CAROLINA DE MEDEIROS RIMKUS

**As características microestruturais do tecido neural e o
grau de atrofia cerebral nos estágios iniciais da
esclerose múltipla remitente-recorrente**

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

Programa de: Radiologia

Orientadora: Profa. Dra. Claudia da Costa Leite

Co-orientadora: Dra. Maria Concepción García

Otaduy

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Rimkus, Carolina de Medeiros

As características microestruturais do tecido neural e o grau de atrofia cerebral nos
estágios iniciais da esclerose múltipla remitente-recorrente / Carolina de Medeiros
Rimkus. -- São Paulo, 2012.

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

Orientadora: Cláudia da Costa Leite.

Co-orientadora: Maria Concepción García Otaduy.

Descritores: 1.Esclerose múltipla 2.Imagem por ressonância magnética 3.Imagem
de tensor de difusão 4.Degeneração neural 5.Bainha de mielina

USP/FM/DBD-422/12

Dedicatória

*Dedico esta tese a meus pais,
Ignácio Rimkus e Lúcia de Medeiros Rimkus,
cujos princípios nobres inspiram meus caminhos...*

*“Para ser grande, sê inteiro
nada teu exagera ou exclui
Põe quanto és no mínimo que fazes
Assim em cada lago a lua toda brilha,
Porque alta vive”*

Fernando Pessoa

Agradecimentos

À minha orientadora, Profa. Dra. Claudia da Costa Leite, pelo apoio, orientação e confiança, e também pelo exemplo de pesquisadora e pela integridade e sabedoria com que conduz seu trabalho, sendo um pilar fundamental para minha evolução médica e acadêmica e também para o desenvolvimento da neurociência em nosso meio.

À minha co-orientadora, Dra. Maria Concepción Garcia Otaduy, pelos ensinamentos na área da física médica e pelo auxílio na elaboração de protocolos, processamento das imagens de ressonância magnética e pelo companheirismo durante esses anos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo suporte financeiro por meio do projeto CINAPCE (Processo 05/56447-7), que possibilitou a compra do aparelho de ressonância Magnética de 3 Tesla e dos materiais desta pesquisa e outros projetos de pesquisa em neuroimagem. E pelo fornecimento de bolsa de doutorado (Processo 10/52593-7) para a realização desta tese, apoiando também um estágio de intercâmbio em pesquisa na cidade de Grenoble, França, ampliando meus horizontes acadêmicos e profissionais.

Ao Hospital das Clínicas (HC) e à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), pela manutenção de um centro de excelência em pesquisa e assistência médica e pelo suporte aos cursos de pós-graduação.

Aos biomédicos(as), enfermeiros(as), recepcionistas e membros da equipe de assistência e pesquisa da ressonância magnética do Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas de São Paulo (INRAD –HC) pelo auxílio diário na recepção e atendimento dos pacientes, bem como pelo carinho, respeito e competência com que

sempre acompanham, assistem ao meu trabalho e realizam o atendimento nesta grande instituição.

Aos pacientes e voluntários, que concordaram em participar da pesquisa, cedendo seu tempo e doando confiança a nosso trabalho, na esperança de colaborar com o progresso do conhecimento médico.

Aos Dr. Dagoberto Callegaro e Dr. Thiago de Faria Junqueira pela convocação, avaliação clínica dos pacientes e por compartilharem o conhecimento neuroclínico. O respeito mútuo e dedicação à pesquisa médica nos possibilitam desenvolver uma colaboração sólida e rica.

Ao Instituto de Neurociências de Grenoble (Grenoble Institut des Neurosciences, GIN – Grenoble, France), pela oportunidade de estágio de intercâmbio em neurociências onde pude aprimorar meus conhecimentos em neuroimagem e pesquisa em tensores de difusão, bem como trocar experiências com um grupo de excelência em pesquisa clínica e experimental. Reforço meu agradecimento a alguns de seus membros: Prof. Emmanuel Barbier (chefe da equipe 5), Profa. Dra. Chantal Delon Martin, Profa. Dra. Assia Jalliard (pesquisadoras responsáveis pelo projeto HERMES) e Dr. Félix Renard (físico especializado em imagens médicas e informática), os quais acrescentaram inúmeras qualidades ao meu universo científico, além de ampliar os horizontes de meu universo de amizades.

Aos pesquisadores, estudantes de pós-graduação, residentes e colegas de trabalho, por enriquecerem nosso ambiente profissional tornando o ciclo de ensinamento e aprendizado perenes. Com muito carinho às minhas amigas Katarina P. Lyra, Eun Joo Park e Celi S. Andrade pelas inúmeras horas que despendemos juntas a estudar, trabalhar e conversar, desenvolvendo um grande companheirismo e respeito mútuo.

À minha família, que sempre me guiou na vida acadêmica e profissional, com os exemplos individuais, o espírito de integridade e o anseio de retribuir à sociedade. Agradeço-lhes por sempre confiarem na minha capacidade e ampararem-me nos momentos de dúvida.

Aos meus amigos mais próximos, por lembrarem-me da beleza da vida e dos sentimentos que suplantam o tempo.

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de figuras

Lista de quadros

Lista de tabelas

RESUMO

SUMMARY

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Revisão da literatura	12
1.1.1.	A aplicação da ressonância magnética no diagnóstico da EM	12
1.1.2.	Técnicas de IRM utilizadas no diagnóstico e pesquisa da EM	27
A)	Técnicas para detecção de lesões macroscópicas ou placas desmielinizantes	28
B)	Técnicas para avaliação das alterações biomoleculares e metabólicas no tecido cerebral na EM	33
C)	A imagem por tensor de difusão (<i>DTI</i>) e a avaliação da microestrutura cerebral na EM	36
2	OBJETIVOS	51
3	MÉTODO	53
3.1	Caracterização do estudo	54
3.2	População do estudo	55
3.2.1.	Pacientes – Grupo EMRR	55
3.2.2.	Grupo Controle	56
3.3	Aquisição das imagens de RM	57
3.4	Pós-processamento das imagens <i>DTI</i>	58
3.5	Processamento e segmentação das imagens 3D ponderadas em T1	61
3.6	Segmentação das lesões hiperintensas em T2- <i>FLAIR</i>	63
3.7	Análise estatística dos dados de <i>DTI</i> e suas correlações com as variáveis da doença	64
3.8	Análise de grupo das características regionais da espessura cortical	65
4	RESULTADOS	68
4.1	Características clínicas e volumes lesionais	69

4.2	Características de <i>DTI</i> nos segmentos do CC nos grupos EMRR e controle.....	71
	A) Análise da diferença dos índices de <i>DTI</i> entre os grupos	71
	B) Correlação entre os parâmetros de <i>DTI</i> do CC e as cargas lesionais e parâmetros demográficos no grupo EMRR	73
	C) Correlação entre os parâmetros de <i>DTI</i> do CC, as cargas lesionais, idade e duração da doença e os escores da EDSS, no grupo EMRR	75
4.3	Diferenças regionais na espessura cortical entre os grupos EMRR e controle.....	82
	A) Análise da diferença das espessuras corticais entre os grupos	82
	B) Análise da correlação entre a espessura cortical e as cargas lesionais no grupo EMRR	84
	C) Análise da correlação entre a espessura cortical e os escores da EDSS e a duração da doença no grupo EMRR.....	87
5	DISCUSSÃO	90
5.1	As características de <i>DTI</i> no corpo caloso nos pacientes com EMRR	91
5.2	As características e a distribuição espacial da atrofia cortical nos pacientes com EMRR	102
5.3	A relação entre as áreas de atrofia cortical e os sinais de acometimento da substância branca do corpo caloso por <i>DTI</i>	107
5.4	Limitações do estudo e perspectivas futuras	113
6.	CONCLUSÃO	117
7.	ANEXOS	119
	ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	120
	ANEXO B – ESCALA EXPANDIDA DO ESTADO DE INCAPACIDADE (ou <i>Expanded Disability Status Scale – EDSS</i>)	125
	ANEXO C – SUBESCORES DOS SISTEMAS FUNCIONAIS (<i>Functional Systems Scale - FSS</i>)	126
	ANEXO D – Distribuição dos resultados dos escores das escalas funcionais, duração da doença e gênero na amostra de pacientes EMRR	129
	ANEXO E – Resultados de <i>DTI</i> nos cinco segmentos do CC.....	130
8.	REFERÊNCIAS.....	144
	APÊNDICE – Publicação na revista Multiple Sclerosis International	180

Listas

Abreviaturas

anti-PBM	– anticorpo antiproteína básica da mielina
anti-GOM	– anticorpo antigliproteína oligodendrocítica da mielina
CC	– corpo caloso
CC1	– rostro e joelho do corpo caloso
CC2	– tronco médio anterior do corpo caloso
CC3	– tronco médio posterior do corpo caloso
CC4	– istmo do corpo caloso
CC5	– esplênio do corpo caloso
CDA	– coeficiente de difusão aparente
Co	– colina
Cr	– creatina
2D	– bidimensional
3D	– tridimensional
DD	– duração da doença
<i>DIR</i>	– <i>Double inversion recovery</i>
<i>DIS</i>	– <i>dissemination in space</i>
<i>DIT</i>	– <i>dissemination in time</i>
DM	– difusividade média
<i>DT</i>	– <i>diffusion tensor</i>
<i>DTI</i>	– <i>diffusion tensor imaging</i>
DVIS	– doença vascular isquêmica subcortical
<i>EDSS</i>	– <i>Expanded Disability Status Scale</i>
EM	– esclerose múltipla
EMDA	– encefalomielite disseminada aguda
EMPP	– esclerose múltipla primariamente progressiva

