

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS BIOMARCADORES PARA AS  
PARAPARESIAS ESPÁSTICAS HEREDITÁRIAS: POTENCIAL EVOCADO  
MOTOR E SOMATO-SENSITIVO**

SAMANTA FERRARESI BRIGHENTE

Porto Alegre

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS BIOMARCADORES PARA AS  
PARAPARESIAS ESPÁSTICAS HEREDITÁRIAS: POTENCIAL EVOCADO  
MOTOR E SOMATO-SENSITIVO**

SAMANTA FERRARESI BRIGHENTE

Orientador: Prof. Dr. Jonas Alex Morales Saute

Dissertação apresentada como requisito  
parcial para obtenção do título de Mestre em  
Medicina: Ciências Médicas pela Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-  
Graduação em Medicina: Ciências Médica

Porto Alegre

2021

*“The journey, not the arrival matters”*

*Leonard Woolf, 1989*

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus por ter conduzido até aqui, por ter colocado em meu caminho pessoas que foram fundamentais no meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Aos meus pais, Márcia e Odenir Brighente, pela educação que me proporcionaram, pelo incentivo e apoio durante minha formação e a realização deste projeto. Ao meu esposo Vinicius Perius pelo amor e por me fazer acreditar todos os dias na minha capacidade de alcançar meus sonhos.

As famílias portadoras de Paraparesia Espástica Hereditária por terem participado da pesquisa mesmo com todos os empecilhos impostos neste ano de pandemia da Covid-19.

Aos meus queridos amigos que compuseram os 20 indivíduos participantes do grupo controle, a quem a pesquisa não trouxe nenhum benefício direto.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Neuromodulação chefiado pelo Prof Wolnei Calmo, por esta parceria, por terem me cedido seu espaço e especialmente ao Paul Vicuna por seus ensinamentos com a estimulação transcraniana magnética.

Ao grupo de neurofisiologia do Serviço de Neurologia do HCPA pela parceria na realização dos Potenciais Evocados Somato-sensitivos especialmente pelos ensinamentos da querida Ana Paula Louzada e do mestre Pablo Winckler.

Ao grupo de pesquisa clínica em Genética das Doenças Neuromusculares, o NEMUG, pela amizade pelos valiosos conhecimentos compartilhados e pelo trabalho em equipe.

E finalmente ao meu orientador o Prof Jonas Saute por ter acreditado em meu potencial, por ser sempre presente e disponível e por todos os ensinamentos que excedem o campo deste projeto.

## RESUMO

**Introdução:** As Paraparesias Espásticas Hereditárias (PEH) são um grupo de doenças monogênicas neurodegenerativas que levam à deterioração lenta da locomoção. As escalas clínicas parecem ter baixa sensibilidade na detecção da progressão da doença, tornando a busca por biomarcadores adicionais uma tarefa fundamental. **Objetivo:** avaliar o papel dos potenciais evocados como biomarcadores de doenças nas PEHs. **Métodos:** foi realizado um estudo caso-controle transversal de centro único, no qual foram avaliados 18 indivíduos com diagnóstico molecular de PEH e 20 controles saudáveis. Os potenciais evocados motores (PEM) obtidos através de estimulação magnética transcraniana e os potenciais evocados somato-sensitivos (PESS) foram avaliados nos membros inferiores (MI) e superiores (MS) em ambos os grupos. **Resultados:** O tempo central de condução motora nos membros inferiores (TCCM-MI) foi prolongado ou ausente em 100% (18/18) dos indivíduos com PEH, com marcada redução nas amplitudes quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,001$  para ambas as comparações). O TCCM-MS foi 3,59ms maior (IC 95%: 0,73 a 6,46;  $p = 0,015$ ) e as amplitudes foram reduzidas ( $p = 0,008$ ) no grupo PEH. As latências do PESS-MI foram prolongadas em indivíduos com PEH quando comparados aos controles ( $p < 0,001$ ), sem diferenças estatisticamente significativas para as latências do PESS-MS ( $p = 0,147$ ). As latências do PESS-MS e PESS-MI apresentaram correlações moderadas a fortes com a idade de início dos sintomas ( $Rho = 0,613$ ;  $p = 0,012$ ) e a duração da doença ( $Rho = 0,835$ ;  $p < 0,001$ ), respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos para os subgrupos de pacientes com SPG4. **Conclusão:** Os potenciais evocados motores e somato-sensitivos apresentaram validade discriminatória adequada, distinguindo casos e controles. Os PEMs foram gravemente afetados e as latências dos PESS-MI foram prolongadas, com maiores latências sendo relacionadas a doença mais grave. Futuros estudos longitudinais devem avaliar se o TCCM em estágios iniciais da doença e as latências do PESS serão biomarcadores sensíveis para detectar a progressão de doença nas paraparesias espásticas hereditárias.

**Palavras-chave:** paraparesia espástica hereditária; biomarcador; potencial evocado motor; potencial evocado somato-sensitivo; potenciais evocados

## Abstract

**Background:** The Hereditary Spastic Paraplegias (HSP) are a group of genetic diseases that lead to slow deterioration of locomotion. Clinical scales seem to have low sensitivity in detecting disease progression, making the search for additional biomarkers a paramount task. This study aims to evaluate the role of evoked potentials (EPs) as disease biomarkers of HSPs. **Methods:** a single center cross-sectional case-control study was performed, in which 18 individuals with genetic diagnosis of HSP and 20 healthy controls were evaluated. Motor evoked potentials (MEP) obtained with transcranial magnetic stimulation and somatosensory evoked potentials (SSEP) were performed in lower (LL) and upper limbs (UL). **Results:** Central motor conduction time in lower limbs (CMCT-LL) was prolonged or absent in 100% (18/18) of HSP subjects, with marked reductions in MEP-LL amplitudes when compared to the control group ( $p < 0.001$  for both comparisons). CMCT-UL was 3.59ms (95% CI: 0.73 to 6.46;  $p = 0.015$ ) prolonged and MEP-UL amplitudes were reduced ( $p = 0.008$ ) in the HSP group. SSEP-LL latencies were prolonged in HSP subjects when compared to controls ( $p < 0.001$ ), with no statistically significant differences for upper limbs latencies ( $p = 0.147$ ). SSEP-UL and SSEP-LL latencies presented moderate to strong correlations with age at onset ( $Rho = 0.613$ ,  $p = 0.012$ ) and disease duration ( $Rho = 0.835$ ,  $p < 0.001$ ), respectively. Similar results were obtained for the SPG4 subgroups of patients. **Conclusion:** Motor and somatosensory evoked potentials presented adequate discriminatory validity, distinguishing HSP subjects from controls. MEP were severely affected and SSEP-LL latencies were prolonged, with longer latencies being related to more severe disease. Future longitudinal studies should address if CMCT in earliest disease stages and SSEP latencies are sensitive disease progression biomarker for HSP.

**Keywords:** hereditary spastic paraplegia; biomarker; motor evoked potential; somatosensory evoked potentials; evoked potentials

## **LISTA DE FIGURAS**

**Figura 1: Fluxograma da revisão sistematizada da literatura**

**Figura 2 Aspectos históricos das PEH**

**Figura 3 Achados qualitativos de imagem de utilidade clínica em indivíduos com PEH**

**Artigo:**

**Figure 1. Comparisons between cases and controls**

**Figure 2. Correlations in the HSP and SPG4 subgroup**

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1 – Classificação genética de acordo com a forma clínica das PEH –  
pag 22**

**Artigo:**

**Table 1. Main demographics characteristics of the study sample**

**Table 2. Main motor and somatosensory evoked potentials findings**

**Supplementary table 1. Correlations in the HSP overall**

**Supplementary table 2. Correlations in the SPG4 subgroup**



## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ADM: Músculo abductor do dedo mínimo

AH: Músculo Abductor do hálux

Cm: Centímetros

CMCT: Central Motor conduction time

CMCT – UL: Central Motor Conduction Time Upper limbs

CMCT – LL: Central Motor Conduction Time Lower limbs

DCMR: Diferença Mínima Clinicamente Relevante

DTI: Tractografia por Difusão

DM: difusibilidade média

ECR: Ensaio Clínico Randomizado

EEG: eletroencefalograma

ECL (eletroquimioluminescencia

EP: Evoked Potencial

FA: Fração de Anisotropia

FDI: músculo Firts Dorsal interosseus

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HSP: *Hereditary Spastic Paraplegia*

iPSCs: induced Pluripotente Steam Cels

LCR: liquido céfalo-raquidiano

M: músculo

MEP: Motor Evoked Potencial

MMII: membros inferiores

MMSS: membros superiores

N: nervo

NCS: neuroconduções

NCM: neurocondução motora  
NCS: neurocondução sensitiva  
NM: Nervo mediado  
MiR: micro RNA  
mRNA: micro RNA  
NTP: Nervo tibial posterior  
NfL: Neurofilamentos  
PE: Potencias Evocados  
PEM: Potencial evocado motor  
PESS: Potencial evocado Somato-sensitivo  
PEH: Paraparesias Espásticas Hereditárias  
PEH-AD: Paraparesia Espástica Hereditária Autossômica Dominante  
PEH-AR: Paraparesia Espástica Hereditária Autossômica Recessiva  
PEH-C: Paraparesias Espásticas Hereditárias Complicadas  
PEH-NC: Paraparesias Espásticas Hereditárias nas Formas não Complicadas  
PEM: Potencial Evocado motor  
PESS: Potencial Evocado Somatossensitivo  
PGI: Impressão Clínica Global de Melhora do Paciente  
PMCT: Periferic motor conduction time  
RMN: Ressonância magnética nuclear  
ROC: *Receiver Operating Characteristic*  
SARA: *Scale for the Assessment and Rating of Ataxia*  
SCA: Ataxias Espinocerebelares  
SF-36 *Medical Outcomes Study 36- Item Short-Form Health Survey*  
SiMoA (single molecule array assays  
SNC: Sistema Nervoso Central

SPG: *Spastic Paraplegia*

SPOAN - Paraparesia Espástica com Atrofia Óptica e Neuropatia.

SPRS: *Spastic Paraplegia Rating Scale*

TA: Músculo tibial anterior

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TF: transcription factor

TMCT: total motor conduction time

TMS: Transcranial Magnetic Stimulation

WES: Whole Exome Sequencing

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Aspectos históricos .....</b>	<b>19</b>
<b>2.2 Aspectos Clínicos, Genéticos e Fisiopatológicos.....</b>	<b>20</b>
2.2.1 Classificação .....	21
<b>2.2.2 Formas Autossômicas Dominantes .....</b>	<b>23</b>
2.2.3 Formas Autossômicas Recessivas.....	24
<b>2.3 Epidemiologia .....</b>	<b>25</b>
<b>2.4 Diagnóstico.....</b>	<b>26</b>
<b>2.5 Biomarcadores.....</b>	<b>28</b>
2.5.1 Escalas clínicas e biomecânica .....	29
2.5.2 Ressonância Magnética .....	29
2.5.3 Biomarcadores séricos .....	31
2.5.4 Biomarcadores neurofisiológicos: potencial evocado motor e sensitivo .....	33
<b>2.6 Tratamento.....</b>	<b>36</b>
2.6.1 Tratamentos Medicamentosos .....	37
2.6.2 Neuromodulação invasiva e não-invasiva.....	39
<b>3. MARCO CONCEITUAL .....</b>	<b>41</b>
<b>4. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>41</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
5.1 Objetivo geral: .....	43
5.2 Objetivos específicos.....	43
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>44</b>
<b>7. ARTIGO.....</b>	<b>48</b>
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>75</b>
<b>9. PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>77</b>

<b>10. ANEXOS .....</b>	<b>78</b>
<b>10.1 SPRS .....</b>	<b>78</b>
<b>10.2 STROBE.....</b>	<b>80</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As Paraparesias Espásticas Hereditárias (PEH) são um grupo de doenças monogênicas neurodegenerativas com grande heterogeneidade genética e clínica (Schule et al, 2016). A característica principal deste grupo de condições é a degeneração retrógrada das fibras nervosas mais longas do trato córtico-espinhal e das colunas posteriores da medula espinhal (Bradley et al, 2016). Os sintomas são lentamente progressivos e caracterizam-se principalmente por espasticidade, fraqueza e perda da sensibilidade vibratória de predomínio nos membros inferiores (Schule et al, 2016; Martinuzzi et al, 2016). As PEH podem iniciar na infância, na adolescência ou na idade adulta (Shribman et al, 2019), no entanto em média os sintomas iniciam entre a terceira e quinta décadas de vida (Murray & Mitsumoto et al, 2013).

As PEH são classificadas em formas puras e complexas, desde a brilhante descrição de Anita Harding em uma era pré-molecular (Harding et al, 1983). Uma síndrome piramidal isolada caracteriza a PEH “pura”, embora possam ocorrer distúrbios neurogênicos da bexiga e comprometimento da sensibilidade vibratória. O envolvimento adicional de outros sistemas (comprometimento cognitivo, ataxia, sintomas dos gânglios da base, distúrbios visuais ou auditivos, sintomas de envolvimento de nervos periféricos) definirá a classificação como uma forma complexa de PEH, associadas a um curso de doença mais grave (Schule et al, 2016).

Há pelo menos 83 *loci*/genes descritos como associados às PEHs (Hedera et al, 2021), com formas de herança autossômica dominante, autossômica recessiva, ligadas ao X e mitocondriais (Schule et al, 2016). Estima-se que 13-40% dos casos são esporádicos, ou seja, sem história familiar (Schribman et al, 2019). A classificação genética das PEH é baseada na numeração sequencial dos *loci* cromossômicos ou genes específicos, conforme foram sendo descritos, precedida pelo acrônimo *SPG*, do termo em inglês *spastic paraplegia* (Depienne et al, 2007; Fink et al, 2014; Schribman et al, 2019).

As PEH são doenças raras, com prevalência estimada em 2-10 por 100.000 indivíduos (Schule et al, 2016; Bradley et al, 2016), embora este valor seja provavelmente subestimado em razão da falta de grandes estudos

genéticos e epidemiológicos. Apesar de as PEH serem condições raras, os poucos estudos de base populacional publicados, sugerem que sua prevalência seja similar a de outras condições neurológicas mais estudadas na literatura como as ataxias hereditárias e a esclerose lateral amiotrófica (Ruano et al, 2014).

Os mecanismos celulares que levam a degeneração axonal do trato córtico-espinhal são diversos e complexos assim como a genética molecular das PEH. A fisiopatologia das PEH está relacionada a variantes patogênicas que levam a perda ou modificações na função de proteínas importantes para o transporte de macromoléculas e organelas pelos axônios, remodelamento de microtúbulos e citoesqueleto (Salinas et al, 2008). Os axônios mais longos parecem ser os mais suscetíveis a alterações no tráfego de membrana e transporte axonal (Salinas et al, 2008). Os achados mais consistentes dos estudos post-mortem nas PEH são a degeneração dos axônios do trato córtico-espinhal (máxima na medula espinhal torácica), e das fibras do fascículo grácil no cordão posterior da medula espinhal (Fink, 2013).

Existem alguns instrumentos capazes de quantificar o dano causado aos tratos longos ou mesmo capazes de avaliar a gravidade da doença, entre os quais pode-se citar: estudos neurofisiológicos como os potenciais evocados, exames de imagem como a Ressonância Magnética de encéfalo e medula espinhal, instrumentos quantitativos de avaliação da marcha e escalas clínicas baseadas em exame neurológico como a *Spastic Paraplegia Rating Scale* (SPRS). Poucos estudos tentaram elucidar e quantificar o curso clínico das PEH por instrumentos de avaliação validados. O curso lentamente progressivo e a raridade desta condição tornam essa avaliação um grande desafio.

Os potenciais evocados são instrumentos capazes de avaliar o grau de acometimento da via sensitiva e motora. Geram uma variável contínua medida através de duas características principais: 1) a latência, que é a medida de tempo em milissegundos em que o estímulo elétrico neuronal leva da extremidade do membro até o córtex, ou vice-versa no caso do potencial motor e 2) a amplitude que avalia o tamanho do potencial elétrico neuronal, em microvolts. Este instrumento já foi usado para avaliar o grau de acometimento das vias neuronais nas PEHs, entretanto a maioria dos estudos avaliou pequenas amostras, com pobre caracterização clínica e genética.

Apesar de o conhecimento dos aspectos moleculares das PEH ter possibilitado grandes avanços no entendimento destas condições e das vias celulares envolvidas, a aplicação destes conhecimentos na busca de tratamentos modificadores da doença irá esbarrar no desconhecimento sobre quais os desfechos clínicos e quais biomarcadores são mais adequados como desfechos relevantes para os futuros ensaios clínicos randomizados. Além do desconhecimento atual sobre quais diferenças nestes desfechos representam mudanças clinicamente relevantes para a vida dos indivíduos. Atualmente não existem tratamentos modificadores de doença efetivos para as PEHs. Há apenas relatos anedotais de resposta a alguns medicamentos como a levodopa na SPG8 (Bettencourt et al, 2013) e hipolipemiantes orais na SPG5, (Mignarri et al, 2015).

