch SR, Weinberger DR. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd; 2007.
17. Rapoport JL, Addington AM, Frangou S, Psych MR: **The neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2005.** *Mol Psychiatry* 2005, **10**(5):434-449.
18. DeLisi LE, Sakuma M, Tew W, Kushner M, Hoff AL, Grimson R: **Schizophrenia as a chronic active brain process: a study of progressive brain structural change subsequent to the onset of schizophrenia.** *Psychiatry Res* 1997, **74**(3):129-140.
19. DeLisi LE: **Is schizophrenia a lifetime disorder of brain plasticity, growth and aging?** *Schizophr Res* 1997, **23**(2):119-129.
20. Woods BT: **Is schizophrenia a progressive neurodevelopmental disorder? Toward a unitary pathogenetic mechanism.** *Am J Psychiatry* 1998, **155**(12):1661-1670.
21. Lieberman JA: **Is schizophrenia a neurodegenerative disorder? A clinical and neurobiological perspective.** *Biol Psychiatry* 1999, **46**(6):729-739.
22. Lieberman J, Chakos M, Wu H, Alvir J, Hoffman E, Robinson D, Bilder R: **Longitudinal study of brain morphology in first episode schizophrenia.** *Biol Psychiatry* 2001, **49**(6):487-499.
23. Pantelis C, Velakoulis D, McGorry PD, Wood SJ, Suckling J, Phillips LJ, Yung AR, Bullmore ET, Brewer W, Soulsby B, et al: **Neuroanatomical abnormalities before and after onset of psychosis: a cross-sectional and longitudinal MRI comparison.** *Lancet* 2003, **361**(9354):281-288.
24. Ho BC, Andreasen NC, Nopoulos P, Arndt S, Magnotta V, Flaum M: **Progressive structural brain abnormalities and their relationship to clinical outcome: a longitudinal magnetic resonance imaging study early in schizophrenia.** *Arch Gen Psychiatry* 2003, **60**(6):585-594.
25. Job DE, Whalley HC, Johnstone EC, Lawrie SM: **Grey matter changes over time in high risk subjects developing schizophrenia.** *Neuroimage* 2005, **25**(4):1023-1030.
26. Ashburner J, Friston KJ: **Voxel-based morphometry—the methods.** *Neuroimage* 2000, **11**(6 Pt 1):805-821.
27. Busatto GF, Diniz BS, Zanetti MV: **Voxel-based morphometry in Alzheimer's disease.** *Expert Rev Neurother* 2008, **8**(11):1691-1702.
28. Ashburner J: **Computational anatomy with the SPM software.** *Magn Reson Imaging* 2009, **27**(8):1163-1174.
29. Mathalon DH, Sullivan EV, Lim KO, Pfefferbaum A: **Progressive brain volume changes and the clinical course of schizophrenia in men: a longitudinal magnetic resonance imaging study.** *Arch Gen Psychiatry* 2001, **58**(2):148-157.
30. Kempton MJ, Stahl D, Williams SC, DeLisi LE: **Progressive lateral ventricular enlargement in schizophrenia: a meta-analysis of longitudinal MRI studies.** *Schizophr Res* 2010, **120**(1-3):54-62.
31. DeLisi LE: **The concept of progressive brain change in schizophrenia: implications for understanding schizophrenia.** *Schizophr Bull* 2008, **34**(2):312-321.
32. Weinberger DR, McClure RK: **Neurotoxicity, neuroplasticity, and magnetic resonance imaging morphometry: what is happening in the schizophrenic brain?** *Arch Gen Psychiatry* 2002, **59**(6):553-558.
33. Degreaf G, Ashtari M, Wu HW, Borenstein M, Geisler S, Lieberman J: **Follow up MRI study in first episode schizophrenia.** *Schizophr Res* 1991, **5**(3):204-206.
34. Vita A, Giobbio GM, Dieci M, Garbarini M, Morganti C, Comazzi M, Invernizzi G: **Stability of cerebral ventricular size from the appearance of the first psychotic symptoms to the later diagnosis of schizophrenia.** *Biol Psychiatry* 1994, **35**(12):960-962.
35. Jaskiw GE, Juliano DM, Goldberg TE, Hertzman M, Urow-Hamell E, Weinberger DR: **Cerebral ventricular enlargement in schizophreniform disorder does not progress. A seven year follow-up study.** *Schizophr Res* 1994, **14**(1):23-28.
36. Nair TR, Christensen JD, Kingsbury SJ, Kumar NG, Terry WM, Garver DL: **Progression of cerebroventricular enlargement and the subtyping of schizophrenia.** *Psychiatry Res* 1997, **74**(3):141-150.
37. Pantelis C, Yucel M, Wood SJ, Velakoulis D, Sun D, Berger G, Stuart GW, Yung A, Phillips L, McGorry PD: **Structural brain imaging evidence for multiple pathological processes at different stages of brain development in schizophrenia.** *Schizophr Bull* 2005, **31**(3):672-696.