EMRR	– esclerose múltipla remitente recorrente
EMSP	– esclerose múltipla secundariamente progressiva
FA	– fração de anisotropia
<i>FLAIR</i>	– <i>fluid attenuated inversion recovery</i>
<i>FOV</i>	– <i>field of view</i>
<i>FSS</i>	– <i>functional systems scale</i>
GC	– Grupo Controle
<i>GLM</i>	– <i>general linear modeling</i>
Lac	– lactato
Lip	– lipídio
LCR	– líquido cefalorraquidiano
ml	– mioinositol
Naa	– N-acetil aspartato
ppm	– partes por milhão
IRM	– imagem por ressonância magnética
<i>QDEC</i>	– <i>query, design, estimate, contrast</i>
rf	– radiofrequência
RM	– ressonância magnética
SBAN	– substância branca aparentemente normal
SCAN	– substância cinzenta aparentemente normal
SCI	– síndrome clínica isolada
SNC	– sistema nervoso central
T	– Tesla
TD	– Tensor de difusão
TE	– tempo de eco
TM	– transferência de magnetização
TR	– tempo de repetição

Símbolos

λ_1	– autovalor principal
λ_2	– autovalor secundário
λ_3	– autovalor terciário
$\lambda_{ }$	– difusividade axial
$\lambda_{\perp}$	– difusividade radial

Figuras

Figura 1 -	Placas lesionais na EM, demonstrando alto sinal em sequência ponderada em T2.....	4
Figura 2 -	Placas lesionais na EM, demonstrando baixo sinal em sequência ponderada em T1	5
Figura 3 -	Quatro compartimentos do SNC típicos da EM.....	18
Figura 4 -	Lesão justacortical em paciente com EM	19
Figura 5 -	Imagem sagital ponderada em T2- <i>FLAIR</i> de paciente com esclerose múltipla remitente-recorrente, focalizada no corpo caloso	29
Figura 6 -	Apresentação de lesão cavitada nas sequências T2, T1 e T2- <i>FLAIR</i>	30
Figura 7 -	Sequência <i>spin</i> -eco de aquisição de imagens por RM com ponderação em difusão	39
Figura 8 -	Representação gráfica elipsoidal do tensor de difusão em cérebro de indivíduo jovem saudável	44
Figura 9 -	Mapas de fração de anisotropia (FA) e difusividade média (DM) em indivíduo com esclerose múltipla remitente recorrente	47
Figura 10 -	Tratografia dos cinco segmentos do corpo caloso em um controle saudável	60
Figura 11 -	Áreas de atrofia cortical significativa no grupo EMRR em relação ao grupo controle (GC)	83

Figura 12 - Áreas de correlação entre as cargas lesionais T1 e a espessura cortical no grupo EMRR	84
Figura 13 - Áreas de correlação entre as cargas lesionais T2- <i>FLAIR</i> e a espessura cortical no grupo EMRR	86
Figura 14 - Correlação entre os escores da <i>EDSS</i> e a espessura cortical no grupo EMRR	87

Quadros

Quadro 1 -	Primeiros critérios diagnósticos de positividade na IRM.....	16
Quadro 2 -	Critérios de Barkhof e Tintore.....	17
Quadro 3 -	Evolução dos critérios de <i>DIS</i> e <i>DIT</i>	22
Quadro 4 -	Critérios de McDonald (2010) definidores de <i>DIS</i> na imagem por RM.....	24
Quadro 5 -	Critérios de McDonald (2010) definidores de <i>DIT</i> na imagem por RM.....	25
Quadro 6 -	Projeção setorizada das fibras do corpo caloso	60

Tabelas

Tabela 1 -	Escores clínicos / escalas de déficit	69
Tabela 2 -	Características de <i>DTI</i> no CC nos grupos EMRR e controle.....	72
Tabela 3 -	Correlação entre os parâmetros de <i>DTI</i> de cada segmento do CC, as cargas lesionais, as idades e a duração da doença nos pacientes com EMRR	74
Tabela 4 -	Regressão linear multivariada, utilizando o <i>EDSS</i> como variável dependente e as cargas lesionais como covariáveis independentes	75
Tabela 5 -	Regressão linear multivariada, utilizando o <i>EDSS</i> como variável dependente, e a idade e duração da doença como covariáveis independentes	76
Tabela 6 -	Regressão linear multivariada, utilizando o <i>EDSS</i> , como variável dependente, e os resultados regionais de difusividade axial como covariáveis independentes	77
Tabela 7 -	Regressão linear multivariada, utilizando o <i>EDSS</i> como variável dependente, e os resultados regionais de difusividade radial como covariáveis independentes.....	78
Tabela 8 -	Regressão linear simples, utilizando o <i>EDSS</i> como variável dependente, e os resultados regionais de difusividade radial de CC3 como covariável independente.....	79
Tabela 9 -	Regressão linear multivariada, utilizando o <i>EDSS</i> , como variável dependente, e os resultados regionais de fração de anisotropia como covariáveis independentes.....	80

Tabela 10 - Regressão linear multivariada, utilizando o <i>EDSS</i> , como variável dependente, e os resultados regionais de difusividade média como covariáveis independentes.....	81
Tabela 11 - Espessuras corticais médias nos grupos EMRR e GC.....	82
Tabela 12 - Médias das espessuras corticais nas áreas de atrofia significativa no grupo EMRR	89

Resumo

Rimkus CM. *As características microestruturais do tecido neural e o grau de atrofia cortical nos estágios iniciais da esclerose múltipla remitente-recorrente* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012. 179p.

Introdução: Os processos degenerativos vêm sendo considerados determinantes da progressão do déficit neurológico na esclerose múltipla (EM) e são associados sobretudo à perda neuronal e axonal. A patologia na substância branca (SB) manifesta-se pela quebra de membranas e perda da complexidade microestrutural dos tratos cerebrais, o que pode ser estudado indiretamente pelas alterações nos índices de fração de anisotropia (FA) e difusividade média (DM), obtidos por meio das análises das imagens por tensores de difusão (*diffusion tensor imaging* - *DTI*). Essa técnica oferece outros dois índices mais específicos, a difusividade axial ($\lambda_{||}$) e difusividade radial ($\lambda_{\perp}$), que são associados aos processos de perda axonal e desmielinização, respectivamente. A perda neuronal na substância cinzenta (SC) pode ser avaliada pelo grau de atrofia do córtex cerebral. Este estudo tem como objetivos mensurar os índices de *DTI* na maior comissura cerebral, o corpo caloso (CC), e o grau e distribuição da atrofia cortical em indivíduos com EM remitente-recorrente (EMRR) e baixos escores de incapacidade funcional, correlacionando essas alterações com o volume de lesões macroscópicas e os principais parâmetros clínicos. **Método:** 31 indivíduos (22 mulheres, idade média 30,5 anos $\pm$ 8,7) com EMRR e um grupo controle (GC) composto por 34 indivíduos saudáveis (27 mulheres, idade média 32,3 anos $\pm$ 7,8) realizaram exames de crânio em aparelho de ressonância magnética de 3 Tesla (3T), sendo adquiridas imagens de *DTI* com 32 direções de gradiente, obtendo-se os índices de FA, DM, $\lambda_{||}$ e $\lambda_{\perp}$ de cinco segmentos na secção sagital do corpo caloso (CC). Através da segmentação de imagens volumétricas ponderadas em T1 foram obtidas as espessuras corticais regionais nos grupos. Esses resultados foram correlacionados com os volumes lesionais de imagens ponderadas em T1 e T2/FLAIR e os escores da escala expandida do estado de incapacidade (*Expanded Disability Status Scale* - *EDSS*), considerando-se significativos resultados com $p < 0,05$. **Resultados:** Os índices de FA, DM e $\lambda_{\perp}$ do CC estavam difusamente alterados no grupo EMRR e a $\lambda_{||}$, alterada significativamente no esplênio, tronco médio anterior e tronco médio posterior do CC. Observou-se atrofia cortical significativa no terço anterior dos lobos temporais, bilateralmente, e nas regiões parietal inferior, insular e fronto-orbitária direitas, com uma tendência à atrofia no giro frontal superior

esquerdo. As FA, DM e $\lambda_{\perp}$ correlacionaram-se com os volumes lesionais T1 e, mais significativamente, com os volumes lesionais T2/FLAIR, porém não houve correlação entre os volumes lesionais e a $\lambda_{\parallel}$. A espessura cortical no grupo EMRR apresentou correlações com ambos os volumes lesionais, mais significativamente com as lesões em T1. O escore médio da *EDSS* era $1,1 \pm 0,9$ (variando de 0-3), apresentando correlações com a DM e a $\lambda_{\parallel}$ no esplênio, tronco médio anterior e posterior do CC, com uma correlação com a $\lambda_{\perp}$ no tronco médio posterior. O *EDSS* correlacionou-se com a espessura cortical na topografia do giro frontal superior esquerdo. **Discussão e conclusão:** Houve alteração difusa nos índices de FA, DM e $\lambda_{\perp}$ nos segmentos do CC, com acometimento mais localizado, predominantemente médio posterior, da $\lambda_{\parallel}$, o que pode sugerir desmielinização difusa do CC, porém axonopatia ou degeneração mais acentuada em algumas regiões da SB. A atrofia cortical também apresentou uma distribuição regional característica, afetando sobretudo as regiões temporais, bilateralmente, parietal inferior, insular e fronto-orbitária direitas. As correlações encontradas entre os índices de *DTI* e a espessura cortical e os volumes lesionais demonstraram que, ao menos em parte, as degenerações das SB e SC podem ser relacionadas à degeneração Walleriana, secundária ao acúmulo de placas lesionais. As correlações entre a DM, $\lambda_{\parallel}$ de alguns segmentos do CC e a espessura cortical do giro frontal superior com os escores da *EDSS* favoreceram à hipótese de que a degeneração tecidual na EM foi um fator preponderante na progressão do déficit neurológico na EMRR.