A busca de biomarcadores quantitativos com maior sensibilidade à mudança será fundamental para delinear futuros ensaios clínicos randomizados nas PEH, otimizando o processo de busca por tratamentos. Os potenciais evocados são exames de baixo custo, boa tolerabilidade pelo paciente, com raras contraindicações a sua execução. Desta forma este estudo busca caracterizar melhor o grau de acometimento da doença através da caracterização neurofisiológica, e avaliar se este instrumento pode tornar-se um biomarcador da doença.



## 2. REVISÃO DA LITERATURA

Realizamos revisão sistematizada da literatura para a busca de estudos que utilizaram métodos eletrofisiológicos de potencial evocado motor e sensitivo em pacientes com diagnóstico molecular de PEH. Para a busca dos estudos foram consultadas as bases de dados PUBMED e EMBASE utilizando-se os seguintes descritores:

Paraplegias OR Paraplegia, Hereditary Spastic OR Paraplegias, Hereditary Spastic OR Spastic Paraplegias, Hereditary OR Hereditary Spastic Paraplegia OR Paraplegia, Spastic, Hereditary OR Autosomal Recessive Hereditary Spastic Paraplegia OR Spastic Paraplegia, Hereditary, Autosomal Recessive OR Hereditary Spastic Paraplegia, Autosomal Recessive OR Spastic Paraplegia, Autosomal Recessive, Hereditary OR Autosomal Recessive Spastic Paraplegia, Hereditary OR Hereditary Autosomal Recessive Spastic Paraplegia OR Hereditary Autosomal Dominant Spastic Paraplegia OR Autosomal Dominant Spastic Paraplegia Hereditary OR Spastic Paraplegia, Hereditary, Autosomal Dominant OR Hereditary, Spastic Paraplegia, Autosomal Dominant OR Spastic Paraplegia, Autosomal Dominant, Hereditary OR SPG4 OR SPG11 OR SPG5 OR SPG7) OR 'struempell lorrain disease' OR 'struempell disease' OR 'strumpel disease' OR 'strumpel`s disease' OR 'strumpell lorrain disease' OR 'strumpell lorrain syndrome' OR 'strumpell lorraine disease' OR 'strumpell disease' OR 'strumpell`s disease' OR 'familial spastic paralysis' OR 'familial spastic paraparesis' OR 'familial spastic paraplegia'

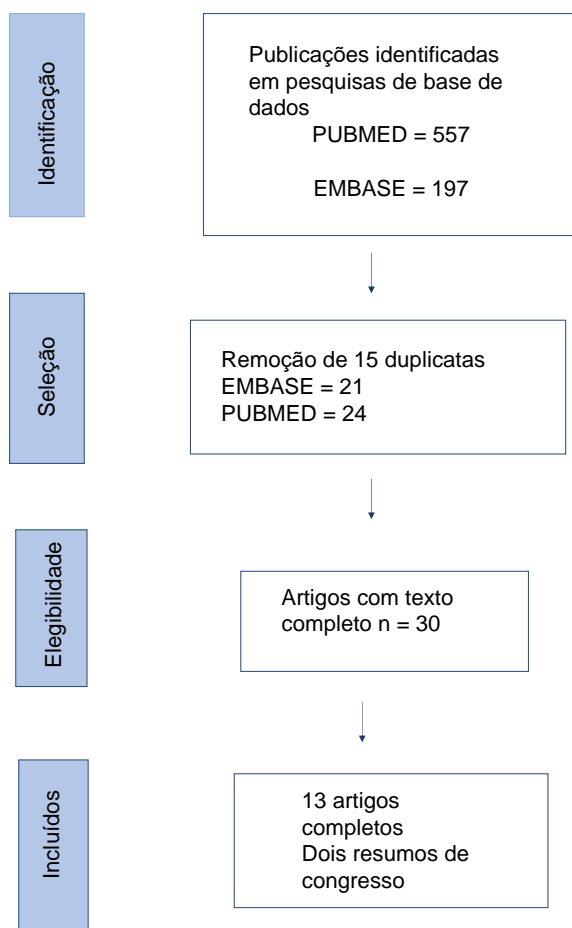
AND

Evoked Potential, Motor OR Motor Evoked Potential OR Potential, Motor Evoked OR Potentials, Motor Evoked OR Motor Evoked Potentials OR Evoked Potential, Somatosensory OR Somatosensory Evoked Potential OR Somatosensory Evoked Potentials)”

Foram identificadas 557 publicações no PUBMED, e 197 no EMBASE. Foram selecionadas 24 publicações no PUBMED e 21 no EMBASE, 15 duplicatas foram removidas dentre esses 45 artigos. Destes, após avaliação mais minuciosa, daqueles que possuíam texto completo disponível, 13 artigos e dois resumos de congresso serão descritos em nossa revisão.

**Figura 1:**

**FLUXOGRAMA REVISAO SISTEMATIZADA**



Entretanto, antes de detalharmos os aspectos relacionados às questões da pesquisa encontrados na busca sistematizada à literatura, realizaremos uma breve revisão sobre as Paraparesias Espásticas Hereditárias utilizando múltiplas referências originais e de revisões narrativas sobre o tema obtidas tanto através da revisão sistematizada da literatura apresentada acima, quanto por buscas manuais sobre o tema.

## 2.1 Aspectos históricos

Em 1880, o neurologista Báltico-alemão (região hoje conhecida como Estônia e Letônia) Ernst Adolf Gustav Gottfried von Strümpell (**Figura 2**) publicou a primeira série de casos de pacientes com PEH. Strümpell relatou o caso de dois irmãos com provável diagnóstico de paraparesia espástica hereditária autossômica dominante (PEH-AD) cujos sintomas se manifestaram aos 37 e 56 anos de idade. Clinicamente, esses pacientes apresentavam uma forma pura de paraparesia espástica. Após a morte de um dos irmãos, o estudo neuropatológico mostrou degeneração do trato cortico-espinhal lateral, fascículo grácil e trato espinocerebelar (Faber et al, 2017). Em 1888, Maurice Lorrain, um neurologista francês, publicou uma contribuição mais detalhada para o estudo anatômico e clínico das PEH. Desde então as PEH também são conhecidas como doença de Strümpell-Lorrain (Faber et al, 2017).

Rhein foi o primeiro, em 1916, a chamar a atenção para a exótica heterogeneidade clínica. Descrevendo muitas séries de casos com quadros clínicos pleomórficos com degeneração retiniana, demência, sintomas extrapiramidais, deficiência mental, amiotrofia das mãos e outras características (Faber et al, 2017).

Anita Harding, professora de neurologia da Universidade de Londres, foi uma importante pioneira no campo da neurogenética. Na década de 1980, ela apresentou o que era, na época, a maior investigação sobre PEH pura, com 22 famílias estudadas. Este trabalho consolidou o conhecimento de que os subtipos puros da doença são quase sempre herdados de forma dominante. Ela também chamou atenção para o fato de que a espasticidade e não a fraqueza era a característica mais incapacitante e marcante dessa doença. A principal contribuição de Harding sobre as PEH foi publicada no jornal *The Lancet* em 1983 Intitulado "Classificação das ataxias e paraplegias hereditárias" (Faber et al, 2017; Harding et al, 1983).

Os primeiros relatos sobre os achados neurofisiológicos por estudos de condução motora central com estimulação magnética transcraniana, sigla do inglês *Transcranial Magnetic Stimulation* (TMS), foram descritos no Reino Unido em 1991 por Shady. As anormalidades encontradas foram piores nos membros inferiores do que nos superiores, confirmando os achados do exame neurológico

e fortalecendo a hipótese feita a partir da observação de espécimes patológicos de uma disfunção comprimento dependente (Schady et al, 1991)

A era molecular nas PEH, inicia em 1994, quando Jouet et al, relataram que três transtornos: 1) Paraplegia espástica ligada ao X, 2) Síndrome MASA (retardo mental, afasia, marcha arrastada e polegares aduzidos) e 3) Hidrocefalia ligada ao X eram, na verdade, condições alélicas, todas resultantes de mutações no gene da molécula de adesão de células neurais (*LICAM* ou *SPG1*), este foi o primeiro gene descoberto como causador de PEH. Em 1994, Hazan et al, identificaram o *locus* implicado na maioria dos casos de PEH de herança dominante, o gene *SPAST*, causador da *SPG4*. Desde então, a descoberta de novos genes tem se expandido, cerca de 83 diferentes *loci* já foram descobertos, o último deles em 2021 (Faber et al, 2017; Hedera et al, 2021)

Outro marco importante foi o desenvolvimento em 2006, pela Rede Alemã de Paraplegia Espástica Hereditária, da Escala de Avaliação de Paraplegia Espástica, do inglês SPRS “*Spastic Paraplegia Rating Scale*”, desenvolvida para quantificar clinicamente a progressão da doença (Schule et al, 2006). A SPRS foi validada para o português do Brasil em 2016 (Servalhere et al, 2016).

## Figura 2 Aspectos históricos das PEH

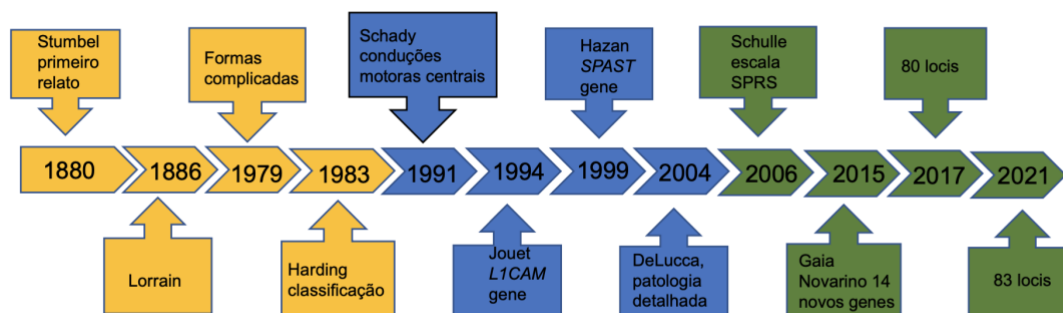


Figura adaptada de Faber et al, 2017.

## 2.2 Aspectos Clínicos, Genéticos e Fisiopatológicos

As paraparesias espásticas hereditárias são um grupo heterogêneo de doenças genéticas caracterizadas pela presença de hipertonia espástica e fraqueza muscular de predomínio nos membros inferiores decorrente da

degeneração da porção distal dos axônios do trato córtico-espinhal. As PEH são usualmente classificadas clinicamente em formas não-complicadas ou puras (PEH-NC), nas quais apenas os achados piramidais (fraqueza muscular, hiperreflexia, clônus, espasticidade e presença de sinal de Babinski) são encontrados, e alterações em sensibilidade vibratória e urgê/incontinência urinária também são aceitas como parte deste fenótipo. Nas formas complicadas (PEH-C) além dos achados piramidais há disfunção de outros sistemas neurológicos resultando em ataxia, crises epiléticas, disfunção cognitiva, amiotrofia, sinais extrapiramidais, neuropatia periférica, ou mesmo em envolvimento multisistêmico com surdez, anormalidades visuais, alterações cutâneas como ictiose, entre outros (Schule et al, 2016).

A idade de início dos sintomas das PEH é muito variável, podendo ocorrer desde a infância precoce até a oitava década de vida (Murray & Mitsumoto, Bradley, 2013). As PEH-NC com início na adolescência ou vida adulta costumam apresentar um curso lentamente progressivo; já as formas de início na infância precoce tem quadro clínico usualmente estático (não progressivo) (Fink, 2014). As PEH-C em geral apresentam-se em idades de início mais precoces e sua evolução apresenta curso mais rápido levando a maior incapacidade e dependência funcional do que as formas puras (Schule et al, 2016).

### **2.2.1 Classificação**

Há pelo menos 83 *loci* descritos como associados às PEH, com formas de herança autossômica dominante, autossômica recessiva, ligadas ao X e mitocondriais (Schule et al, 2016). Estima-se que 13-40% dos casos sejam esporádicos, ou seja sem história familiar (Schribman et al, 2019). A classificação genética das PEH é baseada na numeração sequencial dos *loci* cromossômicos ou genes específicos, conforme foram sendo descritos, precedida pelo acrônimo *SPG*, do termo em inglês *spastic paraplegia* (Depienne et al, 2007; Fink et al, 2014; Schribman et al, 2019).

**Tabela 1 – Classificação genética de acordo com a forma clínica das PEH**

	<b>Não-complicadas</b>	<b>Complicadas</b>
<b>PEH-AD</b>	SPG4, SPG6, SPG7, SPG8, SPG10, SPG12, SPG13, SPG18, SPG19, SPG31, SPG33, PG37, SPG40, SPG41, SPG42, SPG72, SPG73, SPG80	SPG9A, SPG10, SPG17, SPG29, SPG36, SPG38, SPG80
<b>PEH-AR</b>	SPG3A, SPG5A, SPG7, SPG11, SPG25, SPG28, SPG43, SPG48, SPG58, SPG62, SPG65, SPG71, SPG72, SPG83	SPG5A, SPG7, SPG9B, SPG11, SPG14, SPG15, SPG18, SPG20, SPG21, SPG23, SPG24, SPG26, SPG27, SPG28, SPG30, SPG32, SPG35, SPG39, SPG43, SPG44, SPG45, SPG46, SPG47, SPG48, SPG49, SPG50, SPG51, SPG52, SPG53, SPG54, SPG55, SPG56, SPG57, SPG58, SPG59, SPG60, SPG61, SPG2, SPG63, SPG64, SPG65, SPG66, SPG67, SPG68, SPG69, SPG70, SPG74, SPG75, SPG76, SPG77, SPG78, SPG79, SPG81, SPG82, GAD1, SPOAN
<b>PEH Ligadas ao X</b>	SPG16, SPG34	SPG1, SPG2, SPG16, SPG22

### 2.2.2 Formas Autossômicas Dominantes

A SPG4 é o subtipo de PEH mais comum. Este subtipo está associado a variantes patogênicas no gene *SPAST*, herdado como um traço autossômico dominante. A SPG4 é responsável por até 60% dos casos autossômicos dominantes, 40% das PEH-NC, e 15% dos casos esporádicos (Schule et al, 2016, Burguez et al, 2017). O início dos sintomas ocorre em média na quarta década de vida, geralmente se apresentando com espasticidade isolada de membros inferiores, com ou sem urge-incontinência urinária ou hipopalestesias (Shribman et al, 2019).

O gene *SPAST* está localizado no cromossomo 2p22-21 e codifica a proteína espastina, que contem 616 aminoácidos. Há vários tipos de variantes patogênicas no *SPAST*, incluindo variantes do tipo *nonsense*, *missense*, *splicing*, assim como deleções ou duplicações de éxons (Depiène et al, 2007). O principal mecanismo relacionado a SPG4 é a haploinsuficiência, ou seja, as variantes patogênicas levariam a perda de função da proteína, codificada por um dos alelos do gene, e esta perda de 50% da função não seria tolerada levando a neurodegeneração. Também há evidências de que a proteína mutada pode interagir com a proteína selvagem e assim interferir na sua localização. A espastina pertence à família de proteínas AAA (adenosinatriphosphatase [ATPase] associada a várias atividades celulares) (Salinas et al, 2008). Seu exato papel na patogênese da SPG4 não é completamente elucidado, embora saiba-se que há uma perturbação na manutenção do citoesqueleto dos microtúbulos a qual prejudica o transporte citoplasmático dentro do axônio. Outras alterações moleculares como defeitos nas proteínas dineína e cinesina, alterações da função mitocondrial, do retículo endoplasmático e lisossomos também foram descritas entre os mecanismos fisiopatológicos da condição (Bradley, 2016; Denton et al., 2016). Alterações no nível de produção de espastina parecem contribuir para o desenvolvimento ou progressão da doença. Os mecanismos reguladores envolvidos na expressão do *SPAST* em mamíferos são influenciados por fatores de transcrição (TFs) NRF1 e SOX11, bem como os microRNAs (miRNAs) miR-182 e miR-96, que podem ser potenciais modificadores de fenótipo da doença (Henson et al, 2012).

A SPG3A é o segundo subtipo autossômico dominante mais comum de PEH. Este subtipo está associado a mutações em *ATL1* e constitui cerca de 5–10% dos casos de PEH-AD. A idade de início na SPG3A é consideravelmente menor do que na SPG4, sendo a média de apresentação da doença de 5,6 anos de idade (Shribman et al, 2019), o que faz com que este subtipo seja um dos mais comuns de início na infância.

A SPG31 é o terceiro subtipo mais frequente de PEH-AD e está associado a mutações no *REEP1* (Shribman et al, 2019). Geralmente apresenta-se como um fenótipo puro, mas está associado a uma neuropatia axonal em até 50% dos casos (Shribman et al, 2019).

### **2.2.3 Formas Autossômicas Recessivas**

A SPG11 é um dos subtipos mais prevalentes de PEH autossômica recessiva, sendo responsável por até 8% de todos os casos de PEH e 23% das PEH-AR no Rio Grande do Sul (Shribman et al 2019; Ruano et al 2014, Burguez et al, 2017). É causada por variantes patogênicas no gene que codifica a espatacsina, localizado no cromossomo 15q. Acomete indivíduos de 4 a 36 anos. O fenótipo é invariavelmente complexo, a maioria dos casos apresenta comprometimento cognitivo ou dificuldades de aprendizagem (Shribman et al 2019), envolvimento de outros sistemas neurológicos é comum sendo frequente a concomitância de sinais e sintomas extrapiramidais, disartria, ataxia e neuropatia periférica axonal. Em exames de imagem caracteristicamente apresenta corpo caloso fino (Bradley et al, 2016), assim como alterações em núcleos da base e em morfometria da medula espinhal cervical.