38. Moncrieff J, Leo J: **A systematic review of the effects of antipsychotic drugs on brain volume.** *Psychol Med* 2010, **40**(9):1409-1422.
39. Scherk H, Falkai P: **Effects of antipsychotics on brain structure.** *Curr Opin Psychiatry* 2006, **19**(2):145-150.
40. van Haren NE, Cahn W, Hulshoff Pol HE, Kahn RS: **Schizophrenia as a progressive brain disease.** *Eur Psychiatry J Assoc Eur Psychiatrists* 2008, **23**(4):245-254.
41. Navari S, Dazzan P: **Do antipsychotic drugs affect brain structure? A systematic and critical review of MRI findings.** *Psychol Med* 2009, **39**(11):1763-1777.
42. Lewis DA: **Brain volume changes in schizophrenia: how do they arise? What do they mean?** *Psychol Med* 2009, **39**(11):1779-1780.
43. Smieskova R, Fusar-Poli P, Allen P, Bendfeldt K, Stieglitz RD, Drewe J, Radue EW, McGuire PK, Riecher-Rossler A, Borgwardt SJ: **The effects of antipsychotics on the brain: what have we learnt from structural imaging of schizophrenia?—a systematic review.** *Curr Pharm Des* 2009, **15**(22):2535-2549.
44. Gilbert PL, Harris MJ, McAdams LA, Jeste DV: **Neuroleptic withdrawal in schizophrenic patients. A review of the literature.** *Arch Gen Psychiatry* 1995, **52**(3):173-188.
45. Csemansky JG, Mahmoud R, Brenner R, Risperidone USASG: **A comparison of risperidone and haloperidol for the prevention of relapse in patients with schizophrenia.** *N Engl J Med* 2002, **346**(1):16-22.
46. Meltzer HY, Alphs L, Green AI, Altamura AC, Anand R, Bertoldi A, Bourgeois M, Chouinard G, Islam MZ, Kane J, et al: **Clozapine treatment for suicidality in schizophrenia: international suicide prevention trial (InterSePT).** *Arch Gen Psychiatry* 2003, **60**(1):82-91.
47. Leucht S, Barnes TR, Kissling W, Engel RR, Correll C, Kane JM: **Relapse prevention in schizophrenia with new-generation antipsychotics: a systematic review and exploratory meta-analysis of randomized, controlled trials.** *Am J Psychiatry* 2003, **160**(7):1209-1222.
48. Dolder CR, Lacro JP, Leckband S, Jeste DV: **Interventions to improve antipsychotic medication adherence: review of recent literature.** *J Clin Psychopharmacol* 2003, **23**(4):389-399.
49. Keefe RS, Seidman LJ, Christensen BK, Hamer RM, Sharma T, Sitskoorn MM, Lewine RR, Yurgelun-Todd DA, Gur RC, Tohen M, et al: **Comparative effect of atypical and conventional antipsychotic drugs on neurocognition in first-episode psychosis: a randomized, double-blind trial of olanzapine versus low doses of haloperidol.** *Am J Psychiatry* 2004, **161**(6):985-995.
50. Roth BL, Sheffler DJ, Kroeze WK: **Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia.** *Nat Rev Drug Discov* 2004, **3**(4):353-359.
51. Lewis DA, Gonzalez-Burgos G: **Pathophysiologically based treatment interventions in schizophrenia.** *Nat Med* 2006, **12**(9):1016-1022.
52. Kapur S, Agid O, Mizrahi R, Li M: **How antipsychotics work-from receptors to reality.** *NeuroRx J Am Soc Exper NeuroTherap* 2006, **3**(1):10-21.
53. Arranz MJ, de Leon J: **Pharmacogenetics and pharmacogenomics of schizophrenia: a review of last decade of research.** *Mol Psychiatry* 2007, **12**(8):707-747.
54. Meltzer HY, Li Z, Kaneda Y, Ichikawa J: **Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia.** *Prog Neuro-psychopharmacol Biol Psychiatry* 2003, **27**(7):1159-1172.
55. Kapur S, Remington G: **Dopamine D(2) receptors and their role in atypical antipsychotic action: still necessary and may even be sufficient.** *Biol Psychiatry* 2001, **50**(11):873-883.
56. Honea R, Crow TJ, Passingham D, Mackay CE: **Regional deficits in brain volume in schizophrenia: a meta-analysis of voxel-based morphometry studies.** *Am J Psychiatry* 2005, **162**(12):2233-2245.
57. Kakeda S, Korogi Y: **The efficacy of a voxel-based morphometry on the analysis of imaging in schizophrenia, temporal lobe epilepsy, and Alzheimer's disease/mild cognitive impairment: a review.** *Neuroradiology* 2010, **52**(8):711-721.