Descritores: Esclerose Múltipla; Imagem por Ressonância Magnética; Imagem de Tensor de Difusão; Degeneração neural; Bainha de Mielina

Summary

Rimkus CM. *The microstructural changes in the neural tissue and the degree of cortical atrophy in the initial stages of relapsing remitting multiple sclerosis* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2012. 179p.

Introduction: The degenerative processes are gaining attention as predictors of the neurological deficit in multiple sclerosis (MS), being reflected by the degree of axon loss and central nervous system atrophy. The white matter pathology (WM) is characterized by cellular membranes disruption and loss of the microstructural complexity, which can be accessed by the diffusion tensor imaging (DTI) indices of fractional anisotropy (FA) and mean diffusivity (MD). This imaging technique also offers two more specific indices: the axial diffusivity ($\lambda_{||}$) and radial diffusivity ($\lambda_{\perp}$), which are useful to differentiate between axon loss and demyelination, respectively. The gray matter (GM) neuronal loss can be accessed by the degree of cortical atrophy. The aim of this study is to measure the DTI indices in the greatest WM commissure, the corpus callosum (CC), and the degree and distribution of cortical atrophy in patients with relapsing remitting MS (RRMS) and low disability scores, correlating them to the macroscopic lesion load and the main clinical scores. **Method:** 31 RRMS patients (22 women, mean age 30.5 years $\pm$ 8.7) and 34 healthy control (HC) subjects (27 women, mean age 32.3 years $\pm$ 7.8) were submitted to brain examinations in a 3T magnetic resonance image scanner. From DTI with 32 gradient encoding directions were extracted the indices of FA, MD, $\lambda_{||}$ and $\lambda_{\perp}$, which were measured in 5 segments of the mid-sagittal section of the corpus callosum (CC). The cortical thickness was obtained from the segmentation of volumetric T1 images. These results were correlated with the macroscopic lesion loads in the T1 and T2/FLAIR images and the scores in the Expanded Disability Status Scale – EDSS, considering significant the results with $p < 0.05$. **Results:** The FA, MD and $\lambda_{\perp}$ were diffusively abnormal in all 5 segments of the CC in the RRMS group and the $\lambda_{||}$ was abnormal only in the splenium, anterior mid-body and posterior mid-body. The anterior area of the both temporal lobes and right inferior parietal, some orbital-frontal and insular regions showed significant atrophy, with a tendency of atrophy in the superior frontal gyrus. The FA, MD and $\lambda_{\perp}$ correlated with the T1 lesion load and, more significantly, with the T2/FLAIR lesion load. The cortical thickness correlated with T1 and T2/FLAIR lesion loads, more significantly with the T1 lesion load. The mean EDSS in the RRMS group was 1.1 ± 0.9 (range 0-3), correlating with the MD and $\lambda_{||}$ of the splenium, anterior and posterior mid-body of the CC. The EDSS

correlated to cortical thickness in the topography of the superior frontal gyrus.

Discussion and conclusion: The FA, MD and $\lambda_{\perp}$ are diffusively abnormal in the CC, with abnormalities in the $\lambda_{||}$, restricted to the medial and posterior segments. These results can be interpreted as signs of diffuse demyelination in the CC and a predominance of axonopathy or more advanced degeneration in some segments. The cortical atrophy also followed a characteristic regional distribution, affecting predominantly the bilateral temporal lobes, and inferior parietal, orbital-frontal and insular regions, in the right hemisphere. The correlations found between the DTI indices and the cortical thickness and the macroscopic lesion loads show that, at least partially, the WM and GM degeneration can be related to Wallerian degeneration secondary to macroscopic lesion accumulation. The correlations between the DM, $\lambda_{||}$, in some of the CC segments, and cortical thickness, in the superior frontal gyrus, and the EDSS scores reinforces the hypothesis that the degenerative processes in MS can play a role in the disability status of the patients.

Descriptors: Multiple Sclerosis; Magnetic Resonance Imaging; Diffusion Tensor Imaging; Nerve Degeneration; Myelin sheath

1 Introdução

A esclerose múltipla (EM) é a doença desmielinizante adquirida mais frequente, com uma incidência de cerca de 3-4 / 100.000 indivíduos, sendo mais prevalente em mulheres, com uma razão estimada de 2,3:1 entre os gêneros feminino e masculino¹. Inicialmente, a EM possuía uma incidência muito mais elevada na Europa e América do Norte, sendo classificada como uma doença das regiões de altas latitudes, ou seja, com uma distribuição mais afastada da linha do Equador. Mas, de 1980 aos anos 2000, nota-se um crescimento na incidência da EM em países de menor latitude, próximos às zonas tropicais, possivelmente em consequência de variações nas características genéticas das populações, correntes migratórias ou na disseminação de possíveis fatores de risco ambientais, como agentes infecciosos¹.

A EM é uma doença inflamatória crônica do sistema nervoso central (SNC) de etiologia desconhecida, provavelmente autoimune, associada a uma série de eventos mielinoclásticos^{2, 3}. Patologicamente, observa-se a presença de infiltrados inflamatórios nos espaços perivenulares do SNC, acometendo tanto as regiões encefálicas supra e infratentoriais, bem como a medula espinhal^{4, 5}. Nas áreas com agressão tecidual mais crítica, há significativa morte de oligodendrócitos e desmielinização, com presença de macrófagos e astrócitos reacionais e altas concentrações de linfócitos T e B. Dependendo da fase evolutiva e da agressividade da lesão, notam-se áreas

de remielinização, com regeneração tecidual heterogênea, ou formação de cicatriz glial ³.

O caráter autoimune da doença é sugerido pela presença de anticorpos, proteínas do sistema complemento e citocinas nos espaços perivasculares ³. Uma variedade de autoanticorpos foi isolada nas formas humanas e nos modelos experimentais da EM, sendo mais frequentes os anticorpos antiproteína básica da mielina (anti-PBM) e antiglicoproteína oligodendrocítica da mielina (anti-GOM) ⁶⁻⁸.

A característica primariamente inflamatória da EM determina sua apresentação macroscópica clássica, que se caracteriza pela formação de lesões alongadas na substância branca, distribuídas nos espaços perivenulares e apresentando uma hidratação tecidual maior que o tecido adjacente, o que é secundário, tanto à infiltração inflamatória e edema local como à destruição das membranas celulares, determinando consequente aumento na concentração de água livre e solubilização das moléculas de proteína e outros resíduos celulares ^{9, 10}. Essas alterações focais da composição tecidual são facilmente identificadas nos exames de imagem por ressonância magnética (IRM), manifestando-se como focos de alto sinal nas sequências ponderadas em T2, sendo também denominadas placas desmielinizantes ou placas lesionais ⁵ (Figura 1). O grau de edema da placa lesional pode determinar a presença de baixo sinal nas sequências ponderadas em T1 (Figura 2), e quanto maior a hidratação lesional maiores serão a frequência e a intensidade do hipossinal nessa ponderação, o que é

observado tanto nas lesões agudas com intensa atividade inflamatória como em lesões crônicas com maior destruição tecidual ou cavitação ¹¹.

Figura 1 - Placas lesionais na EM, demonstrando alto sinal em sequência ponderada em T2. Corte coronal de IRM de paciente com EM, observando-se múltiplas lesões com alto sinal na sequência ponderada em T2 (setas) localizadas na substância branca encefálica

Figura 2 - Placas lesionais na EM, demonstrando baixo sinal em sequência ponderada em T1. Corte coronal de IRM de paciente com EM, observando-se múltiplas lesões com baixo sinal na sequência ponderada em T1 (setas), algumas delas alongadas e com orientação perpendicular à superfície ependimária, sugerindo localização adjacente às veias subependimárias.

A forma clínica mais comum, a forma remitente-recorrente (EMRR), é caracterizada por exacerbações e remissões recorrentes de sintomas neurológicos. A cada exacerbação há surgimento de novas lesões desmielinizantes, que podem permanecer após a resolução do quadro agudo, reduzir ou desaparecer depois de algumas semanas ou meses, com normalização do sinal tecidual ^{5, 11}. Embora essa dinâmica de surgimento, cicatrização e acúmulo de desmielinização sejam característicos da doença,

determinando a maior parte de seus parâmetros clínicos e diagnósticos e, muitas vezes, dependendo da localização e agressividade das novas lesões, serem responsáveis pela sintomatologia e síndrome clínica aguda, o simples aumento do volume de placas desmielinizantes não explica totalmente a disfunção neurológica a longo prazo nos pacientes com EM ^{12, 13}.

Existe uma tendência ao acúmulo de sintomas neurológicos ou remissão parcial do déficit após cada exacerbação clínica. Depois de alguns anos de doença, a maior parte dos pacientes com EMRR será classificada em um outro subtipo da doença, a forma secundariamente progressiva (EMSP), na qual existe uma progressão significativa da disfunção neurológica entre os períodos de exacerbação, não relacionada diretamente à frequência ou gravidade dos surtos nessa fase ¹⁴. A taxa média de conversão da forma EMRR para a EMSP é de cerca de 2,5% ao ano, com um tempo médio de 8 a 20 anos para a conversão nos indivíduos dessa população ^{14, 15}. Essa progressão da doença levantou a hipótese de que a EM não é apenas uma doença inflamatória e desmielinizante, mas, que uma série de processos degenerativos do SNC são concomitantes e, possivelmente, interdependentes, participando de seu processo evolutivo.