A SPG15 está associada a variantes patogênicas em *ZFYVE26*. Este subtipo se apresenta de maneira semelhante a SPG11, embora a neuropatia periférica axonal possa ser mais proeminente e o parkinsonismo responsivo à levodopa seja mais frequente (Shribman et al, 2016).

O subtipo SPG7 está associado a variantes patogênicas no *SPG7*. Apresenta-se mais tardiamente do que outros subtipos de PEH-AR, com idade média de início de 41,7 anos. Apesar de ser uma condição autossômica, parece ser mais comum em homens do que em mulheres (Shribman et al 2019).



Acometimento cerebelar, visual e disartria são comuns neste subtipo. Alterações na tomografia de coerência óptica (OCT), como afilamento da camada de células nervosas da retina são frequentes, embora nem todos apresentem alterações visual clinicamente manifesta (Klebe et al, 2017).

A SPG5 está associada a variantes patogênicas no *CYP7B1*. O produto proteico do *CYP7B1* é um citocromo P450 7a-hidroxilase implicado no metabolismo do colesterol (Marelli et al, 2018). A idade média de início dos sintomas ocorre na segunda década de vida; além dos sintomas clássicos pode haver envolvimento cerebelar (Marelli et al, 2018; Bradley et al, 2016). Os subprodutos do metabolismo do colesterol, 25-hidroxicolesterol e 27-hidroxicolesterol (27-OHC; Marelli et al 2018) servem como biomarcadores neste subtipo. A atorvastatina foi testada em um pequeno ensaio clínico com objetivo de reduzir os colesteróis oxidados da cadeia lateral que seriam tóxicos, particularmente o 27-OHC. Enquanto os níveis séricos de 27-OHC foram reduzidos, os níveis de LCR não se modificaram, nem foi observado benefício clínico, porém o tratamento durou apenas 9 semanas, sendo uma prova de conceito do efeito sobre os oxisteróis tóxicos (Schols et al, 2017).

### **2.3 Epidemiologia**

A prevalência das PEH foi estimada em uma revisão sistemática em entre Europeus, japoneses e em países do norte da África variando de 0,1-9,6/100.000 (Ruano et al, 2014). Dois estudos de base populacional, um realizado em Portugal e outro na Finlândia mostraram prevalências um pouco maiores do que nos demais estudos entre 4,1 e 7,4:100.000 habitantes, com prevalência geral levemente superior a das ataxias hereditárias (6,5:100.000 habitantes), condições mais conhecidas e estudadas na literatura científica e em nosso país (Finsterer et al, 2012; Ruano et al, 2014).

A forma mais frequente de PEH no mundo é a SPG4 (Schule et al, 2016, Burguez et al, Bradley et al, 2016). No Brasil um estudo colaborativo demonstrou que variantes patogênicas no *SPAST/SPG4* foram responsáveis por 35% dos casos de PEH-NC (França et al, 2013). No Rio Grande do Sul (RS), a SPG4 foi responsável por 60% dos casos de PEH com herança claramente autossômica dominante, e 40% das formas puras (Burguez et al, 2017). A SPG3A

corresponde a cerca de 7 a 10% das demais formas autossômicas dominantes (Martinuzzi et al, 2016 e Shribman et al 2019).

As formas recessivas são menos prevalentes, correspondem a cerca de 10-21% dos casos de PEH (Ruano et al, 2016; Martinuzzi et al 2016). Há maior heterogeneidade genética, e as formas mais prevalentes variam conforme a coorte. A SPG11 parece ser a forma mais comum dentre as recessivas, cerca de 15-21% (Ruano et al., 2016), sendo responsável por 26,3% dos casos de PEH-AR atendidos no RS. A SPG7 e SPG5 foram diagnosticadas em 10,5% e 5,2% das famílias com PEH-AR no RS (Burguez et al., 2017). Em uma grande coorte alemã a forma recessiva mais prevalente foi a SPG7, seguido pela SGP11 (Schule et al, 2016).

## **2.4 Diagnóstico**

As PEH são diagnosticadas através da presença de sintomas clínicos característicos como fraqueza e rigidez espástica nos membros inferiores, acompanhados ou não de urgência urinária e sintomas sensitivos leves, com curso não-progressivo ou lentamente progressivo. O exame neurológico irá demonstrar sinais piramidais nos membros inferiores (fraqueza, hiperreflexia, rigidez espástica, presença do sinal de Babinski bilateralmente) e, quando presentes, sinais de envolvimento sensitivo discretos, em geral com diminuição da sensibilidade vibratória nos membros inferiores.

A história familiar poderá fornecer pistas importantes para o diagnóstico, com padrões consistentes com herança autossômica dominante ou recessiva, ligada ao X ou mitocondrial. Entretanto a ausência de casos semelhantes na família não descarta a suspeita de PEH, sendo relativamente frequente a presença da condição em casos isolados.

Nos casos sem história familiar esclarecedora, será mandatório iniciar pela exclusão de doenças adquiridas, especialmente aquelas com acometimento medular como mielites auto-imunes (melite transversa, esclerose múltipla primariamente progressiva, espectro anti-MOG, paraneoplasias) infecciosas (HIV, HTLV, sífilis, tuberculose), doenças carências, especialmente deficiência de vitamina B12 e mielopatias compressivas (artrose e doença

degenerativa da coluna, tumores medulares). A forma de paralisia cerebral diplégica também entrará nos diagnósticos diferenciais, em especial das formas de PEH de início infantil.

Outras doenças neurogenéticas como as ataxias espinocerebelares são frequentemente acompanhados por sinais piramidais. A forma tardia da ataxia de Friedreich, começando aos 25 anos ou mais, é alternativamente associada a hiperreflexia e pode mimetizar quadros de SGP11 (Faber et al, 2017). Como regra, os indivíduos com PEH são claramente espásticos e têm queixas leves ou nenhuma queixa nos membros superiores, nas ataxias, não há dissociação pronunciada entre os membros superiores e inferiores (Faber et al, 2017). Erros inatos do metabolismo e leucodistrofias também entram no diagnóstico diferencial das PEH (Bradley et al, 2016).

Os exames de neuroimagem como a Ressonância Magnética de neuroeixo podem auxiliar na exclusão de algumas das causas adquiridas mencionadas acima. Além disso, os diâmetros da medula espinhal cervical e torácica são significativamente menores nas PEH puras e complicadas; e podem haver alterações corticais e de substância branca como corpo caloso fino e sinal da orelha de Lince na SPG11 e SPG15, atrofia cerebelar na SGP7 e alterações nos gânglios da base na SGP11, SGP35, SPG28 (Martinuzzi et al, 2017, da Graça, 2019).

O diagnóstico confirmatório se dará através do teste genético específico que buscará a detecção de variantes patogênicas nos genes associados as PEH, podendo ser realizado através de sequenciamento de genes únicos, de painéis de sequenciamento de nova geração que abranjam os subtipos mais prevalentes ou mesmo através do sequenciamento completo do exoma.

Destacamos que em estudo recente de nosso grupo o uso de um painel de sequenciamento de nova geração, *do inglês Next Generation Sequencing (NGS)*, que avaliou 12 dos genes mais frequentemente relacionados às PEH (*ATL1, BSCL2, CYP7B1, KIAA0196, KIF5A, NIPA1, REEP1, SPAST, SPG7, SPG11, ZFYVE26 e CYP27A1*, obteve no geral rendimento de 51,7% (15/29 pacientes) para pelo menos um diagnóstico molecular provável e 48,3% (14/29 pacientes) para o diagnóstico molecular definitivo. O rendimento diagnóstico do painel para PEH-AD foi de 60% (6/10), 47,4% (9/19) para PEH-AR. O rendimento

do diagnóstico do painel para PEH-NC ou puras foi de 75% (9/12) e para PEH-C foi de 35,3% (6/17) (Burguez et al, 2017).

## 2.5 Biomarcadores

Biomarcadores são entidades que podem ser medidas e indicam a ocorrência de uma determinada função normal ou patológica de um organismo, ou também resposta a intervenções terapêuticas (Infopédia, dicionário língua portuguesa). Exemplos: níveis de colesterol, proteína C reativa, CA 19-9, exames de imagem.

O principal biomarcador validado de gravidade das PEH são as escalas clínicas, sendo a principal delas, que é baseada no exame neurológico, a *Spastic Paraplegia Rating Scale* (SPRS). Esta escala inclui 13 itens (com pontuações totais que variam entre 0 e 52 pontos, crescentes em gravidade) que avaliam os seguintes testes e funções: qualidade e a velocidade da marcha, subir escadas, levantar-se de uma cadeira, grau de espasticidade de músculos adutores e abdutores do quadril, flexão e extensão do joelho, dorsiflexão e flexão do pé, presença de contraturas, presença de dor e controle de esfíncteres urinário e retal.

Levando em conta que as PEH são lentamente progressivas e algumas formas quase estáticas, as escalas clínicas baseadas no exame neurológico possuem pouca sensibilidade a mudança em períodos de tempo menores. Para avaliação de possíveis novas estratégias terapêuticas, faz-se necessário a existência de formas de avaliação de reposta e gravidade que possam ser medidas com uma brevidade maior dentro do estudo.

Alguns candidatos a biomarcadores das PEH que vem sendo estudados são: 1) neuroimagem: ressonância magnética multimodal; 2) avaliações biomecânicas: avaliação da marcha e cinética do movimento; 3) marcadores séricos: neurofilamentos e micro-RNA; e 4) Neurofisiológicos: potenciais evocados motores e sensitivos, que serão o enfoque da presente dissertação. Nas seções abaixo iremos descrever os principais estudos sobre os biomarcadores já avaliados nas PEHs.

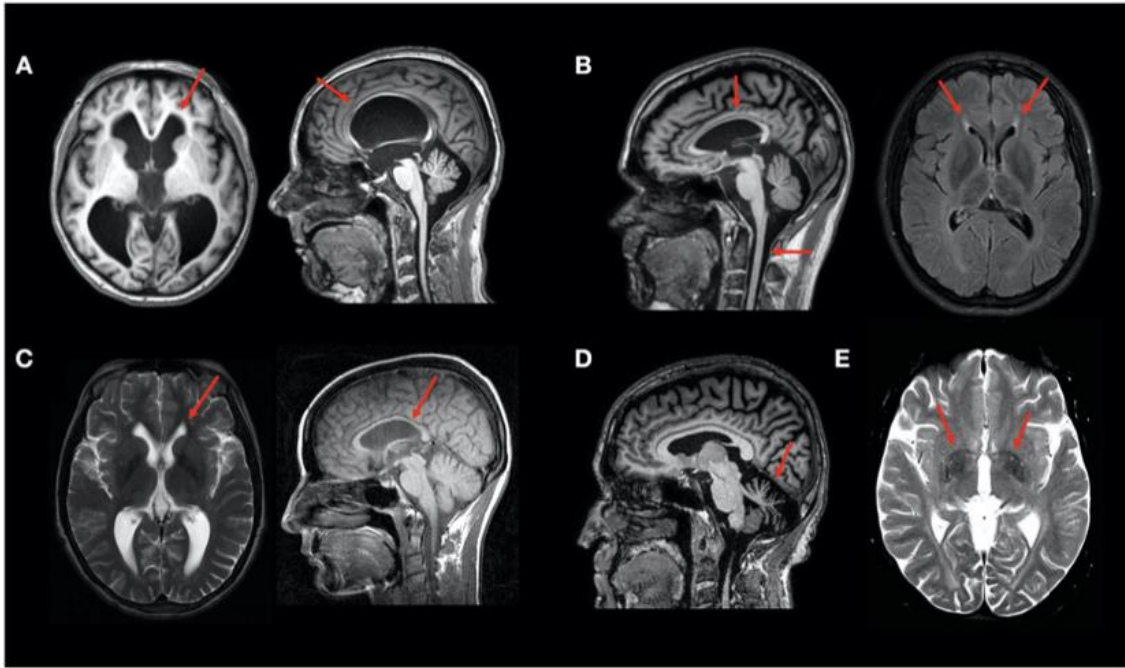
### 2.5.1 Escalas clínicas e biomecânica

Os principais instrumentos semiquantitativos ou quantitativos que já foram validados ou utilizados para avaliação da gravidade clínica da doença ou como medidas de desfechos primários e secundários para testar eficácia de tratamentos, incluem: 1) Escalas clínicas: SPRS, Escala de espasticidade de Ashworth, o componente de caminhada do Gillette Functional Assessment Questionnaire que foi usado em um ensaio com bomba de infusão intratecal de baclofeno (Trummer et al, 2018); 2). Biomecânicos: velocidade máxima de marcha em 10 metros, usada como desfecho primário em ensaios clínicos que avaliaram a eficácia da Toxina Botulínica A (Niet et al, 2015, Diniz et al, 2021). Também são mencionados em ensaios únicos: a escala de Fugl-Meyer, teste *timed up-and-go* cronometrado, que testa o tempo para levantar de uma cadeira, caminhar 3 metros, virar, retornar e sentar novamente; a escala do *Medical Research Council* (MRC); breve inventário de dor; e escalas de fadiga (Trummer et al, 2018).

### 2.5.2 Ressonância Magnética

A neuroimagem é uma ferramenta que permite a avaliação estrutural e funcional do sistema nervoso central (SNC). Em particular, técnicas avançadas de imagem por ressonância magnética (MRI) são capazes de fornecer informações microestruturais e bioquímicas detalhadas do SNC. No contexto das PEH ela contribui para exclusão de outras etiologias e auxilia na caracterização fenotípica de alguns subtipos.

Achados qualitativos de utilidade clínica em indivíduos com PEH são exemplificados na **Figura 3**.



**Figura 3:** achados sugestivos de subtipos específicos de paraparesias espásticas hereditárias em ressonância magnética encefálica: Hidrocefalia por estenose aqueduto, SPG1; B: Corpo caloso fino, e sinal das orelhas de linco, SPG11; C: Corpo caloso fino, e sinal das orelhas de linco SPG15; D: Atrofia cerebelar, SPG7; E: Hipointensidade globo pálido, SPG35. (Adaptado da Graça et al, 2019)

Em recente revisão sistemática (da Graça et al, 2019), técnicas avançadas de neuroimagem são descritas como instrumentos importantes para o entendimento da fisiopatologia da doença e têm possível papel como biomarcador da doença. Entre os possíveis desfechos cita-se: 1) Volume da medula cervical por morfometria, que na SPG11 apresentou correlação com a severidade e a duração da doença; 2) Dano generalizado à substância branca e atrofia cortical leve avaliados por difusão e dano volumétrico (obtidos por morfometria baseada em voxel) presentes inclusive nas formas puras como a SGP4) 3) Parâmetros de difusibilidade no braço anterior da cápsula interna e corpo caloso, que se correlacionaram com a SPRS em formas puras; 4) Volume dos núcleos da base, que se correlacionou com a SPRS e duração da doença na SPG11.

## **2.5.3 Biomarcadores séricos**

### **2.5.3.1 Neurofilamentos**

Os neurofilamentos são expressos apenas em células neuronais, sendo uma parte do citoesqueleto do neurônio, extremamente abundante nos axônios, e que possuem uma meia vida longa. Podem ser dosados no sangue através de tecnologia ECL (eletroquimioluminescência) e SiMoA (single molecule array assays); e no líquido cefalorraquidiano (LCR), podem ser detectados por imunoblotting e por ELISA. (Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay). Ainda não há valores de referência universais definidos para os neurofilamentos, mesmo para controles saudáveis (Zuchi et al, 2018; Wilke et al, 2018).

As concentrações sanguíneas da cadeia leve do neurofilamento (NfL) foram recentemente demonstradas como biomarcadores de dano neuronal em várias doenças neurodegenerativas, incluindo esclerose lateral amiotrófica e em PEH. Os NfL podem ser particularmente sensíveis à destruição axonal de tratos de fibras longas (Wilke et al, 2018). Em recente estudo italiano (Zucchi et al, 2018) 9 indivíduos com PEH, 21 com esclerose lateral amiotrófica (ELA) e 9 controles realizaram dosagens de NfL no sangue e LCR. Os resultados mostraram níveis aumentados de NfL nos pacientes com ELA, seguidos pelo grupo com PEH que também apresentou níveis aumentados, apesar de o aumento ser mais discreto, em comparação com os indivíduos controle. Destaca-se que os níveis de NfL foram similares entre subgrupo de pacientes com esclerose lateral primária e com PEH. Houve correlação entre concentrações séricas e líquóricas de NfL com o score total da escala ALSFRS-R e Ranking modificado e Ashworth na ELA, entretanto não foram relatadas correlações no grupo PEH.

Em outro estudo realizado na Alemanha (Wilke et al, 2018) foram avaliados 96 indivíduos com PEH (63 geneticamente confirmados) 96 controles saudáveis e 33 indivíduos com ELA. O método de detecção dos NfL foi o single molecule array (Simoa), sérico. Os níveis de NfL aumentaram significativamente em pacientes com PEH quando comparados aos controles. O aumento de NfL correlacionou-se fracamente com a progressão da doença, medida através da SPRS.