58. Turkeltaub PE, Eden GF, Jones KM, Zeffiro TA: **Meta-analysis of the functional neuroanatomy of single-word reading: method and validation.** *Neuroimage* 2002, **16**(3 Pt 1):765–780.
59. Laird AR, Fox PM, Price CJ, Glahn DC, Uecker AM, Lancaster JL, Turkeltaub PE, Kochunov P, Fox PT: **ALE meta-analysis: controlling the false discovery rate and performing statistical contrasts.** *Hum Brain Mapp* 2005, **25**(1):155–164.
60. Eickhoff SB, Laird AR, Grefkes C, Wang LE, Zilles K, Fox PT: **Coordinate-based activation likelihood estimation meta-analysis of neuroimaging data: a random-effects approach based on empirical estimates of spatial uncertainty.** *Hum Brain Mapp* 2009, **30**(9):2907–2926.
61. Fox PT, Laird AR, Lancaster JL: **Coordinate-based voxel-wise meta-analysis: dividends of spatial normalization. Report of a virtual workshop.** *Hum Brain Mapp* 2005, **25**(1):1–5.
62. Schroeter ML, Stein T, Maslowski N, Neumann J: **Neural correlates of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a systematic and quantitative meta-analysis involving 1351 patients.** *Neuroimage* 2009, **47**(4):1196–1206.
63. Good CD, Johnsrude IS, Ashburner J, Henson RN, Friston KJ, Frackowiak RS: **A voxel-based morphometric study of ageing in 465 normal adult human brains.** *Neuroimage* 2001, **14**(1 Pt 1):21–36.
64. Talairach J, Tournoux P: *Co-planar stereotaxic atlas of the human brain: an approach to medical cerebral imaging.* New York: Thieme; 1988.
65. Evans AC, Collins DL, Mills SR, Brown ED, Kelly RL, Peters TM: **3D statistical neuroanatomical models from 305 MRI volumes.** *Proc IEEE Nucl Sci Symp Med Imag* 1993, **1–3**:1813–1817.
66. Collins DL, Neelin P, Peters TM, Evans AC: **Automatic 3D intersubject registration of MR volumetric data in standardized talairach space.** *J Comput Assist Tomogr* 1994, **18**(2):192–205.
67. Turkeltaub PE, Eickhoff SB, Laird AR, Fox M, Wiener M, Fox P: **Minimizing within-experiment and within-group effects in activation likelihood estimation meta-analyses.** *Human Brain Mapp* 2012, **33**(1):1–13.
68. Lancaster JL, Tordesillas-Gutierrez D, Martinez M, Salinas F, Evans A, Zilles K, Mazziotta JC, Fox PT: **Bias between MNI and talairach coordinates analyzed using the ICBM-152 brain template.** *Hum Brain Mapp* 2007, **28**(11):1194–1205.
69. Laird AR, Robinson JL, McMillan KM, Tordesillas-Gutierrez D, Moran ST, Gonzales SM, Ray KL, Franklin C, Glahn DC, Fox PT, et al: **Comparison of the disparity between talairach and MNI coordinates in functional neuroimaging data: validation of the Lancaster transform.** *Neuroimage* 2010, **51**(2):677–683.
70. Eickhoff SB, Bzdok D, Laird AR, Kurth F, Fox PT: **Activation likelihood estimation meta-analysis revisited.** *Neuroimage* 2012, **59**(3):2349–2361.
71. Leung M, Cheung C, Yu K, Yip B, Sham P, Li Q, Chua S, McAlonan G: **Gray matter in first-episode schizophrenia before and after antipsychotic drug treatment. Anatomical likelihood estimation meta-analyses with sample size weighting.** *Schizophrenia Bull* 2011, **37**(1):199–211.