Por muitos anos, a disfunção clínica ou neurológica foi atribuída diretamente à lesão e afilamento da bainha de mielina, levando à redução da velocidade de condução neural ¹⁶. Valorizava-se a desmielinização como processo patológico preponderante na EM. De acordo com esse modelo, a perda neuronal na EMRR, especialmente nos estágios iniciais, possuía uma importância secundária dentro da evolução da doença. Desde os primeiros

estudos histológicos da EM, a presença de certo grau de perda axonal nas placas lesionais era reconhecida, porém associada apenas às lesões de maior agressividade ou à cronicidade das mesmas ². Estudos mais recentes vêm demonstrando que a perda axonal pode ser observada nas lesões agudas e detectadas desde os primeiros eventos desmielinizantes ^{17, 18}.

Além do envolvimento e importância de outros processos patológicos, como a perda axonal, na evolução da EM, as pesquisas atuais demonstram que os processos de desmielinização, inflamação e degeneração tecidual não são restritos às placas macroscópicas. A análise microscópica de amostras teciduais de seres humanos e modelos animais experimentais da EM demonstrou altas concentrações de células inflamatórias no tecido cerebral aparentemente normal, semelhantes às observadas nas placas lesionais ¹⁹. Similarmente, estudos com técnicas avançadas de IRM, como espectroscopia de prótons, transferência de magnetização e imagens por tensores de difusão (do inglês, *diffusion tensor imaging – DTI*), demonstram evidências de desmielinização e perda neuronal no tecido cerebral aparentemente normal, seja na substância branca (SBAN) ou na substância cinzenta (SCAN) aparentemente normais ²⁰⁻²⁴.

As imagens estruturais convencionais de ressonância magnética (RM), ponderadas em T1 e T2, são relativamente sensíveis para a detecção das lesões macroscópicas da EM e são amplamente utilizadas no diagnóstico e acompanhamento clínico da doença. Mas, conforme citado anteriormente, a presença das variações focais nessas aquisições estão associadas, principalmente, ao grau de hidratação local do tecido, sendo

inespecíficas para a diferenciação dos processos patológicos associados, como edema, inflamação, demielinização, gliose ou perda axonal ¹². Além disso, as imagens convencionais não são sensíveis à detecção de lesões e alterações bioquímicas e microestruturais nas placas lesionais, bem como no tecido cerebral aparentemente normal, o que tem sido relacionado à sua baixa ou moderada correlação com a progressão do déficit neurológico na EM ^{12, 13}.

O acúmulo e o surgimento de placas lesionais são indubitavelmente sinais de atividade patológica, porém, com os recentes achados de outros importantes processos patológicos na evolução da doença, alguns conceitos têm sido modificados no estudo da EM. Atualmente, valoriza-se as perdas axonal e neuronal, ou seja, os processos degenerativos, como fatores predominantes na progressão do déficit neurológico crônico ^{23, 25, 26}. A atrofia cerebral, seja ela cortical ou da substância branca, tem sido caracterizada como o resultado final das agressões crônicas e da degeneração tecidual. E, da mesma maneira que se observam sinais de perdas axonal e neuronal desde os estágios iniciais da EM ^{17, 23}, tem-se demonstrado que a redução volumétrica do tecido cerebral inicia-se mais precocemente do que o postulado anteriormente, possuindo um impacto importante na instalação e permanência de déficits neurológicos e cognitivos ²⁷⁻²⁹.

Na EM, a patologia neuronal pode ser estudada tanto na substância branca, avaliando-se os sinais de alterações microestruturais relacionados aos axônios, como na substância cinzenta, avaliando-se sinais de perda tecidual nos compartimentos com maior concentração de neurônios, como o

córtex e a substância cinzenta profunda. Como as sequências convencionais de IRM não oferecem índices objetivos para a detecção e quantificação dessas condições, outras técnicas de aquisição e processamento de imagens devem ser estudadas e utilizadas.

A *DTI* é uma técnica que vem sendo empregada para extrair informações qualitativas e quantitativas a respeito da microestrutura tecidual³⁰⁻³². A água é a molécula mais abundante nas células e tecidos vivos, apresentando características de difusão particulares entre as membranas celulares e os diversos compartimentos macroscópicos e microscópicos dos organismos. Em compartimentos livres de barreiras, as moléculas de água movimentam-se de modo isotrópico ou aleatório, porém, nos tecidos corporais, as membranas celulares e a compartimentalização dos tecidos fazem com que a difusão da água seja orientada de acordo com essas barreiras microestruturais, resultando em uma difusão anisotrópica^{33, 34}. A quantidade de água livre no tecido determina a amplitude do sinal da difusão, resultando em um coeficiente mensurável por RM, o coeficiente de difusão aparente (CDA) ou a difusividade média (DM)^{35, 36}. Dessa maneira, os índices de fração de anisotropia (FA) e DM oferecem informações sobre a concentração de membranas celulares, o grau de organização tecidual e a concentração de água livre nos tecidos. O espaço do tensor de difusão é tridimensional, como a maior parte das estruturas por ele avaliadas. Portanto, os valores de difusão são quantificados nos três principais vetores de uma matriz tridimensional (x, y e z) que, na convenção dos estudos de *DTI*, são chamados de autovalores ou *eigenvalues*: λ_1 , λ_2 e λ_3 . Os índices

de FA e DM podem ser utilizados na quantificação indireta de perda de membranas celulares, porém são inespecíficos para a diferenciação entre lesão de mielina ou perda axonal. Por meio da combinação dos autovalores do tensor de difusão, são obtidos outros dois índices quantitativos: a difusividade axial ($\lambda_{||}$) e a difusividade radial ($\lambda_{\perp}$). Por razões que serão discutidas mais à frente neste estudo, esses índices têm-se demonstrado úteis na discriminação entre lesão axonal e desmielinização, respectivamente^{31, 32, 37}.

Embora seja possível a quantificação de cada um desses índices de *DTI* tanto na substância cinzenta como na substância branca, as suas variações, sobretudo da FA e dos índices vetoriais, apresentam maior correspondência com a patologia da substância branca, visto que sua microestrutura é mais compacta e com uma maior organização direcional³⁵. Nos estudos de *DTI*, a escolha da região de estudo é fundamental para a elaboração de uma hipótese sólida e para obtenção de resultados consistentes. No tecido cerebral, algumas áreas de tecido normal, não patológico, podem apresentar oscilações dos índices de anisotropia decorrentes do cruzamento e mudança na orientação das fibras de substância branca. Por isso, diversos estudos escolhem avaliar tratos mais compactos e com menor cruzamento de suas fibras principais com outros tratos, como o trato corticoespinhal ou o corpo caloso (CC)³⁸⁻⁴⁰.

No estudo de doenças com acometimento encefálico difuso, como a EM, o CC demonstra outras vantagens, apresentando uma ampla conexão cortical com todos os lobos cerebrais, com uma representação somatotópica

e funcional específica⁴¹⁻⁴³. Ele constitui a maior e mais compacta comissura cerebral, sendo responsável pela maior rede de comunicação inter-hemisférica do SNC^{44, 45}. Apesar de sua aparência macroscópica homogênea, apresenta diferenças regionais na espessura, concentração e grau de mielinização de suas fibras⁴⁶⁻⁴⁹, o que pode estar relacionado a uma sensibilidade e comportamento variável às agressões patológicas em seus segmentos.

Outra maneira de estudar a patologia neuronal na EM é acessando a perda tecidual do córtex cerebral. As medidas mais comuns de atrofia da substância cinzenta cortical são as estimativas de volume^{50, 51} e espessura^{52, 53} desse compartimento cerebral. A avaliação da espessura cortical é vantajosa por apresentar uma menor influência do volume intracraniano e das diferenças interpessoais nos tamanhos cerebrais. As medidas volumétricas necessitam ser normalizadas pelos volumes cerebrais ou intracranianos⁵¹, o que não acontece com as medidas de espessura.

Há evidências de que a atrofia cortical na EM é precoce e não homogênea, existindo uma predileção para algumas áreas corticais em cada estágio evolutivo da doença⁵². Mas há controvérsias em relação às áreas predominantemente afetadas em cada fase da doença⁵²⁻⁵⁴ e como essas alterações correlacionam-se com o acometimento da substância branca^{51-53, 55, 56}. A maior parte desses estudos analisou a correlação entre o grau de atrofia cortical com as lesões macroscópicas na EM. A análise da correlação entre o afilamento cortical e as alterações microscópicas da substância branca é recente, e alguns estudos com esse enfoque utilizaram poucos

pacientes ou estudaram apenas áreas corticais restritas, como o trato corticoespinhal ⁵⁷.

Portanto, este estudo propõe-se avaliar as características microestruturais de cinco segmentos do CC em pacientes com EMRR e o grau e a distribuição do afilamento cortical nesses indivíduos. Seu objetivo é avaliar se existe uma correspondência regional entre desorganização microestrutural, sobretudo dos sinais indiretos de perda axonal e atrofia cortical, e como esses achados correlacionam-se com as lesões macroscópicas e o grau de disfunção neurológica nesses indivíduos.