Os Nfl permanecem como potenciais biomarcadores das PEH, apesar de as alterações serem menos importantes do que em outras doenças do neurônio motor, como é no caso da ELA. Destacamos que o papel dos Nfl como marcadores de progressão das PEH ainda é desconhecido, não havendo estudos longitudinais que realizaram esta avaliação.

### **2.5.3.2 Micro-RNAs**

Os MicroRNAs (miRNAs ou miR) são pequenas moléculas de RNAs (ácido ribonucleico) não codificadas para proteínas, que se ligam a RNAs mensageiros (RNAm) específicos e inibem a tradução ou promovem a degradação dos RNAm. Eles possuem regulação específica para o tipo de célula, tecido e espécie de seus alvos em diferentes contextos celulares (Nakazeki et al, 2019).

Para examinar a regulação transcricional e pós-transcricional do gene *SPAST*, este estudo de Pittsburgh (Henson et al, 2012) usou métodos filogenéticos moleculares para identificar sequências conservadas de sítios de ligação de fatores de transcrição putativos e motivos de direcionamento de miRNA no promotor do *SPAST*, TSS (transcription start sites) e 3'-UTR, respectivamente. Através de uma variedade de métodos moleculares, este estudo demonstrou que a transcrição do *SPAST* é regulada positivamente por dois fatores de transcrição, o NRF1 e o SOX11.

Além disso, a superexpressão de miR-96 ou miR-182 resultou em diminuições estatisticamente significativas de 45% e 57% nos níveis de transcrição *SPAST*, respectivamente. Por *western blotting*, a superexpressão de miR-96 ou miR-182 reduziu a proteína espastina a níveis quase indetectáveis. Portanto, a família de miRNAs miR-96 e miR-182 parecem exercer forte regulação da síntese de espastina em células neurais humanas (Henson, 2012).

Em recente estudo japonês (Nakazeki, 2019) a inibição do micro-RNA 33a também foi descrita como reguladora da transcrição do gene *SPAST*. Este estudo criou modelos de miR-33 em células-tronco pluripotentes induzidas por humanos (iPSCs) por tecnologia CRISPR-Cas9 e analisaram seu transcriptoma. A presença do miR-33a regulou a expressão do *SPAST* alterando o fenótipo celular dos neurônios corticais produzidos a partir de iPSC de pacientes com SGP4. A inibição de uma forma principal de miR-33 em neurônios humanos, via



ácido nucleico bloqueado (LNA)-anti-miR inclusive melhorou o fenótipo patológico em neurônios de pacientes com PEH-SPG4 (Nakazeki et al, 2019). Esta descoberta faz do miR-33a não apenas um biomarcador mas também um possível alvo terapêutico nas PEH.

#### **2.5.4 Biomarcadores neurofisiológicos: potencial evocado motor e sensitivo**

Potencial evocado é um sinal elétrico gerado pelo sistema nervoso central em resposta a um estímulo. O potencial evocado somato-sensitivo (PESS) é realizado através da estimulação elétrica periférica de um nervo sensitivo, por exemplo o nervo mediano nos membros superiores, em que o estímulo elétrico viaja pelas fibras de condução nervosas e é registrado em seu ponto terminal, neste caso sobre o córtex sensitivo primário, com eletrodos de registro colocados no escalpo (Bradley, 2016). A coluna dorsal é o maior substrato avaliado no PESS.

O potencial evocado motor (PEM) implica a estimulação do córtex motor registrando o potencial de ação motor composto do músculo alvo estudado. O córtex motor primário pode ser estimulado diretamente por um breve pulso elétrico de alta tensão no escalpo ou usando um campo magnético tempo-variável para induzir uma corrente elétrica dentro do cérebro. Sendo o segundo mais usado por ser menos doloroso (Bradley, 2016).

A caracterização eletrofisiológica das PEH foi estudada em estudos transversais com tamanhos amostrais pequenos e alguns deles com pobre caracterização genética.

Na maior série de casos já relatada (Karle et al, 2013) foram recrutados 128 pacientes com PEH na Alemanha, sendo que somente 54 possuíam diagnóstico genético confirmatório. A amostra era composta por 35 casos com SPG4, 1 com SPG3A, 3 com SPG5, 3 com SPG7, 1 com SPG8, 1 com SPG10, 6 com SPG11 e 4 com SPG15. O tempo central de condução motor nos membros inferiores (TCCM-MI) estava prolongado em 37% dos casos, sendo ausente (forma mais grave de dano) em 36%, já nos membros superiores o TCCM foi alterado em 32% dos casos (prolongada em 28% e ausente em 4%),

mesmo não havendo sinais clínicos significativos de envolvimento da via piramidal nos MS. Houve fraca correlação do TCCM-MI com a SPRS (Spastic Paraplegia Rating Scale) ( $R=0,176$ .  $p < 0,028$ ). Em contraste o PESS estava alterado em 18% dos casos, sendo prolongado em 9% e ausente também em 9% dos casos nos MS; já nos MI o PESS estava prolongado em 7% e ausentes em 29% dos casos, denotando um dano sensitivo proeminente. As correlações do PESS com a SPRS ou duração da doença não foram relatadas.

Em estudo italiano (Sartucci et al, 2007) que avaliou 12 pacientes com PEH e grupo controle de 16 voluntários saudáveis, o TCCM-MI foi ausente em 1 paciente dos 12 afetados, com significativa diminuição da amplitude em 8/12, ou seja em 67,5%; a latência foi significativamente maior nos casos quando comparado aos controles. No PESS houve diferença significativa entre os dois grupos apenas nos registros corticais referentes aos MI que estavam ausentes em 25% dos casos e com uma perda importante da amplitude em todos os demais. O PESS dos MS estava dentro dos limites da normalidade inclusive no grupo de casos. Os achados do PESS foram condizentes com um envolvimento subclínico das colunas dorsais, sendo que apenas as partes mais distais, nos MI, apresentaram anormalidade; e estão de acordo com o dano axonal descrito nos estudos *post-mortem* que gerariam essa perda de amplitude do potencial.

Outro estudo italiano (Martinuzzi et al, 2016) avaliou 44 pacientes com PEH com diagnóstico molecular confirmado com diferentes subtipos. O PESS estava prolongado em 68% dos casos nos MI, nos MS estava alterado em 1/3 dos pacientes com SPG4, nas formas complicadas estava prolongado em 90% dos pacientes com SPG5, SPG15 e SPG35 e normal na SPG11 e SPG3A. O TCCM-MI estava prolongado em todos os casos e ausente em três deles. O TCCM-MS estava anormal em 45%. Os autores não apresentaram as correlações em entre as variáveis do PEM e PESS com as demais variáveis de gravidade estudadas.

Vinte e um pacientes com PEH com diagnósticos clínicos e moleculares, (10 com SPG4, 4 com SPG7, 1 com SPG3A, 1 com SPG 30 e 5 geneticamente indeterminados) foram descritos neste resumo de congresso da Austrália (Siow et al, 2018) O TCCM foi registrado em dois músculos dos MI, o abductor halux (AH) e o tibial anterior (TA) e um músculo dos MS, o abductor do dedo mínimo

(ADM). O TCCM estava prolongado em 76% dos casos no TA; e em 50%, sendo ausente em 16%, no AH. Nos MS as medidas foram todas normais. Não houve correlação significativa grupo PEH como um todo entre os escores da SPRS, duração da doença ou idade do paciente e a amplitude ou TCCM para TA ou AH. A análise de subgrupo de SPG4 (10 indivíduos) revelou forte correlação direta entre o TCCM medido no TA e AH com a duração da doença, mas não com pontuações na SPRS.

O mesmo grupo australiano publicou em 2019 (Siow et al, 2019) uma revisão sistemática sobre os PEM nas PEH, incluindo 32 artigos publicados entre 1987 e 2016, sendo 12 estudos tipo caso-controle, 19 relatos de casos ou séries de casos e uma coorte retrospectiva, com um N total de 476 indivíduos. A quantidade média de pacientes por estudo foi de 14 sujeitos, sendo que 48% deles incluiu menos de 10 pacientes por estudo. Informações genotípicas foram incluídas em 20 dos 32 estudos, porém muitos desses estudos foram realizados na era pré-genética, na qual estudos moleculares não eram disponíveis e muitas dos genes relacionados às PEH ainda não tinham sido descritos. A técnica de realização do exame variou de forma considerável entre os estudos, incluindo formas distintas da bobina de estímulo (circular, parabólica, cone-duplo), número de estímulos variando de 3 a 20, intensidade de estímulo variável até 120% do limiar motor. O método de cálculo do TCCM foi especificado em 24/32 estudos, sendo que 11 utilizaram a medida da onda F e 11 estimulação cervical/medular, e 2 realizaram ambas as técnicas. O TCCM-MS foi considerado anormal em 59% dos artigos. O TCCM-MI foi prolongado ou ausente para todos os pacientes em 8/26 estudos e em alguns pacientes em 15/26 estudos. No geral, 308/393 (78%) pacientes estudados tinham o TCCM-MI prolongado. A sensibilidade das anormalidades do TCCM para o diagnóstico de PEH foi de 80% quando obtido nos MI e de 30% quando obtido nos MS. Entretanto, este último dado tem pouca utilidade clínica considerando que o diagnóstico molecular possui sensibilidade e especificidade muito superiores a estes valores e o PEM não discrimina os diferentes subtipos de PEH.

Correlação entre o TCCM com outras variáveis de gravidade foram investigadas em 10/32 estudos, sendo que 8/10 (80%) não encontrou correlações com significância estatística. Dos dois estudos que encontraram

correlações significativas, um deles foi o de Karle e colaboradores, publicado em 2013, sendo a maior série de casos avaliada até o momento e que já foi descrita nos parágrafos acima. O outro estudo (Cruz et al, 1999) avaliou pacientes com doença de Charcot Marie Tooth e 2 irmãos com PEH (SPG4), sendo apenas um relato de caso se considerarmos os dados para as PEH, não sendo possível inferir sobre os resultados das correlações encontradas para o TCCM apenas para o grupo das PEH. A amplitude do PEM foi avaliada nos MS em 8 artigos, e nos MI em 12 artigos, sendo ausente ou reduzida em todos os estudos para os MI (Siow et al, 2019).

Em conclusão, esta revisão sistemática não apoiou fortemente o uso de PEMs como único biomarcador em PEH, embora os autores tenham considerado que pode ser um método útil quando combinado com outros biomarcadores, incluindo escalas de avaliação clínica e imagem por tensor de difusão (Siow et al, 2019). Futuros estudos terão de avaliar o papel do PEM como biomarcador da doença em quadros mais iniciais de PEH, pois considerando a grande frequência de ausência de potenciais nos pacientes com PEH nos estudos que foram revisados, é possível que haja um efeito teto deste biomarcador quando a integridade da via já está comprometida de modo mais avançado o que pode impedir a identificação de correlações com outras variáveis de gravidade.

Até o momento existem três estudos publicados, dois relatos de caso e uma série de casos que relatam o uso do TMS como forma de tratamento das PEH, estes serão abordados detalhadamente no capítulo seguinte. Reforçamos por ora que o equipamento e a técnica básica usadas para finalidade diagnóstica para a realização do PEM são os mesmos da técnica para tratamento; sendo alterado apenas a intensidade e número de estímulos que passam a ter um protocolo específico, com sessões repetidas em intervalos regulares.

## **2.6 Tratamento**

Não há tratamentos que mudem a história natural das PEH até o momento ou que sejam capazes de impedir sua progressão. Descrição de possíveis terapias direcionadas molecularmente são inexistentes, uma vez que a

compreensão molecular e genética das PEH tem avançado especialmente nos últimos anos, porém ainda com muitas lacunas.

A maioria dos estudos já realizados tiveram como foco o tratamento sintomático das principais manifestações clínicas das PEHs, especificamente da espasticidade; a exceção são os ensaios clínicos que testaram estatinas e ácidos biliares no tratamento da SPG5.

### **2.6.1 Tratamentos Medicamentosos**

Dois ensaios clínicos tiveram como alvo um subtipo específico de PEH, a SPG5, que é uma PEH autossômica recessiva rara devido à variante patogênica no gene *CYP7B1* que codifica a proteína oxisterol-7 $\alpha$ -hidroxilase, a qual degrada colesteróis oxidados da cadeia lateral. Os autores hipotetizaram que a redução dos níveis de colesterol com uso de estatinas (no caso específico com a atorvastatina) reduziria os colesteróis oxidados da cadeia lateral tóxica, particularmente o 27-OHC. Com isso realizaram um ensaio clínico randomizado que durou 9 semanas e que comparou atorvastatina 40mg com placebo em 14 pacientes com SPG5. A atorvastatina levou a redução significativa de cerca de 25% dos níveis de 27-OHC sérico, sem redução significativa os níveis de 27-OHC no líquido. Como era esperado, não houve benefício clínico observado no curto período de tratamento medido pela SPRS (Schols et al, 2017). Um segundo ensaio clínico com racional similar, mas de desenho mais complexo, foi realizado e avaliou a atorvastatina (20mg/dia), o ácido biliar, ácido quenodesoxicólico (CDCA) (500mg duas vezes ao dia) e o antioxidante resveratrol (40mg duas vezes ao dia, Marelli et al, 2018). O estudo teve um desenho cruzado, em que o paciente era randomizado para receber um dos tratamentos por período de 2 meses, seguido de período de *washout* por 4 meses, após recebia o segundo tratamento e segundo período de *washout* em igual duração e por fim o último período de tratamento e *washout*, sendo possíveis seis diferentes combinações de ordens de tratamento. O estudo incluiu 12 pacientes com SPG5 e mostrou que a atorvastatina reduziu em 30% os níveis plasmáticos de 27-OHC, porém sem alteração a relação 27-OHC:colesterol total. Os autores encontraram um perfil anormal de sais biliares na SPG5, que foi corrigido com o uso do ácido quenodesoxicólico. Dessa forma os autores sugeriram que a combinação de atorvastatina e CDCA tem potencial terapêutica

para a SPG5, entretanto assim como no estudo de Schols e colaboradores, não foram observados efeitos clinicamente significativos no estudo, sendo importante futuros estudos de longo prazo para avaliar a eficácia clínica dessas intervenções na SPG5.

Outra terapia em desenvolvimento para a SPG5 é o uso do RNA mensageiro do *CYP7B1*. Em modelo transgênico de camundongos transgênico knockout para o *Cyp7b1* a injeção sistêmica do RNAm tanto do *CYP7B1* humano quanto do camundongo foi capaz de degradar os oxisteróis tóxicos no fígado e no soro dentro de dois dias do tratamento, sendo que o efeito parece persistir por pelo menos 5 dias. A administração repetida do RNAm do *CYP7B1* foi segura por pelo menos 17 dias e levou a redução dos oxisteróis tóxicos também em algumas regiões cerebrais dos camundongos, sendo uma perspectiva terapêutica que deverá ser avaliada em futuros estudos em seres humanos (Hauser et al, 2019). Cabe ressaltar que esse modelo transgênico apresenta apenas fenótipo bioquímico, não havendo alterações motoras que pudessem permitir a avaliação do efeito do tratamento sobre o fenótipo comportamental dos animais.

Dois estudos abertos e com amostras pequenas avaliaram a eficácia da bomba de baclofeno intratecal para tratamento da espasticidade nas PEH e obtiveram resultados semelhantes. Um dos estudos, que tratou 14 pacientes com PEH, relatou redução da espasticidade dos membros inferiores avaliada pela escala de Ashworth modificada e melhora da capacidade de locomoção avaliada por versão modificada da escala funcional de caminhada do questionário Gillette Functional Assessment (Margetis et al, 2014, Trummer, 2018).

Dois ensaios clínicos abertos avaliaram a eficácia da Toxina botulínica tipo A no tratamento das PEHs. O primeiro deles (Niet et al, 2015) aplicou Toxina botulínica tipo A no músculo tríceps sural associado a exercícios de alongamento diários por 18 semanas em 15 pacientes com PEH. O desfecho primário era mudança na linha de base da velocidade de marcha confortável de 10 metros medida em 4 semanas (pico do efeito da toxina) e 18 semanas (efeitos residuais da toxina) após as injeções. Desfechos secundários incluíam a escala SPRS, Ashworth e escalas de avaliação de dor e fadiga. Curiosamente a velocidade da

marcha confortável foi a única variável que obteve melhora significativa. As demais variáveis não diferiram estatisticamente pós-tratamento, inclusive não houve melhora na velocidade máxima de marcha em 10 metros (de Niet et al, 2015; Trummer et al, 2018).

Em recente ensaio clínico randomizado, crossover duplo-cego controlado por placebo, 55 indivíduos com PEH, sendo 41 com PEH-NC, foram randomizados para receber Toxina botulínica tipo A nos músculos Adutor magno e Tríceps sural ou solução salina 0,9%. O desfecho primário era mudança da linha base prévia de cada indivíduo na tarefa velocidade máxima da marcha em 10 metros. Os desfechos secundários incluíam, mudanças na velocidade de marcha confortável, escala SPRS e avaliação de força e tônus muscular, dor, fadiga e percepção subjetiva de melhora. Em comparação com a linha de base, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos nos desfechos primários e secundários, exceto para redução no tônus adutor (Diniz et al, 2021).