72. Yu KK, Cheung C, Chua SE, McAlonan GM: **Can Asperger syndrome be distinguished from autism? An anatomic likelihood meta-analysis of MRI studies.** *J Psychiatry Neurosci* 2011, **36**(6):412–421.
73. Chase HW, Eickhoff SB, Laird AR, Hogarth L: **The neural basis of drug stimulus processing and craving: an activation likelihood estimation meta-analysis.** *Biol Psychiatry* 2011, **70**(8):785–793.
74. Ferreira LK, Diniz BS, Forlenza OV, Busatto GF, Zanetti MV: **Neurostructural predictors of Alzheimer's disease: a meta-analysis of VBM studies.** *Neurobiol Aging* 2011, **32**(10):1733–1741.
75. Massana G, Salgado-Pineda P, Junque C, Perez M, Baeza I, Pons A, Massana J, Navarro V, Blanch J, Morer A, et al: **Volume changes in gray matter in first-episode neuroleptic-naïve schizophrenic patients treated with risperidone.** *J Clin Psychopharmacol* 2005, **25**(2):111–117.
76. Schaufelberger MS, Duran FL, Lappin JM, Scazufca M, Amaro E Jr, Leite CC, de Castro CC, Murray RM, McGuire PK, Menezes PR, et al: **Gray matter abnormalities in Brazilians with first-episode psychosis.** *Br J Psychiatry Suppl* 2007, **51**:s117–s122.
77. Dazzan P, Morgan KD, Orr K, Hutchinson G, Chitnis X, Suckling J, Fearon P, McGuire PK, Mallett RM, Jones PB, et al: **Different effects of typical and atypical antipsychotics on grey matter in first episode psychosis: the AESOP study.** *Neuropsychopharmacol Off Publ Am College Neuropsychopharmacol* 2005, **30**(4):765–774.
78. Girgis RR, Diwadkar VA, Nuttall JJ, Sweeney JA, Keshavan MS, Hardan AY: **Risperidone in first-episode psychosis: a longitudinal, exploratory voxel-based morphometric study.** *Schizophr Res* 2006, **82**(1):89–94.
79. Whitford TJ, Grieve SM, Farrow TF, Gomes L, Brennan J, Harris AW, Gordon E, Williams LM: **Progressive grey matter atrophy over the first 2–3 years of illness in first-episode schizophrenia: a tensor-based morphometry study.** *Neuroimage* 2006, **32**(2):511–519.
80. Douaud G, Smith S, Jenkinson M, Behrens T, Johansen-Berg H, Vickers J, James S, Voets N, Watkins K, Matthews PM, et al: **Anatomically related grey and white matter abnormalities in adolescent-onset schizophrenia.** *Brain J Neurol* 2007, **130**(Pt 9):2375–2386.
81. Theberge J, Williamson KE, Aoyama N, Drost DJ, Manchanda R, Malla AK, Northcott S, Menon RS, Neufeld RW, Rajakumar N, et al: **Longitudinal grey-matter and glutamatergic losses in first-episode schizophrenia.** *Br J Psychiatry J Mental Sci* 2007, **191**:325–334.
82. Stip E, Mancini-Marie A, Letourneau G, Fahim C, Mensour B, Crivello F, Dollfus S: **Increased grey matter densities in schizophrenia patients with negative symptoms after treatment with quetiapine: a voxel-based morphometry study.** *Int Clin Psychopharmacol* 2009, **24**(1):34–41.
83. Tomelleri L, Jogi J, Perlini C, Bellani M, Ferro A, Rambaldelli G, Tansella M, Frangou S, Brambilla P: **Neuroimaging network of the Eni: Brain structural changes associated with chronicity and antipsychotic treatment in schizophrenia.** *Eur Neuropsychopharmacol J Eur College Neuropsychopharmacol* 2009, **19**(12):835–840.