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1.1 A aplicação da ressonância magnética no diagnóstico da EM

A IRM é o teste paraclínico que, isoladamente, possui grande sensibilidade e especificidade no diagnóstico da EM. Sua inclusão como ferramenta auxiliar nos critérios diagnósticos da EM foi proposta por Poser *et al.* ⁵⁸, juntamente com outros testes paraclínicos, como os potenciais evocados, visual e sensorial ^{59, 60}, e a pesquisa de anticorpos oligoclonais no líquido cefalorraquidiano (LCR) ⁶¹.

Dos testes paraclínicos utilizados na EM, a IRM demonstrou a maior sensibilidade e especificidade, apresentando o maior peso nos critérios de Poser. Diante dessa observação, diversos estudos iniciaram a pesquisa de

critérios de IRM com maior valor preditivo de positividade para EM. Paty *et al.*⁶² elaboraram um critério de imagem com alta sensibilidade, preenchendo o critério de positividade em cerca de 95% dos indivíduos com EM clinicamente definida. Esse critério foi aplicado a pacientes com síndrome clínica isolada (SCI), sugerindo o diagnóstico de EM pela presença de pelo menos quatro lesões com dimensões maiores que 3 mm em um dos eixos ou três lesões, sendo uma delas periventricular. Mas esse método recebeu algumas críticas em razão de sua baixa especificidade, atingindo no máximo 57% no seguimento evolutivo dos indivíduos com primeiro episódio de SCI⁶³.

Concomitantemente ao estudo de Paty *et al.*⁶², Fazekas *et al.*⁶⁴ tentaram aumentar a especificidade da IRM acrescentando uma discriminação mais detalhada da distribuição espacial das lesões e dando maior peso a placas lesionais maiores com, pelo menos, 6 mm em um dos eixos, na contabilização das lesões típicas da EM. O critério foi baseado em um estudo retrospectivo testando a acurácia do método na diferenciação de lesões hiperintensas em T2 entre pacientes com EM definida e as encontradas no envelhecimento normal, demonstrando, inicialmente, alta sensibilidade e especificidade. Entretanto, estudos posteriores demonstraram achados contraditórios a esse método, observando um desempenho menos satisfatório na avaliação prospectiva e detecção de EM em indivíduos com SCI⁶⁵.

Outros estudos ativeram-se à observação de características morfológicas e topográficas típicas da EM. Horowitz *et al.*⁶⁶ observaram

uma alta prevalência de lesões ovoides nos pacientes com EM, sugerindo sua presença como um marcador sensível da doença. Outro estudo da época demonstrou um alto valor preditivo de EM diante da presença de lesões occipitais e temporais ⁶⁷. No entanto, embora ambos os achados tenham sido descritos como marcadores satisfatórios de lesões típicas da EM, eles foram baseados em estudos retrospectivos, analisando apenas pacientes com a doença clínica definida, não sendo possível avaliar a acurácia dos mesmos.

Um dos tipos de lesão que, isoladamente, apresenta alta correlação com o diagnóstico de EM são as do CC, mais especificamente as lesões na interface caloso-septal, possuindo uma especificidade de até 98% na diferenciação, por IRM, entre pacientes com EM e indivíduos com focos hiperintensos em T2 na substância branca por outras etiologias ⁶⁸.

As lesões desmielinizantes em fase inflamatória aguda tendem a apresentar realce após a administração endovenosa de contraste paramagnético, o gadolínio ⁶⁹. Diferentemente de outras patologias desmielinizantes comuns, como a encefalomielite disseminada aguda (EMDA), a EM possui um caráter crônico e recorrente, com o surgimento de novas lesões e a presença de lesões em estágios evolutivos diferentes. Devido a essa característica, especulou-se que a presença simultânea de lesões com e sem realce após a injeção do gadolínio seria um sinal de disseminação da doença no tempo, possuindo valor no estabelecimento do diagnóstico ⁶⁵.

O resumo dos primeiros critérios de IRM está representado no Quadro 1. Esses primeiros estudos representaram um grande avanço na descrição não invasiva da distribuição e forma mais comum das lesões desmielinizantes, porém nenhum desses critérios possuía, isoladamente, uma sensibilidade ou especificidade ideal. No fim da década de 1990, duas revisões desses critérios culminaram na descrição de um critério unificado dos achados de IRM na EM, descritas nos trabalhos de Barkhof *et al.*⁵ e Tintoré *et al.*⁷⁰ (Quadro 2), sendo consideradas um grande avanço na avaliação dos casos clínicos suspeitos de EM.

Quadro 1 - Primeiros critérios diagnósticos de positividade na IRM

Critério	Definição	Sensibilidade	Especificidade
Paty et al. ⁶²	≥ 4 lesões, ou 3 lesões, sendo uma periventricular	94%	57%
Fazekas et al. ⁶⁴	≥ 3 lesões com pelo menos 2 das características abaixo: <ul style="list-style-type: none">• 1 lesão infratentorial• 1 lesão periventricular• 1 lesão com diâmetro >6 mm	88%	100%
Lesões ovóides ⁶⁶	Presença de lesões ovóides, com aspecto alongado, apresentando o maior eixo significativamente maior que o menor eixo	86%	N.A.
Realce pelo gadolínio ⁶⁵	≥ 1 lesão com realce após a injeção do gadolínio e ≥ 1 lesão sem realce	59%	98%
Anormalidades na interface caloso-septal ⁶⁸	Pelo menos 1 lesão na interface caloso-septal	93%	98%

Quadro adaptado de Barkhof *et al.*, 1997 ⁵

N.A.: Não aplicável. O estudo utilizado para a definição era retrospectivo, avaliando as imagens de pacientes com esclerose múltipla já definida, não tendo sido realizada a comparação entre grupos com diferentes patologias ou com alterações dentro do espectro da normalidade. Portanto, não foi avaliada a especificidade do método.

Quadro 2 - Critérios de Barkhof e Tintore

Preencher 3 dos 4 critérios:

- 1 lesão com realce ou 9 lesões com hipersinal em T2
- Pelo menos 1 lesão infratentorial ou medular
- Pelo menos 1 lesão justacortical
- Pelo menos 1 lesão periventricular

Observações:

- Uma lesão medular com realce é equivalente a uma lesão cerebral com realce;
- Lesões medulares com hipersinal em T2 são contabilizadas com as lesões dos demais compartimentos para atingir o número total;
- Nos subtipos de EM com manifestação medular, em indivíduos de origem asiática ou latino-americana, a utilização de uma lesão medular como lesão justacortical pode aumentar a sensibilidade do diagnóstico.

Quadro adaptado de Barkhof *et al.*, 1997 ⁵ e Tintore *et al.*, 2000 ⁷⁰

Nesse critério, foram estabelecidos objetivamente os quatro compartimentos do SNC típicos da EM: periventricular, justacortical, infratentorial e medular (Figura 3). As lesões periventriculares e justacorticais são exemplos típicos de lesões em espaços perivenulares bem conhecidos: o plexo subependimário e ao redor das vênulas transcorticais. A identificação e caracterização precisa de lesões justacorticais apresenta importante valor na diferenciação com outra patologia bastante comum da substância branca, a doença vascular isquêmica subcortical (DVIS) ou microangiopatia isquêmica, observada na degeneração senil, na hipertensão arterial e outras doenças sistêmicas com acometimento microarterial, que determina a formação de lacunas isquêmicas e desmielinização microangiopática ^{71, 72}. As lesões da microangiopatia isquêmica são distribuídas ao redor das arteríolas terminais e, embora algumas delas

sejam observadas em localização pericortical ou subcortical, raramente acometem o limite entre a substância branca e cinzenta. Já as lesões justacorticais encontradas na EM, pela sua distribuição perivenular, são caracterizadas por lesões que tocam o córtex, com acometimento das fibras em “U”⁵ (Figura 4).

Figura 3 - Quatro compartimentos do SNC típicos da EM. A: Visão localizada de corte axial ponderado em *fluid attenuated inversion recovery* (FLAIR), ilustrando lesões hiperintensas periventriculares (pontas de setas em A); B: Visão localizada de corte axial ponderado em *double inversion recovery* (DIR) com lesões justacorticais na porção opercular do lobo frontal direito (pontas de setas em B); Corte axial ponderado em T2-FLAIR demonstrando lesão infratentorial no hemisfério cerebelar direito (ponta de seta em C); D: Corte sagital ponderado em T1 após a injeção de gadolínio, ao nível da transição craniocervical, demonstrando lesão medular com realce (ponta de seta em D)

Figura 4 - Lesão justacortical em paciente com EM. Visão localizada de corte coronal ponderado em T2 onde se observa lesão com alto sinal localizada na interface entre a substância branca e cinzenta localizada na profundidade do sulco temporal superior direito (ponta de seta). Destaca-se a contiguidade da lesão com a profundidade do córtex local, o que caracteriza o acometimento na topografia das fibras em “U”

Juntamente com as lesões com realce ao gadolínio, as lesões justacorticais foram consideradas as mais específicas no estabelecimento do diagnóstico da EM ⁵. Um dos critérios anteriores mais utilizados no diagnóstico da EM, o critério de Paty *et al.* ⁶² possuía relativa baixa acurácia pela sua baixa especificidade. No intuito de aumentar a especificidade diagnóstica, Barkhof *et al.* ⁵ conferiram maior peso às lesões justacorticais e com realce ao gadolínio e propuseram a inclusão de maior número de lesões hiperintensas em T2 (nove) como critério de positividade. A inclusão

de lesões medulares e infratentoriais aumentava tanto a sensibilidade como a especificidade do método, visto que muitos pacientes iniciam o quadro clínico com síndromes medulares, cerebelares ou do tronco cerebral e também porque lesões concomitantes nos espaços supra e infratentoriais e medulares são menos comuns em outras patologias do SNC ⁵.