Um ensaio clínico randomizado crossover duplo-cego avaliou o uso de Gabapentina (2400mg diários titulados até 4.000 mg diários), em 10 pacientes com SGP4 (6 com diagnóstico molecular confirmado). Os sujeitos receberam gabapentina durante 2 meses, seguido por um período de *washout* de 10 dias, um intervalo sem drogas de 1 mês e, em seguida, placebo. Os desfechos foram avaliados através de uma combinação da EDSS do inglês *Expanded Disability Status Scale* e do formulário diagnóstico da SPATAX que incluem: Escala Visual Analógica, Escore de incapacidade, distância caminhada sem suporte em 5 segundos, sintomas urinários, força muscular e reflexo tendinosos, além de questionário sobre qualidade de vida e avaliação da excitabilidade cortical motora por TMS. Não houve diferenças significativas em relação ao grupo placebo nos desfechos avaliados com o tratamento com gabapentina (Scheuer et al, 2007).

Além dos estudos citados acima, há também relatos de caso em SPG11 e SPG8, tratadas com levodopa, com respostas anedotais, e com alguma melhora em sintomas extrapiramidais e espasticidade (Trummer et al, 2018).

## **2.6.2 Neuromodulação invasiva e não-invasiva**

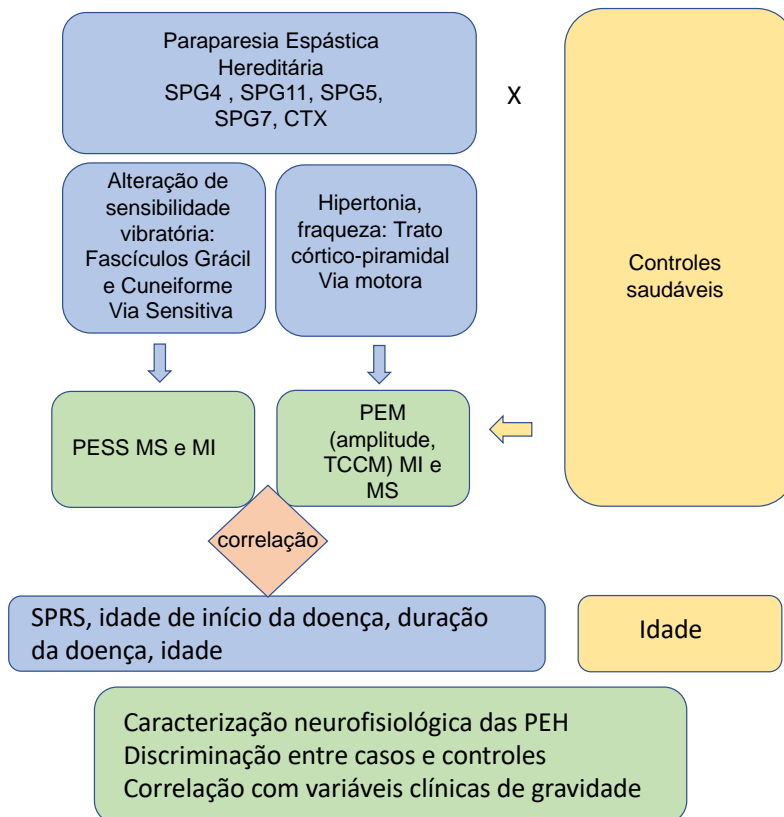
A estimulação da coluna dorsal por corrente contínua (tDCS do inglês transcranial Direct Current Stimulation) foi recentemente avaliada em um ensaio

clínico cruzado controlado por tDCS *sham* (Ardolino et al, 2018). Onze pacientes com PEH (8 indivíduos SPG4, 1 com SPG3A, 1 com SPG7 e 1 SPG15) foram incluídos no estudo em que o estímulo era aplicado sobre o processo espinhoso de T10 a T12 (vértebras coluna dorsal) com tDCS a uma intensidade de 2,0 mA por 20 minutos. Os desfechos avaliados foram: teste de caminhada de 5 minutos, escala SPRS e Ashworth, e os resultados do PEM antes do tratamento, imediatamente após o término do protocolo, após 1 semana, após 1 mês e após 2 meses do tratamento. Houve ligeira redução na área do PEM, que é o espaço abaixo da curva de amplitude do potencial composto de ação muscular ao longo do tempo, sem alteração da latência ou TCCM. A pontuação da escala de Ashworth para MI mostrou melhora da espasticidade no grupo de tratamento ativo, em particular dois meses após o final da estimulação, e não houve diferenças significativa na SPRS e no teste de caminhada de 5 minutos.

E por fim destacamos um relato de caso anedotal brasileiro (de Souza et al, 2020) em que uma mulher de 51 anos com SPG4 foi submetida a uma estimulação espinal invasiva, com implante de um eletrodo de pá com 16 contatos (8 contatos em 2 fileiras) no espaço epidural de T11-T12. O escore da SPRS anteriormente em 26, caiu para 15 após um mês do início do tratamento. No acompanhamento de 12 meses, ela experimentou melhora substancial na função motora e no desempenho da marcha, com escores SPRS 23 em *OFF* e até 20 em *ON*, além de aumento da força muscular isométrica em *ON*, melhora da espasticidade para extensão do joelho e melhora na marcha evidenciado por aumento do comprimento do passo. Entretanto, estudos com tamanhos amostrais maiores e com cegamento das avaliações são necessários para elucidar o real papel da estimulação espinal invasiva no tratamento das PEH.



### 3. MARCO CONCEITUAL



### 4. JUSTIFICATIVA

As paraparesias espásticas hereditárias são um grupo de doenças neurodegenerativas negligenciadas. Embora a história natural das PEHs seja pouco conhecida, os estudos disponíveis apontam para uma progressão muito lenta, sugerindo que as escalas clínicas baseadas no exame neurológico podem não apresentar sensibilidade suficiente para detectar mudanças na progressão da doença, tornando a busca por biomarcadores adicionais uma tarefa fundamental.

O conhecimento dos aspectos moleculares das PEH possibilitou grandes avanços no entendimento destas condições e das vias celulares envolvidas. No entanto a aplicação destes conhecimentos na busca de tratamentos modificadores da doença irá esbarrar no desconhecimento sobre quais os

desfechos clínicos e quais biomarcadores são mais adequados como desfechos relevantes para os futuros ensaios clínicos randomizados. Além do desconhecimento atual sobre quais diferenças nestes desfechos representam mudanças clinicamente relevantes para a vida dos indivíduos.

Anormalidades nos potenciais evocados motores e somatossensoriais foram previamente descritas em PEH, apontando que essas medidas neurofisiológicas que avaliam a integridade das vias sensitivas e motoras como possíveis candidatos a biomarcadores dessas doenças. No entanto, os resultados sobre os potenciais evocados motores (PEM) e potenciais evocados somatossensoriais (PESS) foram heterogêneos entre os estudos, com a maioria dos estudos avaliando pequenas amostras com pobre caracterização genética e clínica, justificando a realização de estudos adicionais.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo geral:**

Avaliar o papel do PEM e PESS nos membros inferiores e superiores (MI) como biomarcadores das PEHs

### **5.2 Objetivos específicos**

Avaliar a integridades das vias sensitivas e motoras em indivíduos com PEH com diagnóstico molecular através do PEs caracterizando o tipo de dano e de alteração eletrofisiológica.

Avaliar se os PEs possuem validade discriminatória entre casos e controles

Avaliar se o PEM e PESS se correlacionam com medidas clínicas de gravidade da doença como: idade de início em anos da doença, duração em anos da doença e pontuação na escala SPRS.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ardolino et al (2018) Spinal direct current stimulation (tsDCS) in hereditary spastic paraplegias (HSP): A sham-controlled crossover study, *The Journal of Spinal Cord Medicine*, DOI: 10.1080/10790268.2018.1543926
2. Bradley`s, Robert Daroff, Joseph Jankovic, John C Mazziotta, Scott Pomeroy *Neurology in Clinical Practice*. Seventh eddition, Elsevier, 2016
3. Burguez D, Polese-Bonatto M, Scudeiro LAJ, et al. Clinical and molecular characterization of hereditary spastic paraplegias: A next-generation sequencing panel approach. *J Neurol Sci* (2017) 15:383
4. Denton KR, Xu C, Shah H, Li XJ. Modeling Axonal Defects in Hereditary Spastic Paraparesia with Human Pluripotent Stem Cells. *Front Biol*. 2016; 11: 339–3547. Depienne C, Fedirko E, Forlani S, et al. Exon deletions of SPG4 are a frequent cause of hereditary spastic paraplegia. *J Med Genet*. 2007 Apr;44(4):288.
5. Diniz de Lima F, Faber I, Servelhere KR, Bittar MFR, Martinez ARM, Piovesana LG, Martins MP, Martins CR Jr, Benaglia T, de Sá Carvalho B, Nucci A, França MC Jr. Randomized Trial of Botulinum Toxin Type A in Hereditary Spastic Paraplegia - The SPASTOX Trial. *Mov Disord*. 2021 Feb 17. doi: 10.1002/mds.28523. Epub ahead of print. PMID: 33595142
6. Faber et al Paraplegia espástica hereditária de 1880 a 2017: uma revisão histórica. *Arq. Neuro-Psiquiatr*. [online]. 2017, vol.75, n.11, pp.813-818. ISSN 1678-4227. <https://doi.org/10.1590/0004-282x20170160>.
7. Fink JK. Hereditary spastic paraplegia: 44linic-pathologic features and emerging molecular mechanisms. *Acta Neuropathol*. 2013 Sep;126(3):307–28
8. Fink JK. Hereditary Spastic Paraplegia Overview. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Bird TD, Dolan CR, Fong C-T, et al., editors. *GeneReviews*(®) [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cited 2014 Jun 15]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1509/>

9. da Graça FF, de Rezende TJR, Vasconcellos LFR, Pedroso JL, Barsottini OGP and França MC Jr (2019) Neuroimaging in Hereditary Spastic Paraplegias: Current Use and Future Perspectives. *Front. Neurol.* 9:1117. Doi: 10.3389/fneur.2018.01117
10. Harding AE. Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet.* 1983;1(8334):1151-5.
11. Hauser S, Poenisch M, Schelling Y, Höflinger P, Schuster S, Teegler A, Betten R, Gustafsson JÅ, Hübener-Schmid J, Schlake T, Chevessier-Tünnesen F, Horscroft N, Björkhem I, Schöls L. mRNA as a Novel Treatment Strategy for Hereditary Spastic Paraplegia Type 5. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2019 Oct 31;15:359-370. doi: 10.1016/j.omtm.2019.10.011
12. Hederá Pedro, Hereditary Spastic Paraplegia Overview Initial Posting: August 15, 2000; Last Revision: February 11, 2021. GeneReviews® [Internet]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1509/>
13. Henson BJ, Zhu W, Hardway K, Wetzel J, Stefan M, Albers K, Nicholls R. Transcriptional and post-transcriptional regulation of SPAST, the gene most frequently mutated in hereditary spastic paraplegia. *PLoS One* 2012;7(5):e36505. doi: 10.1371/journal.pone.0036505. Epub 2012 May
14. Karle et al. Electrophysiological characterisation of motor and sensory tracts in patients with hereditary spastic paraplegia (HSP) *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2013, 8:158 <http://www.ajrd.com/content/8/1/158>
15. Klebe S, Depienne C, Gerber S, et al. Spastic paraplegia gene 7 in patients with spasticity and/or optic neuropathy. *Brain* 2012; 135: 2980–93.
16. Margetis K, Korfiás S, Boutos N, Gatzonis S, Themistocleous M, Siatouni A, et al. Intrathecal baclofen therapy for the symptomatic treatment of hereditary spastic paraplegia. *Clin Neurol Neurosurg.* (2014) 123:142–5. doi: 10.1016/j.clineuro.2014.05.024

17. Marelli C, Salsano E, Politi LS, Labauge P. Spinal cord involvement in adult-onset metabolic and genetic diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2018; 90: 211–18.
18. Martinuzzi A, Montanaro D, Vavla M, Paparella G, Bonanni P, Musumeci O, et al. (2016) Clinical and Paraclinical Indicators of Motor System Impairment in Hereditary Spastic Paraplegia: A Pilot Study. *PLoS ONE* 11(4): e0153283. doi:10.1371/journal.pone.0153283
19. Murray & Mitsumoto, In: Bradley. *Neurology in Clinical Practice*, Sixth Edition, Elsevier. 2013.
20. Nakazeki et al, MiR-33a is a therapeutic target in SPG4-related hereditary spastic paraplegia human neurons. *Clinical*. DOI 10.1042/CS20180980
21. Niet M, de Bot ST, van de Warrenburg BP, Weerdesteyn V, Geurts AC. Functional effects of botulinum toxin type-A treatment and subsequent stretching of spastic calf muscles: a study in patients with hereditary spastic paraplegia. *J Rehabil Med.* (2015) 47:147–53. doi: 10.2340/16501977-1909
- 23.. Ruano L, Melo C, Silva MC, Coutinho P. The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia: a systematic review of prevalence studies. *Neuroepidemiology.* 2014;42(3):174-83.
24. Sartucci F, Tovani S, Murri L, Saggiocco L. Motor and somatosensory evoked potentials in Autosomal Dominant Hereditary Spastic Paraparesis (ADHSP) linked to chromosome 2p, SPG4. *Brain Research Bulletin* 74 (2007) 243–249 doi:10.1016/j.brainresbull.2007.06.018
25. Salinas S, Proukakis C, Crosby A, Warner TT. Hereditary spastic paraplegia: clinical features and pathogenetic mechanisms. *Lancet Neurol.* 2008 Dec;7(12):1127–38.
26. Scheuer et al, Double-blind crossover trial of gabapentin in SPG4-linked hereditary spastic paraplegia. *European Journal of Neurology* 2007, 14: 663–666 doi:10.1111/j.1468-1331.2007.01812.x

27. Siow S-F, Cameron Smail R, Ng K, Kumar KR and Sue CM (2019) Motor Evoked Potentials in Hereditary Spastic Paraplegia—A Systematic Review. *Front. Neurol.* 10:967. doi: 10.3389/fneur.2019.00967
28. Siow et al, Investigating motor evoked potentials as a biomarker for disease severity in hereditary spastic paraplegia . *J Neurol Neurosurg Psychiatry* June 2018 Vol 89 No 6 page 13
29. Shribman S, Reid E, Corsby A, Houlden H, Warner T. Hereditary spastic paraplegia: from diagnosis to emerging therapeutic approaches. *Lancet Neurol.* 2019 Jul;31 [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30235-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30235-2)
30. Schöls L, Rattay TW, Martus P, Meisner C, Baets J, Fischer I, et al. Hereditary spastic paraplegia type 5: natural history, biomarkers and a randomized controlled trial. *Brain* (2017) 140:3112–27. doi: 10.1093/brain/awx273
31. Schule R et al, the Spastic Paraplegia Rating Scale (SPRS) - A reliable and valid measure of disease severity, Sep 2006, *Neurol.* 67(3):430-4 DOI: [10.1212/01.wnl.0000228242.53336.90](https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000228242.53336.90)
32. de Souza et al, Spinal cord stimulation improves motor function and gait in spastic paraplegia type 4 (SPG4): Clinical and neurophysiological evaluation *Parkinsonism and Related Disorders* 83 (2021) 1–5
33. Trummer B, Haubenberger D and Blackstone C (2018) Clinical Trial Designs and Measures in Hereditary Spastic Paraplegias. *Front. Neurol.* 9:1017. doi: 10.3389/fneur.2018.01017
34. Wilke et al, Serum neurofilament light chain is increased in hereditary spastic paraplegias *Annals of Clinical and Translational Neurology* 2018; 5(7): 876–882 doi: 10.1002/acn3.583
35. Zucchi et al, Cerebrospinal Fluid Neurofilaments May Discriminate Upper Motor Neuron Syndromes: A Pilot Study . *Neurodegener Dis* 2018;18:255–261 DOI: 10.1159/0004939 November 14, 2018

## 7. ARTIGO

**A ser submetido à revista PLoS One**

**Evoked potentials as biomarkers of hereditary spastic paraplegias**

Samanta Ferraresi Brighente<sup>1</sup>, Ana Luiza Rodrigues Louzada<sup>2</sup>, Gabriela Marchisio Giordani<sup>1</sup>, Helena Fussiger<sup>1</sup>, Marco Antonnio Rocha dos Santos<sup>1</sup>, Diana Maria Cubillos-Arcila<sup>1</sup>, Paul Vicuña<sup>1</sup>, Pablo Brea Winckler<sup>1,3</sup>, Jonas Alex Morales Saute<sup>1,2,3,4\*</sup>

1 - Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

2 - Neurology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

3 - Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil

4 - Department of Internal Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

\*Corresponding author:

Jonas Alex Morales Saute

Medical Genetics Divison, HCPA

Ramiro Barcelos, 2350, Zip-code 90035-903, Porto Alegre, Brazil



Phone:+55-051-33598011

e-mail: [jsaute@hcpa.edu.br](mailto:jsaute@hcpa.edu.br)

**Word count**

Title: 77 characters

Abstract: 277 words

Text:

Conflict of interest statement:

All authors have no disclosures related to this study.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## **Abstract**

**Introduction:** The Hereditary Spastic Paraplegias (HSP) are a group of genetic diseases that lead to slow deterioration of locomotion. Clinical scales seem to have low sensitivity in detecting disease progression, making the search for additional biomarkers a paramount task. This study aims to evaluate the role of evoked potentials (EPs) as disease biomarkers of HSPs. **Methods:** a single center cross-sectional case-control study was performed, in which 18 individuals with genetic diagnosis of HSP and 20 healthy controls were evaluated. Motor evoked potentials (MEP) obtained with transcranial magnetic stimulation and somatosensory evoked potentials (SSEP) were performed in lower limb (LL) and upper limbs (UL). **Results:** Central motor conduction time in lower limbs (CMCT-LL) was prolonged or absent in 100% (18/18) of HSP subjects, with marked reductions in MEP-LL amplitudes when compared to the control group ( $p < 0.001$  for both comparisons). CMCT-UL was 3.59ms (95% CI: 0.73 to 6.46;  $p = 0.015$ ) prolonged and MEP-UL amplitudes were reduced ( $p = 0.008$ ) in the HSP group. SSEP-LL latencies were prolonged in HSP subjects when compared to controls ( $p < 0.001$ ), with no statistically significant differences for upper limbs ( $p = 0.147$ ). SSEP-UL and SSEP-LL latencies presented moderate to strong correlations with age at onset ( $Rho = 0.613$ ,  $p = 0.012$ ) and disease duration ( $Rho = 0.835$ ,  $p < 0.001$ ), respectively. Similar results were obtained for the SPG4 subgroups of patients. **Conclusion:** Motor and somatosensory evoked potentials presented adequate discriminatory validity, distinguishing cases and controls. MEP were severely affected in HSP subjects and SSEP-LL latencies were prolonged, with longer latencies being related to more severe disease. Future longitudinal studies should address if SSEP is a sensitive disease progression biomarker for HSP.