84. Deng MY, McAlonan GM, Cheung C, Chiu CP, Law CW, Cheung V, Sham PC, Chen EY, Chua SE: **A naturalistic study of grey matter volume increase after early treatment in anti-psychotic naïve, newly diagnosed schizophrenia.** *Psychopharmacology (Berl)* 2009, **206**(3):437–446.
85. Chua SE, Deng Y, Chen EY, Law CW, Chiu CP, Cheung C, Wong JC, Lienenkemper N, Cheung V, Suckling J, et al: **Early striatal hypertrophy in first-episode psychosis within 3 weeks of initiating antipsychotic drug treatment.** *Psychol Med* 2009, **39**(5):793–800.
86. Molina V, Martin C, Ballesteros A, de Herrera AG, Hernandez-Tamames JA: **Optimized voxel brain morphometry: association between brain volumes and the response to atypical antipsychotics.** *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2011, **261**(6):407–416.
87. Molina V, Reig S, Sanz J, Palomo T, Benito C, Sanchez J, Sarraime F, Pascau J, Desco M: **Increase in gray matter and decrease in white matter volumes in the cortex during treatment with atypical neuroleptics in schizophrenia.** *Schizophr Res* 2005, **80**(1):61–71.
88. Segall JM, Turner JA, van Erp TG, White T, Bockholt HJ, Gollub RL, Ho BC, Magnotta V, Jung RE, McCarley RW, et al: **Voxel-based morphometric multisite collaborative study on schizophrenia.** *Schizophr Bull* 2009, **35**(1):82–95.
89. Cahn W, Hulshoff Pol HE, Lems EB, van Haren NE, Schnack HG, van der Linden JA, Schothorst PF, van Engeland H, Kahn RS: **Brain volume changes in first-episode schizophrenia: a 1-year follow-up study.** *Arch Gen Psychiatry* 2002, **59**(11):1002–1010.
90. McClure RK, Carew K, Greeter S, Maushauer E, Steen G, Weinberger DR: **Absence of regional brain volume change in schizophrenia associated with short-term atypical antipsychotic treatment.** *Schizophr Res* 2008, **98**(1–3):29–39.
91. Frazier JA, Giedd JN, Kaysen D, Albus K, Hamburger S, Alagband-Rad J, Lenane MC, McKenna K, Breier A, Rapoport JL: **Childhood-onset schizophrenia: brain MRI rescan after 2 years of clozapine maintenance treatment.** *Am J Psychiatry* 1996, **153**(4):564–566.
92. Lieberman JA, Tollefson GD, Charles C, Zipursky R, Sharma T, Kahn RS, Keefe RS, Green AI, Gur RE, McEvoy J, et al: **Antipsychotic drug effects on brain morphology in first-episode psychosis.** *Arch Gen Psychiatry* 2005, **62**(4):361–370.
93. Nakamura M, Salisbury DF, Hirayasu Y, Bouix S, Pohl KM, Yoshida T, Koo MS, Shenton ME, McCarley RW: **Neocortical gray matter volume in first-episode schizophrenia and first-episode affective psychosis: a cross-sectional and longitudinal MRI study.** *Biol Psychiatry* 2007, **62**(7):773–783.
94. Jayakumar PN, Venkatasubramanian G, Gangadhar BN, Janakiramaiah N, Keshavan MS: **Optimized voxel-based morphometry of gray matter volume in first-episode, antipsychotic-naïve schizophrenia.** *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005, **29**(4):587–591.
95. Davatzikos C, Shen D, Gur RC, Wu X, Liu D, Fan Y, Hughett P, Turetsky BI, Gur RE: **Whole-brain morphometric study of schizophrenia revealing a spatially complex set of focal abnormalities.** *Arch Gen Psychiatry* 2005, **62**(11):1218–1227.
96. Tauscher-Wisniewski S, Tauscher J, Christensen BK, Mikulis DJ, Zipursky RB: **Volumetric MRI measurement of caudate nuclei in antipsychotic-naïve**