A EM é uma doença caracterizada pelo aparecimento de sintomas neurológicos em diversos sistemas funcionais, o que se manifesta nas imagens de RM através da disseminação de lesões em múltiplas localizações do SNC. Essa característica é definida nos critérios diagnósticos como disseminação no espaço (do inglês: *dissemination in space – DIS*). Mas, o outro caráter fundamental da doença é a recorrência de sintomas a sua migração para outros sistemas funcionais, definindo a disseminação no tempo (do inglês: *dissemination in time – DIT*). Os critérios de Barkhof e Tintoré ^{5, 70} são aplicados em um único exame de IRM e não são capazes de definir *DIT*. Após algumas modificações, eles foram incluídos nos primeiros critérios de McDonald *et al.* ⁷³, compondo os sinais de *DIS*. Nesses critérios, a *DIT* foi estabelecida pelo surgimento de uma lesão ativa, com realce ao gadolínio, três meses após o quadro inicial de SCI ou uma nova lesão hiperintensa em T2 em relação a uma IRM basal ⁷³. Esses critérios conferiam maior importância, com maior objetividade, aos achados de IRM que o critério anterior de Poser *et al.* ⁵⁸, demonstrando alta especificidade (91%). Entretanto, inúmeras críticas foram feitas à sua alta complexidade, com dificuldade de aplicação na prática clínica, e à sua baixa

sensibilidade (47%) ⁷⁴, o que poderia retardar o diagnóstico definitivo e o início de tratamento específico.

Em 2005, foi realizada a primeira revisão dos critérios de McDonald ⁷⁵, propondo-se a simplificação dos critérios de disseminação temporal, reduzindo-se o intervalo mínimo necessário, após o evento clínico inicial, para um novo exame de IRM com a evidência de uma nova imagem com alto sinal em T2 de três meses para trinta dias. A sensibilidade desse novo critério aumentou para 60% ⁷⁴.

Swanton *et al.* ⁷⁶ simplificaram ainda mais os critérios para definição de *DIS* e *DIT*, retirando as lesões com realce ao gadolínio do critério de *DIT* e definindo com *DIS* a presença de pelo menos uma lesão hiperintensa em T2 em apenas dois compartimentos do SNC definidores de EM. A sensibilidade desse método aumentou para 72%, porém não foi observado um grande impacto na especificidade, que caiu para cerca de 87%, um pouco mais baixa que os critérios de McDonald *et al.* de 2001 ⁷⁴. O resumo desses critérios está exposto no Quadro 3.

Quadro 3 - Evolução dos critérios de *DIS* e *DIT*

	DISSEMINAÇÃO ESPACIAL (<i>DIS</i>)	DISSEMINAÇÃO TEMPORAL (<i>DIT</i>)
McDonald 2001 ⁷³	<p>3 ou mais dos seguintes critérios:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 9 lesões cerebrais com alto sinal em T2 ou 1 lesão com realce ao gadolínio* • 3 ou mais lesões periventriculares • 1 ou mais justacortical • 1 ou mais infratentorial <p>* 1 lesão medular pode substituir uma lesão cerebral</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Uma lesão com realce ao gadolínio em um período maior ou igual a 3 meses do evento clínico inicial • Uma nova lesão com alto sinal em T2, em relação à uma imagem basal* <p>* realizada em intervalo inferior a 3 meses após o evento clínico inicial</p>
McDonald revisado 2005 ⁷⁵	<p>3 ou mais dos seguintes critérios:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 9 lesões com alto sinal em T2 ou 1 lesão com realce ao gadolínio* • 3 ou mais lesões periventriculares • 1 ou mais justacortical • 1 ou mais infratentorial ou medular <p>* Qualquer número de lesões medulares pode ser utilizado para a contagem total de lesões; uma lesão medular com realce ao gadolínio pode ser considerada como uma lesão cerebral com realce</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Uma lesão com realce ao gadolínio após 3 meses do evento clínico inicial • Uma nova lesão com alto sinal em T2, em relação à uma imagem basal* <p>* realizada em intervalo maior ou igual a 30 dias após o evento clínico inicial</p>
Swanton 2006 ⁷⁶	<ul style="list-style-type: none"> • 1 ou mais lesões em 2 ou mais compartimentos característicos do SNC: periventricular, justacortical, infratentorial e medular* <p>* Podem ser incluídas todas as lesões em sítios sintomáticos, exceto nas síndromes clínicas do tronco cerebral e medulares</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Uma nova lesão com alto sinal em T2, em qualquer tempo, independente do intervalo em relação à imagem inicial*

Quadro adaptado de Swanton *et al.*, 2007 ⁷⁴

Com o objetivo de agilizar o diagnóstico, Rovira *et al.* ⁷⁷ elaboraram uma estratégia diagnóstica baseada em um único exame de RM, na qual *DIT* foi definida pela presença simultânea de lesões com características evolutivas distintas, caracterizada pela deflagração de uma lesão com realce ao gadolínio concomitante a outras lesões com hipersinal em T2 e sem realce ao gadolínio.

A última revisão dos critérios de McDonald foi realizada em 2010 ⁷⁸, em Dublin, na reunião do comitê internacional para o diagnóstico da EM, levando em consideração os avanços conceituais das observações de Swanton *et al.* ⁷⁴, Rovira *et al.* ⁷⁷ e de Montalban e Tintore ⁷⁹. Nessa nova revisão, o diagnóstico pode ser definido já no evento clínico inicial, desde que a imagem de RM preencha os critérios de *DIS* e *DIT*. Caso não sejam definidas essas duas características no primeiro exame, aguarda-se até o primeiro evento que os caracterize (Esquema 1 e Quadros 4 e 5).

Esquema 1 - Organograma diagnóstico na esclerose múltipla, conforme a revisão de McDonald 2010

DIS: dissemination in space= disseminação no espaço; *DIT: dissemination in time*= disseminação no tempo; RM: ressonância magnética

Quadro 4 - Critérios de McDonald (2010) definidores de DIS na imagem por RM

Uma ou mais lesões hiperintensas em T2 em ao menos duas das áreas típicas de EM no SNC*:

- Periventricular
- Justacortical
- Infratentorial
- Medula espinhal**

Baseado na revisão de Swanton *et al.*, 2006 e 2007

*A presença ou ausência de realce após a injeção do gadolínio é indiferente

** No caso de síndrome clínica do tronco cerebral ou da medula espinhal, as lesões sintomáticas são excluídas da contagem lesional.

DIS (dissemination in space): disseminação no espaço; RM: ressonância magnética; SNC: sistema nervoso central

Quadro adaptado de Polman *et al.*, 2011 ⁷⁸

Quadro 5 - Critérios de McDonald (2010) definidores de *DIT* na imagem por RM

- Uma nova lesão em T2 ou uma nova lesão com realce após a injeção do gadolínio, com relação ao exame basal, em qualquer intervalo após a primeira imagem
- Presença simultânea de uma lesão assintomática com realce ao gadolínio endovenoso e uma lesão sem realce

Baseado em Montalban *et al.*, 2010

DIT (*dissemination in time*): disseminação no tempo; RM: ressonância magnética.

Quadro adaptado de Polman *et al.*, 2011 ⁷⁸

O critério atual é o que confere maior importância à IRM no diagnóstico da EM. Neste critério, a dosagem de imunoglobulinas monoclonais no líquido foi retirada dos critérios, pelo fato de que os achados laboratoriais poderiam aumentar a inclusão de falsos positivos, diminuindo o valor preditivo positivo do método ⁷⁸. Com o passar dos anos, a IRM tem ganhado cada vez mais espaço como o teste paraclínico que, isoladamente, possui maior importância no diagnóstico da EM.

Um dos grandes desafios diagnósticos da EM é a definição precoce da doença, visto que o controle da inflamação com estratégias terapêuticas específicas nos estágios iniciais pode diminuir o grau de degeneração e retardar a instalação da incapacidade funcional ⁸⁰. Outros desafios são o aumento na sensibilidade da detecção de lesões e a descrição de novas lesões e apresentações típicas da EM, que possuam maior frequência em indivíduos com EM do que em outras patologias. Os critérios diagnósticos atuais são baseados nos achados de imagem convencional em aparelhos com intensidade de campo magnético de 1,5 Tesla (T) ⁷⁸, por ser o mais

acessível e encontrado na maioria dos centros de neurodiagnóstico no mundo. Nesse campo magnético, as técnicas convencionais abordam com maior reprodutibilidade apenas as lesões macroscópicas da substância branca. Esses critérios não incluem ainda os achados de alterações na substância cinzenta nem as alterações encontradas no tecido neural aparentemente normal. Evidências atuais demonstraram que a presença de ao menos uma lesão intracortical em paciente com SCI aumenta significativamente o risco de evoluir para EM clinicamente definida ⁸¹.

Além disso, outras técnicas de aquisição e processamento de imagens têm demonstrado aspectos particulares da EM. Por exemplo, os padrões de perda tecidual e atrofia podem não só ajudar a diferenciar os casos de EM de outras patologias desmielinizantes autolimitadas e de outros quadros degenerativos ⁸²⁻⁸⁴, como podem ser uma ferramenta para a diferenciação dos subtipos da doença ^{85, 86}.