**Keywords:** hereditary spastic paraplegia; biomarker; motor evoked potential; somatosensory evoked potentials; evoked potentials

## Introduction

The Hereditary Spastic Paraplegias (HSP) are a group of monogenic neurodegenerative diseases with great clinical and genetic heterogeneity, currently with 83 different *loci*<sup>1</sup> [1]. HSPs are rare diseases with prevalence estimations ranging from 2 to 9.1 per 100,000 individuals [2,3,4]. The main features of these conditions are related to the retrograde degeneration of the longest axons of the corticospinal tract and the posterior columns [5].

HSP are classified in pure and complex forms [6]. An isolated pyramidal syndrome that predominantly affects the lower limbs, accompanied or not by neurogenic bladder and impaired vibratory sensation, characterizes "pure" HSP. Additional involvement of other systems (cognitive impairment, ataxia, parkinsonism, visual or auditory disorders, peripheral neuropathy, etc.) defines "complex" forms. Symptoms progress slowly, starting from childhood to late adulthood [3,7], and complex forms are generally associated to a more severe disease course [2].

Although the natural history of HSPs is largely unknown, the available studies point to a very slow progression [2] suggesting that clinical scales based on neurological examination might not present enough sensitivity to change for detecting disease progression, making the search for additional biomarkers a paramount task. Abnormalities in motor and somatosensory evoked potentials were previously described in HSPs, pointing neurophysiological measurements of the integrity of central motor and sensory pathways as candidate biomarkers of these diseases. However, results on motor evoked potentials (MEP) and somatosensory evoked potentials (SSEP) were heterogenous across reports,

with most studies evaluating small samples with poor genetic and clinical characterization [8,9,10].

Therefore, the aim of the present study was to characterize the role of motor evoked potentials MEP and somatosensory evoked potentials in lower limbs (LL) and upper limbs (UL) as biomarkers of HSPs, and to advance in the understanding of the pathophysiology of these disorders; especially concerning the involvement of central sensory pathways.

## **Methods**

A single center exploratory cross-sectional case-control study was performed, in which a convenience sample of 18 individuals (from 11 families) with genetic diagnosis of HSP (12 SPG4, 3 SPG5, 1 SPG7, 1 SPG11 and 1 cerebrotendinous xanthomatosis) and 20 healthy controls were evaluated. Participants were included in the study from October 2019 to February 2021. The study was approved by the Ethics in Research Committee of *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* (GPPG-HCPA 2019-0081), Porto Alegre, Brazil.

Eligibility for cases were previous molecular diagnosis of HSP and acceptance in participating in the study. Healthy subjects, unrelated, but with similar sex and ages to cases, without previous diagnosis of neurological or systemic diseases associated to motor or sensory abnormalities were recruited as the control group. Considering the exploratory design of the study, no single primary outcome was defined and sample size estimations were not performed.

Data regarding sex, age, age at onset (first motor sign), disease duration and history of peripheral neuropathy were collected from patients and relatives or retrieved from electronic medical records. Severity of disease was evaluated with the Spastic Paraplegia Rating Scale (SPRS, range: 0–52, crescent in severity)

[8]. We also analyzed motor-SPRS (mSPRS), excluding items related to pain and sphincter control (range: 0–44).

### **Electrophysiological procedures**

MEPs were measured to the first dorsal interosseus and *tibialis anterior* muscles after muscle activation. MEPs were obtained by single pulse transcranial magnetic stimulation with the Neuro-MS Paired Monophasic Transcranial Magnetic Stimulator (Neurosoft, Russia) device, in which an eight-shaped magnetic stimulating coil was placed over the motor cortex (total motor conduction time, TMCT) of the dominant hemisphere (C3 or C4, based on 10-20 EEG system), orientating the coil at 45° degrees from C3-C4 positions to nasion, over the seventh cervical vertebra for UL and over the fifth lumbar vertebra for LL (peripheral motor conduction time, PMCT). The pulse intensity started at the motor threshold value and increased up to about 20% of this threshold, single pulses were delivered with a frequency of 1 Hz. Ten MEPs were recorded and their amplitudes and latencies were averaged. The recording sensitivity was 100µV and 5ms per division and the filter for lower and higher frequencies was 5Hz and 10kHz, being analyzed during 100ms. Central motor conduction time (CMCT) was obtained with the direct method, by subtracting TMCT from PMCTs. When CMCT was absent, a ceiling value of 100ms was imputed. MEP amplitudes were measured from baseline to peak.

SSEPs were obtained using Neuropack M1 MEB-9200 (Nihon Kohden, Japan), in which the stimulus was generated through electrical pulses of 0.2ms applied 3 times/sec with intensities ranging from 2 to 20mV applied in medial malleolus and wrists, over the median and posterior tibial nerves respectively. On average 200 to 250 potentials were performed and superimposed to check for the

reproducibility of the stimulus. Central recording electrodes were placed on the scalp over the primary sensitive area (Fz, Cz, C3, C4) with peripheral check points at the Erb point for the UL and popliteal fossa for the LL. The recording sensitivity was 2 $\mu$ V and 5ms per division and the filter for lower and higher frequencies was 10-2500Hz, being analyzed during 100ms. The N20 peak latencies was considered for the UL and the N50 peak latencies was considered for the LL. All neurophysiological evaluations were performed by the same evaluator (SFB), in order to reduce measurement bias. Examples of MEP and SSEP recording are presented in **Supp Figure 1**.

### **Statistical analysis**

Statistical tests were selected according to the distribution of data given by Shapiro-Wilk test and histograms. Age, age at onset, disease duration, SPRS scores and CMCT-UL presented normal distributions and were presented as means and standard deviations. The other continuous variables in the study exhibited a non-parametric distribution and were shown as median and interquartile ranges. Comparisons between cases and controls for continuous variables were performed by Mann-Whitney U-test for non-parametric and by two-tailed unpaired Student's t-test for parametric variables and by Fisher's Exact Test for categorical variables. Correlations were performed with Spearman or Pearson correlation tests according to data distribution. Statistical significance was defined as  $p < 0.05$ .

### **Results**

The main demographic characteristics of the sample are summarized in **Table 1** and the main motor and somatosensory evoked potentials findings are described in **Table 2**. Among all the 18 individuals with HSP, only with CTX had complains about a decreased painful sensibility in then LL, and one with SPG5 had a decreased vibratory sensibility in the neurological exam in the LL.

**Table 1. Main demographic characteristics of the study sample**

	Healthy Controls n = 20	HSP n = 18	SPG4 n = 12	p-value
<b>Female sex</b>	12/20 (60%)	7/18 (38%)	5/12 (41%)	0.341 <sup>1</sup>
<b>Age (years)</b>	35.2 (10.4)	39.7 (18.7)	38.17 (6.25)	ns <sup>2</sup>
<b>Height (meters)</b>	1.66 (0.1)	1.64 (0.17)	1.61 (0.18)	ns <sup>2</sup>
<b>Age at Onset (years)</b>	-	23.06 (15.9)	22.83 (5,47)	-
<b>Disease duration (years)</b>	-	16.6 (9.07)	15.33 (2.74)	-
<b>SPRS</b>	-	19.9 (10.65)	17.25 (3.02)	-
<b>SPRS motor</b>	-	16.8 (8.9)	15.17 (2.74)	-

Data are shown as mean and standard deviation. **HSP**: Hereditary spastic paraplegias; **ns**, not statistically significant; **SPRS**: Spastic Paraplegia Rating Scale; **mSPRS**: Motor Spastic Paraplegia Rating Scale.<sup>1</sup>Fisher's Exact Test. <sup>2</sup> two-tailed unpaired Student's t-test comparing HSP and controls and SPG4 subgroup and controls.

**Table 2 – Main motor and somatosensory evoked potentials findings**



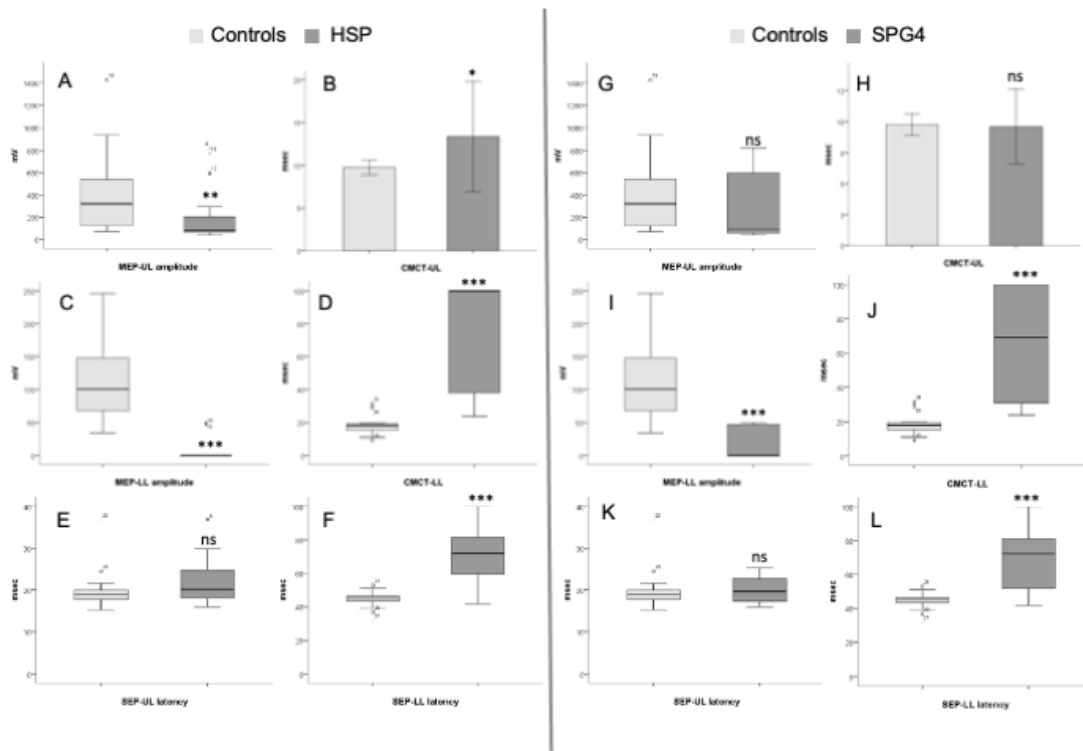
	Healthy Controls n = 20	HSP overall n = 18	p-value <sup>1</sup>	SPG4 n = 12	p-value <sup>2</sup>
<b>CMCT – UL (ms)</b> <sup>1</sup>	9.76 (0.87)	13.36 (6.42)	0.015	9.14 (3.69)	0.81
<b>CMCT – LL (ms)</b>	18.11 (4.67)	100 (63.51)	<0.001	69.0 (37.21)	<0.001
<b>MEP amplitude-UL (<math>\mu</math>V)</b>	318.4 (464.71)	86.64 (235.03)	0.008	90.54 (585.95)	0.53
<b>MEP amplitude-LL (mV)</b>	100.6 (86.1)	0 (0)	<0.001	0 (47.92)	<0.001
<b>SEP UL (ms)</b>	18.8 (2.52)	20.17 (7.09)	0.147	19.60 (6.31)	0.59
<b>SEP LL (ms)</b>	45 (4.10)	72.1 (27.2)	<0.001	72.1 (36.0)	<0.001

Data are shown as median and interquartile range. except for <sup>1</sup>CMCT – UL. which is shown as mean and standard deviation. **CMCT**: Central Motor Conduction Time; **HSP**: Hereditary spastic paraplegias; **LL**: lower limbs; **MEP**: motor evoked potential; **ms**: milliseconds; **mV**: millivolt; **SSEP**: Somatosensory Evoked Potential; **UL**: upper limbs;  **$\mu$ V**: microvolt. <sup>1</sup> refers to comparisons between the overall HSP and the control group and <sup>2</sup> to comparisons between the SPG4 subgroup and the control group.

### Motor evoked potentials

MEP amplitudes in UL and LL were decreased in HSP subjects when compared to healthy controls (p=0.008, **Figure 1A**; p<0.0001, **Figure 1C**; respectively). Similar results were found in the SPG4 subgroup for amplitudes of MEP-LL (p=0.001, **Figure 2C**), but not for amplitudes of MEP-UL, which presented a trend for reduced amplitudes when compared to healthy controls (p=0.053, **Figure 2A**). No statistically significant correlations of MEP amplitudes for the overall HSPs or

SPG4 subgroup were found with disease severity variables (**Supp. Table 1** and **Supp. Table 2** respectively).



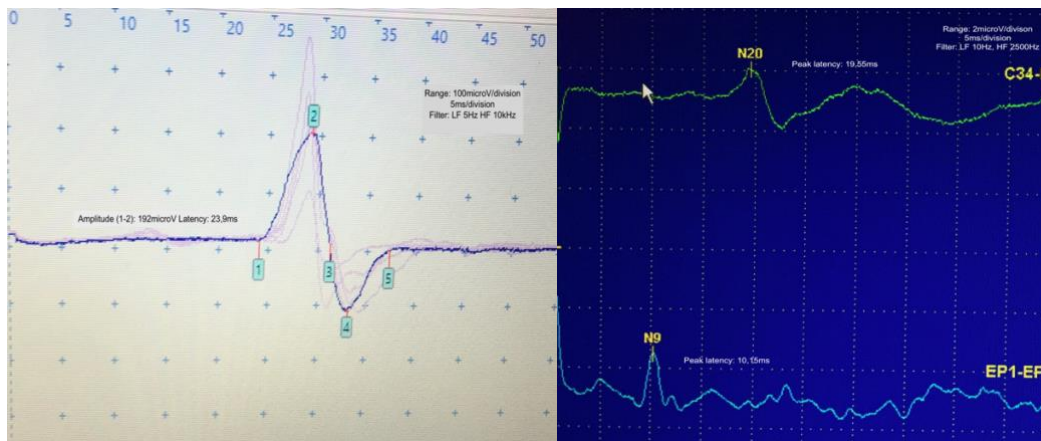
**Figure 1 – Evoked potentials abnormalities in hereditary spastic paraplegias**

**CMCT:** Central Motor Conduction Time; **HSP:** Hereditary spastic paraplegia; **LL:** lower limbs; **MEP:** motor evoked potential; **msec:** milliseconds; **mV:** millivolt; **SSEP:** Somatosensory Evoked Potential; **UL:** upper limbs; **µV:** microvolt.  
\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

**Figure 2 – Evoked potentials abnormalities in SPG4**

**CMCT:** Central Motor Conduction Time; **HSP:** Hereditary spastic paraplegia; **LL:** lower limbs; **MEP:** motor evoked potential; **msec:** milliseconds; **mV:** millivolt; **SSEP:** Somatosensory Evoked Potential; **UL:** upper limbs; **µV:** microvolt.  
\*\*\* $p < 0.001$ .

CMCT in lower limbs (LL) was prolonged or absent in 100% (18/18) of HSP subjects with striking differences when compared to healthy controls ( $p < 0.001$ , **Figure 1D**). CMCT-UL was 3.59ms (95% CI: 0.73 to 6.46;  $p = 0.015$ , **Figure 1B**) prolonged in HSP subjects when compared to healthy controls. Similar results were found for the SPG4 subgroup for CMCT-LL ( $p < 0.001$ , **Figure 2D**), but not for CMCT-UL ( $p = 0.813$ , **Figure 2B**) when compared to healthy controls. No statistically significant correlations of CMTCs for the overall HSPs or SPG4 subgroup were found with other disease severity variables (**Supp. Table 1** and **Supp. Table 2** respectively).