- patients suffering from a first episode of psychosis. *J Psychiatr Res* 2005, **39**(4):365–370.
97. Puri BK, Hutton SB, Saeed N, Oatridge A, Hajnal JV, Duncan L, Chapman MJ, Barnes TR, Bydder GM, Joyce EM: **A serial longitudinal quantitative MRI study of cerebral changes in first-episode schizophrenia using image segmentation and subvoxel registration.** *Psychiatry Res* 2001, **106**(2):141–150.
 98. Ho BC, Andreasen NC, Ziebell S, Pierson R, Magnotta V: **Long-term antipsychotic treatment and brain volumes: a longitudinal study of first-episode schizophrenia.** *Arch Gen Psychiatry* 2011, **68**(2):128–137.
 99. Harrison PJ: **The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation.** *Brain J Neurol* 1999, **122**(Pt 4):593–624.
 100. Kubicki M, Shenton ME, Salisbury DF, Hirayasu Y, Kasai K, Kikinis R, Jolesz FA, McCarley RW: **Voxel-based morphometric analysis of gray matter in first episode schizophrenia.** *Neuroimage* 2002, **17**(4):1711–1719.
 101. Jayakumar PN, Venkatasubramanian G, Keshavan MS, Srinivas JS, Gangadhar BN: **MRI volumetric and 31P MRS metabolic correlates of caudate nucleus in antipsychotic-naïve schizophrenia.** *Acta Psychiatr Scand* 2006, **114**(5):346–351.
 102. Narr KL, Bilder RM, Toga AW, Woods RP, Rex DE, Szeszko PR, Robinson D, Sevy S, Gunduz-Bruce H, Wang YP, et al: **Mapping cortical thickness and gray matter concentration in first episode schizophrenia.** *Cereb Cortex* 2005, **15**(6):708–719.
 103. Sigmundsson T, Suckling J, Maier M, Williams S, Bullmore E, Greenwood K, Fukuda R, Ron M, Toone B: **Structural abnormalities in frontal, temporal, and limbic regions and interconnecting white matter tracts in schizophrenic patients with prominent negative symptoms.** *Am J Psychiatry* 2001, **158**(2):234–243.
 104. Suzuki M, Nohara S, Hagino H, Kurokawa K, Yotsutsuji T, Kawasaki Y, Takahashi T, Matsui M, Watanabe N, Seto H, et al: **Regional changes in brain gray and white matter in patients with schizophrenia demonstrated with voxel-based analysis of MRI.** *Schizophr Res* 2002, **55**(1–2):41–54.
 105. DeLisi LE, Holcomb HH, Cohen RM, Pickar D, Carpenter W, Morihisa JM, King AC, Kessler R, Buchsbaum MS: **Positron emission tomography in schizophrenic patients with and without neuroleptic medication.** *J Cereb Blood Flow Metabol Off J Int Soc Cerebral Blood Flow Metabol* 1985, **5**(2):201–206.
 106. Wolkin A, Jaeger J, Brodie JD, Wolf AP, Fowler J, Rotrosen J, Gomez-Mont F, Cancro R: **Persistence of cerebral metabolic abnormalities in chronic schizophrenia as determined by positron emission tomography.** *Am J Psychiatry* 1985, **142**(5):564–571.
 107. Berman I, Merson A, Sison C, Allan E, Schaefer C, Loberboym M, Losonczy MF: **Regional cerebral blood flow changes associated with risperidone treatment in elderly schizophrenia patients: a pilot study.** *Psychopharmacol Bull* 1996, **32**(1):95–100.
 108. Liddle PF, Lane CJ, Ngan ET: **Immediate effects of risperidone on cortico-striato-thalamic loops and the hippocampus.** *Br J Psychiatry J Mental Sci* 2000, **177**:402–407.
 109. Corson PW, O'Leary DS, Miller DD, Andreasen NC: **The effects of neuroleptic medications on basal ganglia blood flow in schizophreniform disorders: a comparison between the neuroleptic-naïve and medicated states.** *Biol Psychiatry* 2002, **52**(9):855–862.
 110. Baiano M, David A, Versace A, Churchill R, Balestrieri M, Brambilla P: **Anterior cingulate volumes in schizophrenia: a systematic review and a meta-analysis of MRI studies.** *Schizophr Res* 2007, **93**(1–3):1–12.
 111. Choi JS, Kang DH, Kim JJ, Ha TH, Roh KS, Youn T, Kwon JS: **Decreased caudal anterior cingulate gyrus volume and positive symptoms in schizophrenia.** *Psychiatry Res* 2005, **139**(3):239–247.
 112. McCormick L, Decker L, Nopoulos P, Ho BC, Andreasen N: **Effects of atypical and typical neuroleptics on anterior cingulate volume in schizophrenia.** *Schizophr Res* 2005, **80**(1):73–84.
 113. Kopelman A, Andreasen NC, Nopoulos P: **Morphology of the anterior cingulate gyrus in patients with schizophrenia: relationship to typical neuroleptic exposure.** *Am J Psychiatry* 2005, **162**(10):1872–1878.
 114. Lewis DA: **Antipsychotic medications and brain volume: do we have cause for concern?** *Arch Gen Psychiatry* 2011, **68**(2):126–127.