Não se pode negligenciar também as contribuições da RM na detecção de anormalidades na SBAN e SCAN. Desde a década de 1980, alguns estudos detectaram alterações em análises quantitativas de RM fora das placas lesionais ⁸⁷. Com base nas técnicas avançadas de RM, cada vez mais vem se demonstrando a presença de alterações bioquímicas e microestruturais no tecido cerebral aparentemente normal na EM, e o padrão dessas alterações é distinto do encontrado em outras patologias ou em outros subtipos desmielinizantes, como a encefalomielite disseminada aguda e a neuromielite óptica. Esses achados ainda não são uniformes e altamente reprodutíveis, pela variedade de técnicas aplicadas e também pela diferença

dos campos magnéticos utilizados. Porém demonstram grande valor na compreensão da etiologia e patologia e, com a evolução da compreensão dessas técnicas, persiste a discussão se, no futuro, esses achados serão considerados na elaboração do diagnóstico da EM ⁷⁸.

As próximas seções serão destinadas à descrição das principais técnicas de RM utilizadas na EM, a apresentação da doença nesses métodos de imagem e seus principais avanços técnicos.

1.1.2 Técnicas de IRM utilizadas no diagnóstico e pesquisa da EM

A EM é uma doença vastamente estudada pelos métodos de IRM, na qual uma ampla variedade de técnicas de imagem pode ser aplicada. Pode-se dizer que a compreensão de seus mecanismos patológicos avançou muito com o desenvolvimento de novas técnicas de imagem, mas também é possível afirmar que uma série de métodos de imagem evolui com base nas aplicações em seu diagnóstico e seguimento evolutivo.

Esta seção demonstrará algumas das principais técnicas de imagem utilizadas no diagnóstico e pesquisa da doença, sendo dividida em: técnicas para a detecção de lesões macroscópicas ou placas desmielizantes, técnicas para avaliação de alterações biomoleculares e metabólicas e técnica para detecção de alterações microestruturais (na qual será apresentada a técnica de *DTI*) do SNC.

A) Técnicas para detecção de lesões macroscópicas ou placas desmielinizantes

As imagens estruturais de RM mais frequentemente utilizadas na detecção de placas desmielinizantes são baseadas principalmente em dois tipos de ponderações: T1 e T2. Os eventos patológicos na EM determinam o prolongamento dos tempos T1 e T2 dos tecidos ⁸⁷, resultando em queda do sinal na ponderação T1 e aumento do sinal na ponderação T2. Todos os eventos patológicos decorrentes de inflamação e lesão tecidual na EM, como edema, aumento na hidratação tecidual, fragmentação da mielina e astrogliose podem estar associados às alterações visualizadas em ambas as ponderações, porém, as lesões observadas em T1 são frequentemente associadas às áreas de maior atividade inflamatória e/ou destruição tecidual ⁸⁸, sendo que a carga lesional nessa ponderação tenderá a ser menor que a observada nas ponderações T2.

As lesões com hipossinal em T1 são observadas em três situações: nas lesões tumefativas ou inflamatórias agudas, algumas lesões desmielinizantes crônicas e em lesões cavitadas, onde se observa perda tecidual mais acentuada e significativa perda axonal, sendo denominadas *black holes* ^{11, 18}. Estima-se que cerca de 22,9% a 55,7% das lesões inflamatórias agudas com realce ao gadolínio evoluam para lesões cavitadas ¹¹.

Na década de 1990, iniciou-se a utilização mais ampla da sequência *fluid attenuated inversion recovery (FLAIR)* na investigação de lesões

cerebrais ⁸⁹. As IRM com técnica de inversão recuperação (IR) são caracterizadas pela adição de um pulso inicial de radiofrequência (rf) de 180°, capaz de saturar o sinal de um tecido escolhido. No caso da sequência *FLAIR*, o tempo do pulso de inversão é escolhido para determinar a saturação do líquido cefalorraquidiano (LCR) o que, consequentemente, satura outros compartimentos contendo água livre. No caso da EM, após o pulso de rf de inversão é adquirida uma aquisição com tempo de eco (TE) e tempo de repetição (TR) longos, resultando em um contraste T2 (*T2-FLAIR*), no qual as lesões desmielinizantes apresentam alto sinal. Na EM, seu uso aumentou a detecção de lesões adjacentes à superfície ependimária, sendo úteis na descrição de lesões na interface caloso-septal ⁹⁰ (Figura 5).

Figura 5 - Imagem sagital ponderada em T2-FLAIR de paciente com esclerose múltipla remitente-recorrente, focalizada no corpo caloso. Observa-se placa hiperintensa no tronco do corpo caloso (seta). Mas, notam-se também áreas de aumento de sinal serrilhado e difuso na interface caloso-septal, correspondendo provavelmente a diminutas áreas desmielinizantes.

As primeiras aplicações das imagens bidimensionais (2D) com espessura de 5 mm com a técnica *T2-FLAIR* demonstraram aumento de

18% na detecção de placas lesionais da EM, comparadas com as aquisições em T2 com resolução espacial semelhante ⁹¹. Além disso, a técnica T2-*FLAIR* possui maior capacidade na diferenciação de lesões cavitadas, pois a área cavitada no interior da lesão apresenta maior teor de água livre, apresentando queda de sinal em T2-*FLAIR*, porém, baixo sinal em T1 e alto sinal em T2 (Figura 6).

Figura 6 - Apresentação de lesão cavitada nas sequências T2, T1 e T2-*FLAIR*. Visualizações localizadas de lesão cavitada (seta branca) em cortes axiais de paciente com esclerose múltipla. Na sequência ponderada em T2 (A), toda a lesão cavitada demonstra hipersinal, com a mesma área demonstrando hipossinal difuso em T1 (B). Na sequência T2-*FLAIR* (C), a área de cavitação central é diferenciada do resto da lesão pelo baixo sinal nessa sequência. Nos mesmos cortes observam-se outras duas lesões desmielinizantes sem cavitação central (pontas de seta pretas) que apresentam hipersinal em T2 (A), hipossinal em T1 (B) e hipersinal homogêneo em T2-*FLAIR* (C), auxiliando na diferenciação das características das lesões

A resolução espacial das imagens contribui para a detecção de um maior número de lesões na EM. A utilização de cortes de 3 mm nas imagens 2D aumenta a detecção de 10% a 20% de lesões em relação aos cortes de 5 mm ⁹². Já o uso de imagens tridimensionais (3D) em T2-*FLAIR*, aumenta em 30% a 40% a detecção de lesões em relação às imagens 2D ^{93, 94}.

As técnicas de IR apresentam grande destaque no estudo da EM, pois, além de aumentar o contraste da interface entre a substância branca e a superfície ventricular, mudam o contraste entre as substâncias branca e cinzenta, melhorando a visualização de lesões justacorticais. Com o advento dessa técnica, confirmou-se que um número de lesões patológicas localiza-se no córtex. A manipulação dessa técnica levou à criação de uma outra sequência magnética, a *double inversion recovery (DIR)*, na qual é adicionado um outro pulso de inversão do sinal magnético saturando o sinal da substância branca, aumentando o contraste entre as lesões, sobretudo na interface entre diferentes tecidos e no córtex cerebral^{95, 96}. Em relação à sequência T2-FLAIR 3D, não se observa um incremento significativo na detecção lesional na substância branca, porém a sequência DIR é capaz de detectar 150% a 190% mais lesões corticais e 30% mais lesões córtico-subcorticais^{95, 97}.

Não apenas as sequências magnéticas evoluíram, mas os aparelhos de RM estão em rápida e constante atualização. Aparelhos com campo magnético de 3 Tesla (3T) estão cada vez mais sendo utilizados nos principais protocolos de pesquisa e, nos últimos anos, vêm sendo utilizados na rotina clínica mais frequentemente. Os aparelhos com campo magnético de 7T tiveram seu uso aprovado em seres humanos e também tem sido observada sua utilização mais frequente, principalmente em pesquisa.

O aumento do campo magnético de 1,5T para 3T aumenta a detecção de lesões em cerca de 23% nas sequência T2-FLAIR 2D, sendo detectado um maior número de lesões justacorticais, corticais e periventriculares,

sobretudo ⁹⁸. No campo magnético de 7T, foi observado um significativo aumento, em cerca de 238%, na detecção de lesões corticais na sequência T2-*FLAIR* 3D, em comparação à mesma aquisição em aparelho de 3T. O campo mais intenso foi capaz de detectar alterações focais no córtex em sequências T1 3D e T2 2D com duplo eco. Esse estudo não demonstrou diferenças significativas na detecção de placas na substância branca nos pacientes com EM, pelo contrário, as aquisições em 3T detectaram um número discretamente maior de lesões nesse compartimento ⁹⁹. As imagens *DIR* 3D em campo magnético de 7T apresentam uma capacidade discretamente maior que as imagens T2-*FLAIR* 3D na detecção de lesões corticais e na substância branca, porém as imagens T2-*FLAIR* 3D são mais sensíveis na detecção de lesões justacorticais ¹⁰⁰. Apesar das diferenças técnicas, as aquisições T2-*FLAIR* e *DIR* têm demonstrado vantagens na detecção de lesões hiperintensas nos aparelhos de alto campo magnético. Os avanços técnicos na detecção de placas lesionais têm contribuído para demonstrar que a patologia da EM é mais extensa do que inicialmente observado. A detecção de maior número de lesões já nos aparelhos de 3T aumentou a correlação dos volumes lesionais com parâmetros clínicos e cognitivos, embora algumas correlações sejam ainda apenas moderadas ⁹⁸. Embora haja maior sensibilidade no estudo da extensão da doença no tecido encefálico, as placas lesionais macroscópicas permanecem inespecíficas para a diferenciação dos processos patológicos intrínsecos a elas e para a detecção das alterações metabólicas e microestruturais no tecido cerebral aparentemente normal.