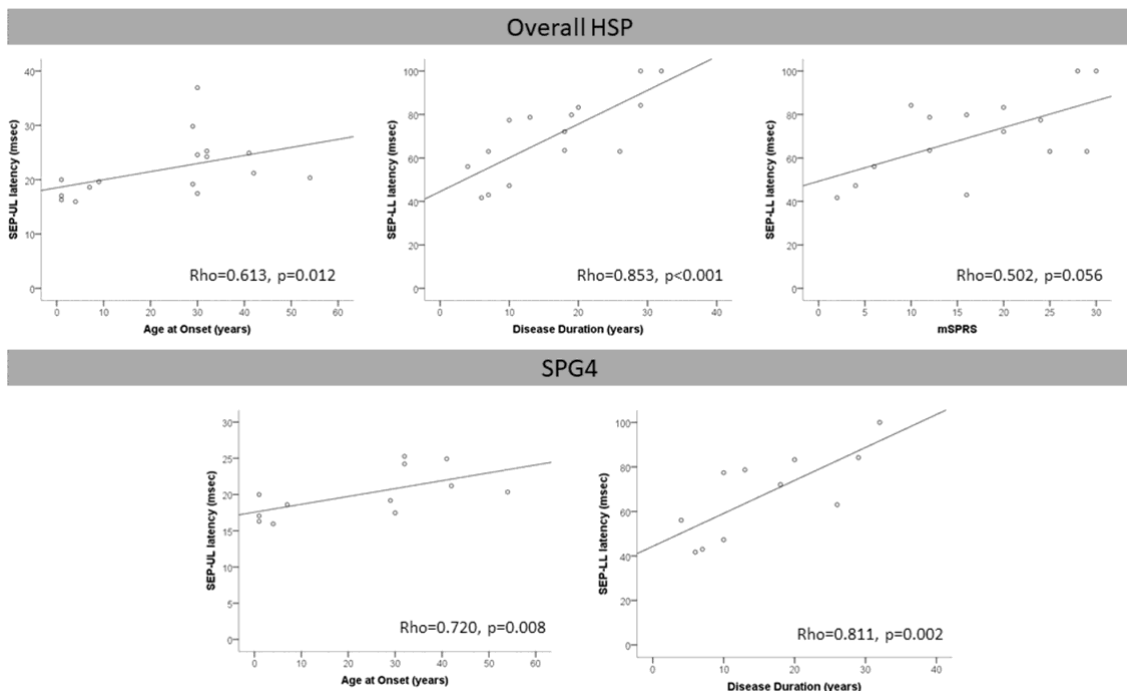
### Supplemental Figure 1 – Examples of motor and somatosensory evoked potentials

**A)** Example of a motor evoked potential (MEP); **B)** Example of a Somatosensory Evoked Potential (SSEP).

### Somatosensory evoked potentials (SSEP)

Cortical SSEP latencies in lower limbs ( $p < 0.001$ , **Figure 1F**), but not in upper limbs ( $p = 0.147$ , **Figure 1E**), were prolonged in HSP subjects when compared to healthy controls. SEP-LL presented a direct correlation with age ( $Rho = 0.628$ ,  $p = 0.012$ ) and disease duration ( $Rho = 0.835$ ,  $p < 0.001$ , **Figure 3B**), and moderate,

but non-significant correlations with SPRS (Rho=0.483, p=0.068) and motor SPRS (Rho=0.502, p=0.056, **Figure 3C**) in the overall HSP group. SEP-UL presented a direct correlation with age (Rho=0.698, p=0.003) and age at onset (Rho=0.613, p=0.012, **Figure 3A**) in the overall HSP group. Similar results were obtained for the SPG4 subgroups of patients, with prolonged cortical SEP latencies in lower limbs (p=0.001, **Figure 2F**), but not in upper limbs (p=0.593, **Figure 2E**). In the SPG4 subgroup, SEP-LL presented a direct correlation with disease duration (Rho=0.811, p=0.002, **Figure 3E**) and SEP-UL presented a direct correlation with age (Rho=0.834, p=0.001) and age at onset (Rho=0.720, p=0.008, **Figure 3D**). Neither SEP-UL nor SEP-LL correlate significantly with age in the control group (Rho=0.250, p=0.274; Rho=0.260, p=0.255, respectively). No statistically significant correlations of SEP latencies for the overall HSPs or SPG4 subgroup were found with other disease severity variables (**Supp. Table 1** and **Supp. Table 2** respectively).



### **Figure 3 – Correlations of somatosensory evoked potential with disease severity variables**

**LL:** lower limbs; **MEP:** motor evoked potential; **SSEP:** Somatosensory Evoked Potential; **SPRS:** Spastic Paraplegia Rating Scale; **msec:** milliseconds; **mSPRS:** Motor Spastic Paraplegia Rating Scale; **UL:** upper limbs.

### **Discussion**

In the present study a detailed neurophysiological characterization of the integrity of central motor and sensory pathways in individuals with HSPs was performed. Our results indicated that motor and somatosensory evoked potentials presented adequate discriminatory validity, distinguishing HSP subjects from healthy controls. MEPs were more severely affected in HSP subjects and SSEP-LL latencies were prolonged, with longer latencies being related to more severe disease.

Motor evoked potential presented decreased amplitudes in both the UL and the LL in the overall HSP group, but for SPG4, only MEP-LL amplitudes were reduced. Several studies have described decreased or absent MEP-LL amplitudes in HSPs [8,9,10,11,12]; however, for MEP-UL amplitudes the results from different authors were more heterogeneous, with some studies finding similar results to healthy controls [10,11]. No statistically significant correlations between MEP-LL and MEP-UL amplitudes with disease severity variables were found in this work, and most previous studies did not report evaluating these correlations [8,9,10,11,12].

Central motor conduction times in the lower limbs were altered in 18/18 (100%) of HSP individuals in this study, being absent in 8/18 (44%). In a recent

systematic review of MEPs in HSPs [9], 78% of studies found abnormalities in the CMCT-LL. A study involving three centers in Germany that evaluated 128 patients with HSP-suspicion, 54 of them with confirmed genetic diagnosis, reported prolongation of the CMCT-LL in 37% of the cases and absence in 36%. The average disease duration and SPRS scores in that sample was 18 years and 17.8 points, respectively. In the subgroup of 35 patients with SPG4, 48% presented prolonged CMCT-LL [8]. Another multicenter study carried out in Italy performed neurophysiological characterization of 49 subjects with confirmed genetic diagnosis of HSP, describing that CMCT-LL was prolonged or absent in all cases, except for one individual with SPG4 with mild phenotype. However, the correlations of CMCT findings with disease severity variables and the number of subjects who performed each of the evaluations were not clearly described for this measurement [13]. Another Italian study that evaluated 12 patients with SPG4 with an average disease duration of 20 years described prolonged CMCT-LL obtained by both the direct and indirect methods [10].

Central motor conduction times in the upper limbs were prolonged in the overall HSP group, but without differences between SPG4 and controls. Previous studies showed variable results for CMCT-UL, being abnormal in 59% of the studies reported in a recent systematic review [9]. In the multicenter studies reported above, 45% of Italian [13] and 32% (28% prolonged and 4% absent) of German patients presented prolonged CMTC-UL; however, CMCT-UL was normal in all subjects with SPG4 evaluated in the German study [8]. Eight studies reported normal CMCT-UL in HSPs, 4 of which in cohorts that included only patients with SPG4 [9,10,14,15,16].

We did not find any significant correlations between CMCTs and age at onset, disease duration and SPRS, which is similar to that found in most previous studies [9,10,17]. The exception was the study by Karle et al., which described a weak correlation between CMCT-LL with total SPRS and its spasticity sub-score. Another interesting data from this study was the genotype neurophysiological-phenotype correlation, in which subjects with missense variants had lower CMCT-LL latencies than subjects with truncating variants and in-frame deletions in *SPAST* [8]. Interestingly, such findings have been replicated in advanced neuroimaging studies in which SPG4 patients with missense variants had less severe corticospinal tract diffusivity abnormalities than patients with truncating variants in *SPAST* [18].

Therefore, all these data indicate important changes in CMCT in patients with HSPs, particularly when evaluated in the lower limbs. The absence of MEP in lower limbs in a significant proportion of HSP subjects indicates that this measurement has a low threshold for a ceiling effect at the evaluated disease stages, which may prevent the detection of relevant correlations with variables related to disease severity. In the case of SPG4, CMCT-LL results are similar to the overall HSPs, but differ for CMCT-UL, which present similar latencies to controls in most studies. Most series that evaluated the CMCT-LL, including ours, had an average disease duration close to 20 years, with moderate to severe disease according to SPRS. Due to the ceiling effect that was observed for CMCT-LL, it is unlikely that this variable will be a good biomarker of disease progression for HSP subjects with similar severity and disease durations to those reported so far; however, it will be essential that future longitudinal studies assess CMCT-LL at early disease stages, looking for an early-stage disease progression

biomarker. The normal or slightly altered results of the CMCT-UL, on the other hand, suggest that future longitudinal studies should assess the progression of latencies and amplitudes of MEP in the upper limbs, seeking for an eventual role of this measure as a disease progression biomarker.

With regard to somatosensory evoked potentials, the present study found important changes only in lower limbs, in which the cortical SSEP-LL latencies were prolonged in 100% (18/18) of cases, with no differences in SSEP-UL latencies in the overall HSPs and in the SPG4 subgroup when compared to the control group. SSEPs are less explored in the literature, and available data are more controversial. In the German study by Karle and collaborators SSEP-UL latencies were normal in 91% of cases, whereas SSEP-LL latencies were altered in 34% of cases, being prolonged in 27% and absent in 7% [8]. In the small Italian series that evaluated only SPG4 patients, SSEP-UL latencies were normal, whereas SSEP-LL latencies were absent in 25% of cases. However, because absent potentials data were censored, reported SSEP-LL latencies were similar to the control group [10]. In the multicenter Italian study by Martinuzzi and collaborators, cortical SSEP-LL latencies were obtained from 44 subjects with HSP, being prolonged in 30/44 (68%). SSEP-UL latencies were evaluated only in the 30 subjects with abnormal SSEP-LL, being changed in 21/30 (70%), including 9/22 (40%) of patients with SPG4 and in most patients with SPG5, SPG7 and SPG15 [13]. A congress abstract reported cortical SSEP latencies in 28 subjects with SPG4, with an average disease duration of 24 years and SPRS of 20.4 points. This report described changes in SSEP-UL and SEP-LL latencies in 25% and 38% of cases, respectively. The authors also reported severe temporal dispersion with decreased SSEP-LL amplitude in 61% of patients [19].



In the present study, SSEP-LL latencies strongly correlated with disease duration and moderately with age and showed tendencies to moderate correlations with SPRS and its motor sub score, with similar results for correlation with disease duration in the SPG4 subgroup. Despite not differing from controls, SSEP-UL latencies showed a moderate direct correlation with age at onset and with the age of subjects with HSP and with SPG4. As we did not find any correlation between age and SSEP-LL and SSEP-UL latencies in healthy controls, the correlations identified with age in HSP likely represent a confounding factor due to its high intercorrelation with age at onset and disease duration. Due to the exploratory nature of this study and its small sample size, it was not possible to perform more robust statistical analyzes to correct for this bias. The study by Karle et al. reported a correlation of SSEP-LL latencies with clinical sensory deficit [8]; however, correlations with other clinical variables were not previously described [8,10,13,19].

Prolonged cortical SSEP-LL latencies in HSP are consistent with the clinical findings of vibratory sensation impairment even in pure forms of HSPs and with the results of neuroimaging studies, which indicate that the neurological changes also affect sensory pathways. Advanced neuroimaging studies using voxel-based morphometry show widespread damage to white matter in all forms of HSP and also damage to gray matter in complex forms [20]. In addition to microstructural changes in the corticospinal tract, changes in posterior brain subcortical regions were also reported in SPG4 subjects [18]. In two studies, one that evaluated 13 subjects with SPG4 and reported a reduction in the cervical spinal cord area compared to controls [18] and another that evaluated 13 subjects with pure forms of HSP with different genetic diagnoses and reported a reduction

in the area of the cervical and dorsal medulla [21], the reduction of spinal cord area was not accompanied by its flattening, which was interpreted as similar findings to pathological reports of SPG4 individuals, in which lateral and posterior columns involvement were the major macroscopic finding, suggesting both corticospinal tracts and posterior column involvement in this subtype [21]. Krabbe and collaborators studied 16 patients with autosomal dominant HSP, later described as SPG4, demonstrating significant decrease in the anteroposterior diameter of the spinal cord at the T3 and T9 levels, which corresponded neuropathologically to degeneration of the lateral corticospinal tracts and dorsal columns [22]. *Post-mortem* neuropathological studies have also confirmed the involvement of the *gracilis* and *cuneiform* fascicles, maximum in the region of the dorsal spine [5]. Additionally, considering that dorsal root ganglion cells, which are pseudounipolar neurons, present the longest axons in humans [23] and that HSPs are one of the groups of dying-back axonopathies of long tracts, it was expected that sensory pathways abnormalities detected by SSEP would be found and would be relevant for these diseases.

Our results suggest that there are changes in SSEP-LL latencies in patients with HSP and that these latencies are correlated with longer disease durations. Future studies with larger sample sizes will be able to better detail the possible correlation with disease severity measured by SPRS. Thus, SSEP-LL latencies can be considered as disease biomarkers of HSPs and it will be essential that future longitudinal studies evaluate SSEP-LL and SSEP-UL latencies in HSPs, seeking to evaluate its role as a disease progression biomarker.

### **Study Limitations**

The major study limitation was its small sample size and its exploratory design. Although several statistically significant differences were found for different EP measurements; we likely did not have enough power to detect smaller differences between groups and weaker to moderate correlations of MEPs and SSEPs latencies with other disease severity variables. Another study limitation is the lack of nerve conduction studies (NCS). CMCTs were obtained by the direct method, which is not influenced by motor NCS. Abnormalities in sensory NCS might have affected SSEPs; however, since only 2/18 individuals in the study presented peripheral neuropathy, both with complex HSP, and the SSEPs results of the overall HSP and the SPG4 subjects (all with pure HSP and with no evidence of peripheral neuropathy) were similar, it is unlikely that the lack of correction for sensory NCS have influenced the study results in a significant manner.

## **Conclusion**

Motor and somatosensory evoked potentials presented adequate discriminatory validity, distinguishing HSP subjects from controls. MEP were severely affected and SSEP-LL latencies were prolonged, with longer latencies being related to more severe disease, suggesting SSEP-LL as an adequate disease severity biomarker. Future longitudinal studies should address if CMCT in earlies disease stages and SSEP latencies are sensitive disease progression biomarkers for HSPs that could be used as surrogate outcome measures for future clinical trials.

## **Acknowledgements**

We are grateful to patients for participating in this study. The study was funded by Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos-Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) (Grant Number: 2019-0081). We also thanks the Pain and Neuromodulation Laboratory of HCPA, particularly professor Wolnei Caumo, and the Neurophysiology Unit of the Neurology Service of HCPA, particularly Ana Luiza Rodrigues Louzada, that made available the equipment for evoked potentials measurements of this study.