doi:10.1186/1471-244X-13-342

Cite this article as: Torres et al.: Structural brain changes associated with antipsychotic treatment in schizophrenia as revealed by voxel-based morphometric MRI: an activation likelihood estimation meta-analysis. *BMC Psychiatry* 2013 **13**:342.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- **Convenient online submission**
- **Thorough peer review**
- **No space constraints or color figure charges**
- **Immediate publication on acceptance**
- **Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar**
- **Research which is freely available for redistribution**

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

APRIL 15, 2014

Statement of Accomplishment

**ULYSSES DOS SANTOS
TORRES**

HAS SUCCESSFULLY COMPLETED THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY'S OFFERING OF

Statistical Analysis of fMRI Data

This course explores the intersection of statistics and functional magnetic resonance imaging, covering analysis of fMRI data, acquisition, and use in locating brain activity and making inferences about connectivity and predictions about psychological or disease states.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Lindquist'.

MARTIN LINDQUIST, PHD, MSC
DEPARTMENT OF BIOSTATISTICS
BLOOMBERG SCHOOL OF PUBLIC HEALTH
JOHNS HOPKINS UNIVERSITY

PLEASE NOTE: THE ONLINE OFFERING OF THIS CLASS DOES NOT REFLECT THE ENTIRE CURRICULUM OFFERED TO STUDENTS ENROLLED AT THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY. THIS STATEMENT DOES NOT AFFIRM THAT THIS STUDENT WAS ENROLLED AS A STUDENT AT THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY IN ANY WAY. IT DOES NOT CONFER A JOHNS HOPKINS UNIVERSITY GRADE; IT DOES NOT CONFER JOHNS HOPKINS UNIVERSITY CREDIT; IT DOES NOT CONFER A JOHNS HOPKINS UNIVERSITY DEGREE; AND IT DOES NOT VERIFY THE IDENTITY OF THE STUDENT.