**Supplementary table 1 Correlations in the HSP overall**

	<b>Age at onset (years)</b>	<b>Disease duration (years)</b>	<b>SPRS</b>	<b>SPRS motor</b>
<b>Amplitude UL (<math>\mu</math>V)</b>	Rho=0.07 p=0.78	Rho=0,1 p=0.71	Rho=0.08 p=0,75	Rho=0.38 p=0.89
<b>Amplitude LL (<math>\mu</math>V)</b>	Rho=0.095 p=0.78	Rh0=0.04 p=0.9	Rho=0.17 p=0,6	Rho=0.17 p=0.96
<b>CMCT UL (ms)</b>	Rho=0.01 p=0.96	Rho=0.08 p=0.73	Rho=0.41 p=0.08	Rho=0.38 p=0.13
<b>CMCT LL(ms)</b>	Rho=0.51 p=0.07	Rho=0.36 p=0.22	Rho=0.49 p=0.08	Rho=0.44 p=0.14
<b>SSEP UL (ms)</b>	<b>Rho=0.61</b> <b>p=0.01</b>	Rho=0.36 p=0.16	Rho=0.45 p=0.08	Rho=0.47 p=0.06
<b>SSEP LL (ms)</b>	Rho=0.31 p=0.25	<b>Rho=0.83</b> <b>p=0.000</b>	<b>Rho=0.48</b> <b>p=0.06</b>	<b>Rho= 0.50</b> <b>p=0.056</b>

**CMCT:** Central Motor Conduction Time; **HSP:** Hereditary spastic paraplegias; **LL:** lower limbs; **MEP:** motor evoked potential; **SSEP:** Somatosensitive Evoked Potencial; **UL:** upper limbs

**Supplementary table 2 Correlations in the SPG4 subgroup**

	<b>Age at onset (years)</b>	<b>Disease duration (years)</b>	<b>SPRS</b>	<b>SPRS motor</b>
<b>Amplitude UL (µV)</b>	Rho=0.55 p=0.88	Rho=0.22 p=0.53	Rho=0.05 p=0.88	Rho=0.02 p=0.94
<b>Amplitude LL (µV)</b>	Rh=0.3 p=0.55	Rh0=0.04 p=0.84	Rho=0.3 p=0.55	Rho=0.6 p=0.87
<b>CMCT UL (ms)</b>	Rho=0.16 p=0.60	Rho=0.12 p=0.70	Rho=0.35 p=0,25	Rho=0.29 p=0.35
<b>CMCT LL(ms)</b>	Rho=0.67 p=0.06	Rho=0.37 p=0.35	Rho=0.60 p=0.10	Rho=0.52 p=0.18
<b>SSEP UL (ms)</b>	<b>Rho=0.72</b> <b>p=0.008</b>	Rho=0.43 p=0.16	Rho=0.41 p=0.18	Rho=0.41 p=0.17
<b>SSEP LL (ms)</b>	Rho=0.31 p=0.34	<b>Rho=0.81</b> <b>p=0.002</b>	Rho=0.56 p=0.07	Rho= 0.56 p=0.07

**CMCT:** Central Motor Conduction Time; **HSP:** Hereditary spastic paraplegias; **LL:**

lower limbs; **MEP:** motor evoked potential; **SSEP:** Somatosensitive Evoked Potential;

UL: upper limbs

## References

1. Hedera Pedro, Hereditary Spastic Paraplegia Overview Initial Posting: August 15, 2000; Last Revision: February 11, 2021. GeneReviews® [Internet]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1509/>
2. Schüle R, Wiethoff S, Martus P, et al. Hereditary spastic paraplegia: Clinicogenetic lessons from 608 patients. *Ann Neurol.* 2016 Apr;79(4):646-58
3. Murray & Mitsumoto, In: Bradley. *Neurology in Clinical Practice*, Sixth Edition, Elsevier. 2013
4. Ruano L, Melo C, Silva MC, Coutinho P. The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia: a systematic review of prevalence studies. *Neuroepidemiology.* 2014;42(3):174-83.
5. Fink JK. Hereditary spastic paraplegia: clinico-pathologic features and emerging molecular mechanisms. *Acta Neuropathol.* 2013 Sep;126(3):307–28
6. Harding AE. Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet.* 1983;1(8334):1151-5.
7. Shribman S, Reid E, Corsby A, Houlden H, Warner T. Hereditary spastic paraplegia: from diagnosis to emerging therapeutic approaches. *Lancet Neurol.* 2019 Jul;31 [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30235-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30235-2)
8. Karle KN, Schüle R, Klebe S, et al. Electrophysiological characterisation of motor and sensory tracts in patients with hereditary spastic paraplegia (HSP). *Orphanet J Rare Dis.* 2013 Oct 9;8:158. Siow S-F, Cameron Smail R, Ng K, Kumar KR and Sue CM (2019) Motor Evoked Potentials in

- Hereditary Spastic Paraplegia—A Systematic Review. *Front. Neurol.* 10:967. doi: 10.3389/fneur.2019.00967
9. Sartucci F, Tovani S, Murri L, Sagliocco L. Motor and somatosensory evoked potentials in Autosomal Dominant Hereditary Spastic Paraparesis (ADHSP) linked to chromosome 2p, SPG4. *Brain Research Bulletin* 74 (2007) 243–249  
doi:10.1016/j.brainresbull.2007.06.018
10. Pelosi L, Lanzillo B, Perretti A, Santoro L, Blumhardt L, Caruso GM. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 1991; 54: 1099–1102  
doi: 10.1136/jnnp.54.12.1099
11. Manganelli F, Pisciotta C, Dubbioso R, Iodice R, Criscuolo C, Ruggiero L, et al. Electrophysiological characterisation in hereditary spastic paraplegia type 5. *Clin Neurophysiol.* (2011) 122:819–22. doi: 10.1016/j.clinph.2010.10.02
12. Martinuzzi A, Montanaro D, Vavla M, Paparella G, Bonanni P, Musumeci O, et al. (2016) Clinical and Paraclinical Indicators of Motor System Impairment in Hereditary Spastic Paraplegia: A Pilot Study. *PLoS ONE* 11(4): e0153283. doi:10.1371/journal.pone.0153283
13. Bönsch D, Schwindt A, Navratil P, Palm D, Neumann C, Klimpe S, et al. Motor system abnormalities in hereditary spastic paraparesis type 4 (SPG4) depend on the type of mutation in the spastin gene. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* (2003) 74:1109–12. doi: 10.1136/jnnp.74.8.1109
14. Geevasinga N, Menon P, Sue CM, Kumar KR, Ng K, Yiannikas C, et al. Cortical excitability changes distinguish the motor neuron disease



- phenotypes from hereditary spastic paraplegia. *Eur J Neurol.* (2015) 22:826– 58. doi: 10.1111/ene.12669
15. Ginanneschi F, Carluccio MA, Mignarri A, Tessa A, Santorelli FM, Rossi A, et al. Hand muscles corticomotor excitability in hereditary spastic paraparesis type 4. *Neurol Sci.* (2014) 35:1287–91. doi: 10.1007/s10072014- 1707-7
16. Nardone R, Tezzon F. Transcranial magnetic stimulation study in hereditary spastic paraparesis. *European neurology.* (2003) 49:234–7. doi: 10.1159/000070193
17. Rezende TJ, de Albuquerque M, Lamas GM, Martinez AR, Campos BM, Casseb RF, Silva CB, Branco LM, D'Abreu A, Lopes-Cendes I, Cendes F, França MC Jr. Multimodal MRI-based study in patients with SPG4 mutations. *PLoS One.* 2015 Feb 6;10(2):e0117666.
18. M. Rakowicz<sup>1</sup>, I. Ste pniak<sup>2</sup>, E. Elert<sup>2</sup>, A. Soban´ska et all. Incidence of functional alterations of somatosensory pathways in the hereditary spastic paraplegia SPG4 Abstracts of Poster Presentations / Clinical Neurophysiology 125, Supplement 1 (2014) S1–S339
19. da Graça FF, de Rezende TJR, Vasconcellos LFR, Pedroso JL, Barsottini OGP and França MC Jr (2019) Neuroimaging in Hereditary Spastic Paraplegias: Current Use and Future Perspectives. *Front. Neurol.* 9:1117. doi: 10.3389/fneur.2018.01117
20. Hedera P, Eldevik OP, Maly P, Rainier S, Fink JK. Spinal cord magnetic resonance imaging in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Neuroradiology.* 2005 Oct;47(10):730-4.

21. Krabbe K, Nielsen JE, Fallentin E, Fenger K, Herning M. MRI of autosomal dominant pure spastic paraplegia. *Neuroradiology*. 1997 Oct;39(10):724-7.
22. Smith DH. Stretch growth of integrated axon tracts: extremes and exploitations. *Prog Neurobiol*. 2009 Nov;89(3):231-9.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente dissertação teve como objetivo geral avaliar o papel dos potenciais evocados como biomarcadores das PEH. Nossos resultados demonstraram que os potenciais evocados motores foram gravemente afetados e as latências dos PESS-MI foram prolongadas em sujeitos com PEH.

Quanto aos objetivos específicos, os potenciais evocados mostraram ter validade discriminatória entre casos e controles.

A maioria das séries que avaliaram o TCMC-MI, inclusive a nossa, teve duração média da doença em torno de 20 anos, com doença moderada a grave de acordo com o SPRS. Devido ao efeito teto observado para TCMC-MI, é improvável que essa variável seja um bom biomarcador de progressão da doença para indivíduos com PEH com gravidade e duração da doença semelhantes às relatadas até agora; no entanto, será essencial que futuros estudos longitudinais avaliem o TCMC-MI nos estágios iniciais da doença, procurando um biomarcador de progressão da doença no estágio inicial. Os resultados normais ou levemente alterados do TCMC-MS, por outro lado, sugerem que futuros estudos longitudinais devem avaliar a progressão das latências e amplitudes dos PEMs nos membros superiores, buscando um eventual papel desta medida como biomarcador de progressão da doença.

As latências do PESS-MI correlacionaram-se fortemente com a duração da doença e apresentaram tendências de correlações moderadas com a SPRS, com resultados semelhantes para a SPG4. Apesar de não diferir dos controles, as latências do PESS-MS mostraram uma correlação direta moderada com a idade de início dos indivíduos com PEH e no subgrupo apenas com SPG4. Assim, as latências do PESS-MI podem ser consideradas biomarcadores de doença das PEHs e será fundamental que futuros estudos longitudinais avaliem as latências do PESS nas PEHs, buscando avaliar seu papel como biomarcador de progressão da doença.

Por fim nossos resultados neurofisiológicos demonstram importante disfunção de tratos longos motores e sensitivos do sistema nervoso central, sendo mais evidente as alterações nos membros inferiores e nos tratos motores,

dados que são condizentes com as manifestações clínicas das PEH, com dados de estudos de neuroimagem e neuropatológicos destas condições.

Foi elaborado um artigo a ser submetido a revista PLOS ONE intitulado **The role of evoked potentials as biomarkers of hereditary spastic paraplegias** comunicando nossos resultados à comunidade científica.

## 9. PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente estudo terá um seguimento longitudinal de 12 e 24 meses, com intuito de definir o papel do PEM e do PESS como biomarcadores de progressão da doença.

Futuros estudos em fases iniciais das PEH serão importantes para avaliar o papel de biomarcador de doença e de progressão do TCMC nos membros inferiores.

Estudos multicêntricos com cortes maiores podem melhorar o poder para detectar diferenças menores entre os grupos e correlações mais fracas a moderadas de latências dos PEMs e PESSs com outras variáveis de gravidade da doença.

Além disso, será possível associar os dados de integridade das vias motoras e sensitivas centrais obtidos por neurofisiologia com dados obtidos através de técnicas de neuroimagem avançada multimodais em estudos que estão sendo realizados concomitantemente em nosso centro.

Os resultados da presente dissertação, bem como seus desdobramentos mencionados acima, poderão definir biomarcadores que possam ser utilizados como desfechos substitutos para futuros ensaios clínicos randomizados para as PEHs, acelerando a descoberta de tratamentos que possam mitigar o curso progressiva desse grupo de doenças incapacitantes e negligenciadas.

## 10. ANEXOS

### 10.1 SPRS

#### APPENDIX

#### ESCALA DE AVALIAÇÃO DE PARAPLEGIA ESPÁSTICA

##### (1) Distância que caminha sem pausa

*De acordo com a história, dispositivos auxiliares são permitidos*

- 0: Normal, ilimitada
- 1: Cansaço anormal devido à espasticidade após mais de 500m
- 2: Caminha menos de 500m
- 3: Caminha menos de 10m
- 4: Incapaz de andar

##### (2) Qualidade da marcha

*É solicitado ao paciente andar o mais rápido possível uma distância de 10 metros, incluindo uma volta*

- 0: Normal
- 1: Rigidez leve, correr ainda é possível
- 2: Marcha claramente espástica, interferindo no correr
- 3: Marcha espástica, com necessidade de dispositivos auxiliares
- 4: Incapaz de andar uma distância de 10 metros mesmo com apoio máximo

##### (3) Velocidade máxima da marcha

*Tempo cronometrado para uma distância de 10 metros, incluindo uma volta.*

- 0: Normal
- 1: Levemente reduzida (10m:  $\geq 5s$ )
- 2: Moderadamente reduzida (10m:  $\geq 10s$ )
- 3: Gravemente reduzida (10m:  $\geq 20s$ )
- 4: Incapaz de andar uma distância de 10m ou tempo  $\geq 40s$

##### (4) Subir escadas

*Subir 5 degraus-volta/giro-descer 5 degraus*

- 0: Normal: não necessita apoio do corrimão
- 1: Incapacidade leve: necessita de apoio intermitente do corrimão
- 2: Incapacidade moderada: necessita de apoio contínuo do corrimão
- 3: Incapacidade grave: necessita de apoio/suporte de outra pessoa ou dispositivo adicional para realizar a tarefa
- 4: Incapaz de subir escadas

##### (5) Velocidade para subir escadas

*Tempo cronometrado para subir 5 degraus - volta/giro - descer 5 degraus*

- 0: Normal
- 1: Levemente reduzida ( $\geq 5s$  para realizar a tarefa)
- 2: Moderadamente reduzida ( $\geq 10s$  para realizar a tarefa)
- 3: Gravemente reduzida ( $\geq 20s$  para realizar a tarefa)
- 4: Incapaz de subir escadas

##### (6) Levantar-se da cadeira

*O paciente tenta se levantar de uma cadeira de madeira ou metal e encosto reto, com os braços cruzados sobre o peito*

- 0: Normal
- 1: Lento ou pode necessitar de mais de uma tentativa.
- 2: Levanta-se com apoio dos braços da cadeira.
- 3: Tende a cair para trás e pode necessitar de mais de uma tentativa, mas pode se levantar sem ajuda.
- 4: Incapaz de se levantar sem ajuda.

##### (7) Espasticidade -músculos adutores do quadril (Escala Modificada de Ashworth)

*Pontue o lado mais afetado*

- 0: Tônus muscular normal
- 1: Leve aumento de tônus muscular, manifestado por tensão momentânea
- 2: Aumento mais marcante do tônus muscular durante a maior parte da amplitude de movimento
- 3: Considerável aumento do tônus muscular - movimento passível é difícil
- 4: Membro fixo em adução

##### (8) Espasticidade -flexão do joelho (Escala Modificada de Ashworth)

*Pontue o lado mais afetado*

- 0: Tônus muscular normal
- 1: Leve aumento de tônus muscular, manifestado por tensão momentânea
- 2: Aumento mais marcante do tônus muscular durante a maior parte da amplitude de movimento
- 3: Considerável aumento do tônus muscular - movimento passível é difícil
- 4: Membro fixo em flexão ou extensão

##### (9) Fraqueza-abdução do quadril (Medical Research Council 1976)

- 0: Sem fraqueza
- 1: Fraqueza leve (4/5)
- 2: Fraqueza moderada (3/5)
- 3: Fraqueza grave (1-2/5)
- 4: Plegia (0/5)

##### (10) Fraqueza-dorsiflexão do pé (Medical Research Council 1976)

- 0: Sem fraqueza
- 1: Fraqueza leve (4/5)
- 2: Fraqueza moderada (3/5)
- 3: Fraqueza grave (1-2/5)
- 4: Plegia (0/5)

**(11) Contraturas dos membros inferiores**

*Pontue na posição supina*

– *Extensão de quadril: coluna lombar e coxas tocam a superfície. Abdução de quadril: abdução até um ângulo >60° entre as pernas é possível*

– *Extensão de joelhos: coxas e panturrilhas tocam a superfície.*

– *Extensão dorsal do tornozelo: > 10° é possível. Pronação do tornozelo : > 10° é possível*

- 0: Sem contraturas
- 1: Leve, posição anormal não fixa de uma articulação (unilateral ou bilateral)
- 2: Contratura fixa de uma articulação (unilateral ou bilateral)
- 3: Contratura fixa de duas articulações (unilateral ou bilateral)
- 4: Contratura fixa de mais de duas articulações (unilateral ou bilateral)

**(12) Dor secundária a sintomas relacionados à paraplegia espástica**

- 0: Sem dor
- 1: Presente em  $\leq$  50% do dia enquanto acordado E intensidade 0 - 3 pontos na escala visual analógica
- 2: Presente em  $\leq$  50% do dia enquanto acordado E intensidade 4 - 10 pontos na escala visual analógica
- 3: Presente em > 50% do dia enquanto acordado E intensidade 0 - 3 pontos na escala visual analógica
- 4: Presente em > 50% do dia enquanto acordado E intensidade 4 - 10 pontos na escala visual analógica

**(13) Função vesical e intestinal**

- 0: Função vesical e intestinal normais
- 1: Urgência urinária ou fecal (dificuldade de chegar ao banheiro a tempo)
- 2: Urge incontinência rara e leve (sem necessidade de fralda)
- 3: Urge incontinência moderada (necessidade de fralda ou cateter quando fora de casa)
- 4: Uso de cateter ou fralda permanentes

## 10.2 STROBE

STROBE Statement—Checklist of items that should be included in reports of *case-control studies*

	Item No	Recommendation	Page No
<b>Title and abstract</b>	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract	50
		(b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found	50
<b>Introduction</b>			
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported	51
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses	51
<b>Methods</b>			
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper	52
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection	52
Participants	6	(a) Give the eligibility criteria, and the sources and methods of case ascertainment and control selection. Give the rationale for the choice of cases and controls	52
		(b) For matched studies, give matching criteria and the number of controls per case	52
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable	52-53
Data sources/ measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group	52-53
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias	53



Study size	10	Explain how the study size was arrived at	52
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why	52-53
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding	53
		(b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions	53
		(c) Explain how missing data were addressed	-
		(d) If applicable, explain how matching of cases and controls was addressed	52
		(e) Describe any sensitivity analyses	53
<b>Results</b>			
Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study— eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed	54
		(b) Give reasons for non-participation at each stage	-
		(c) Consider use of a flow diagram	-
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders	54
		(b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest	55
Outcome data	15*	Report numbers in each exposure category, or summary measures of exposure	55

Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included	54-55
		(b) Report category boundaries when continuous variables were categorized	55-57
		(c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period	-
Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses	58
<b>Discussion</b>			
Key results	18	Summarise key results with reference to study objectives	58
Limitations	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias	63
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence	58-63
5Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results	61-62
<b>Other information</b>			
Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based	49

\*Give information separately for cases and controls.

**Note:** An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at <http://www.strobe-statement.org>.