B) Técnicas para avaliação das alterações biomoleculares e metabólicas no tecido cerebral na EM

As principais técnicas utilizadas na EM para avaliação das alterações metabólicas teciduais são: a transferência de magnetização (TM) e a espectroscopia de prótons. Elas são úteis tanto na compreensão dos mecanismos patológicos no interior das placas lesionais como no tecido cerebral aparentemente normal.

A técnica de TM permite medir o efeito dos prótons ligados a macromoléculas. A mielina possui um alto teor de macromoléculas, encontradas nas proteínas, lipídios, glicolipídios e glicoproteínas de suas membranas celulares. As sequências convencionais de RM não são capazes de visualizar a mielina em razão de seu T2 extremamente curto. A técnica de TM foi descrita *in vivo* pela primeira vez em 1989¹⁰¹ e é baseada na transferência de magnetização entre dois grupos de prótons no tecido. O tecido cerebral possui um montante de prótons de água livre, com alta mobilidade (grupo A), que apresentam um T2 longo, responsável por significativo sinal na IRM. O outro grupo de prótons (grupo B) é dotado de menor mobilidade, estando contido nas membranas celulares ou restrito entre os espaços de mielina. A sequência de TM é caracterizada pela aplicação de dois pulsos de radiofrequência (rf), um deles de ressonância (*on resonance*) e outro fora de ressonância (*off resonance*). No primeiro pulso, *on resonance*, a magnetização do grupo A permanece normal, enquanto existe uma indução ao relaxamento transversal do grupo B, pelo

seu T2 extremamente curto. Aplica-se então um pulso *off resonance* que satura preferencialmente os prótons do grupo A, e, como a frequência desse pulso é diferente da frequência de ressonância dos prótons, ele retira esse grupo do equilíbrio magnético. A frequência utilizada nesse pulso de rf é denominada pulso de TM. Com isso, obtém-se duas imagens, uma imagem sem pulso de TM e outra com pulso de TM. Após o pulso de TM, os prótons do grupo B procuram voltar a seu estado de equilíbrio, e um dos mecanismos para alcançá-lo é transferir uma parte de sua energia para o grupo A. Dessa maneira, medindo-se a diferença entre o sinal das imagens com e sem pulso de TM, consegue-se a taxa de transferência de magnetização (TTM), sendo possível estimar a influência dos prótons ligados a macromoléculas do tecido no sinal magnético, sendo uma medida indireta para estimar a concentração de mielina no tecido cerebral ^{101, 102}.

Com a TM, foi possível observar as características e evolução dos processos de desmielinização e remielinização nas placas lesionais, após os eventos inflamatórios agudos ^{103, 104}, a presença de sinais de desmielinização na SBAN ^{105, 106}, bem como alterações nas macromoléculas do córtex cerebral, auxiliando na compreensão da patologia na SCAN ^{20, 107-109}.

A espectroscopia de prótons por RM fornece informações a respeito do conteúdo molecular e metabólico de diversos materiais biológicos. É possível o estudo da espectroscopia em diversos núcleos magnéticos, como o ¹H, ¹³C, ³¹P, ²³Na ou ¹⁵N, porém a técnica mais aplicada na prática clínica é a espectroscopia de ¹H, ou espectroscopia de prótons. O princípio

de mensuração das concentrações das diferentes moléculas nos tecidos é baseado no desvio químico dos prótons, ou seja, dos núcleos de hidrogênio no ambiente químico molecular. Esse efeito deve-se à variação do campo magnético e da frequência de precessão do hidrogênio secundariamente aos elétrons contidos nos outros elementos moleculares, sendo possível medi-lo em partes por milhão (ppm). Cada elemento medido apresenta um valor de ppm específico, e os metabólitos mais frequentemente medidos nos estudos das doenças neurológicas são: o N-Acetil aspartato (Naa - 2,01 ppm), a creatina (Cr – 3,03 ppm), a colina (Co – 3,23 ppm), o mioinositol (ml – 3,56 ppm), os lipídios (Lip – 0,9 a 1,3 ppm) e o lactato (Lac – 1,33 ppm, pico duplo) ^{110, 111}.

Estudos de espectroscopia de prótons detectaram alterações metabólicas na substância branca e cinzenta dos pacientes com EM ¹¹². Na EM, frequentemente é observada redução na relação Naa/Cr nas lesões agudas, nas crônicas e no tecido cerebral aparentemente normal ^{113, 114}, além de outras alterações dinâmicas com elevação dos picos de Co e ml. Apesar das lesões de outras doenças inflamatórias e desmielinizantes apresentarem com certa frequência picos semelhantes na espectroscopia de prótons, a presença desses achados na SBAN é muito mais frequente nos casos definidos de EM e nas SCI que evoluem para EM, sendo raras nos quadros transitórios e em outras etiologias ⁵⁹.

C) A imagem por tensor de difusão (*DTI*) e a avaliação da microestrutura cerebral na EM

Para a compreensão da técnica de *DTI*, é necessário o conhecimento dos princípios de difusão da água e seu comportamento nos campos magnéticos. A difusão molecular é caracterizada pelo movimento de translação aleatório das moléculas, também conhecido como movimento Browniano, que é resultado da energia térmica dessas moléculas, ou entropia ¹¹⁵. O fluxo de difusão de moléculas obedece à primeira lei de Fick ¹¹⁶, sendo modulado pelo gradiente de concentração da partícula e o coeficiente de difusão do meio, conforme a equação (1):

$$J = -D \cdot \nabla C \quad (1)$$

Onde J é o vetor de fluxo de difusão, D é o coeficiente de difusão e ∇C é o gradiente de concentração da partícula. O coeficiente de difusão é diretamente proporcional à temperatura do meio e inversamente proporcional aos coeficientes de fricção ou viscosidade. Mas, de acordo com a lei de Fick, em situações de equilíbrio termodinâmico, com pressão e temperatura estáveis, e na ausência de gradientes de concentração, o fluxo de difusão seria nulo. Sabe-se que a resultante ou média do fluxo da difusão de todas as partículas de uma solução em estado de equilíbrio pode ser nula, porém os movimentos moleculares continuam, configurando translações e deslocamentos aleatórios que foram denominados

movimentos Brownianos, em razão das observações de Brown ¹¹⁷ em partículas de pólen e areia em suspensão na água. De acordo com essas observações, todas as partículas, vivas ou inanimadas, demonstram movimentos contínuos e aleatórios quando em suspensão em soluções.

Com o intuito de transportar a lei básica da difusão para mensurar o movimento aleatório em nível molecular, introduziu-se o conceito de “distribuição do deslocamento”, o qual determina que a probabilidade de deslocamento de um grupo molecular em soluções homogêneas segue uma função Gaussiana determinada pelo coeficiente de difusão e pelo intervalo de tempo, definida pela equação (2) ¹¹⁸:

$$x^2 = 2D.\Delta t \quad (2)$$

Onde x^2 é o quadrado do deslocamento médio das partículas do meio em um determinado tempo (Δt) e D é o mesmo coeficiente de difusão utilizado na primeira lei de Fick. Dessa maneira, é possível estimar o coeficiente de difusão de uma partícula por meio da mensuração de seu deslocamento em um intervalo de tempo.

A água é a molécula mais abundante nos tecidos vivos, pelas características físico-químicas dos átomos de hidrogênio que a compõem, é uma molécula conveniente para os estudos em RM. Uma das formas de diferenciar as características magnéticas de um tecido é baseada no grau defasagem dos *spins* moleculares, ou seja, na perda de energia ou de sinal dos átomos de hidrogênio de acordo com as propriedades magnéticas de

cada molécula e das interações com os átomos e moléculas vizinhas. Por volta de 1950, percebeu-se que o espalhamento molecular secundário à difusão era também responsável por uma queda no sinal ou uma defasagem dos *spins* moleculares após um intervalo de tempo ¹¹⁸. No tecido cerebral, as moléculas de água apresentam uma translação média de cerca de 10 μm em um intervalo de 50 ms, e esse deslocamento conduz a uma defasagem mensurável dos *spins* moleculares ¹¹⁵.

A sequência de difusão por RM é baseada nesses conceitos. As aquisições das sequências de difusão são obtidas pela aplicação de dois pulsos de gradiente bipolares, com um intervalo de tempo entre eles ¹¹⁵ (Figura 7). Inicialmente, aplica-se um pulso de *rf* que excita os átomos de hidrogênio. O primeiro pulso de gradientes acrescenta uma frequência angular diferente aos átomos de hidrogênio, dependendo da sua localização. Durante o tempo da ponderação da difusão, as moléculas de água continuam seu movimento aleatório, de acordo com a viscosidade e entropia do meio. A ação do segundo gradiente dependerá da localização dos *spins* magnéticos em relação ao mesmo. Se, durante o intervalo entre a aplicação dos dois gradientes, os *spins* modificarem sua localização, difundindo-se, o efeito do segundo gradiente, em termos de amplitude, não será igual ao primeiro. A dificuldade do segundo gradiente em realinhar os *spins* que se difundiram resultará em um sinal magnético menor no fim da aquisição.

Figura adaptada de Pipe, 2009 ¹¹⁹

Figura 7 - Sequência *spin-eco* de aquisição de imagens por RM com ponderação em difusão. A primeira caixa preta sobre a linha representa o pulso de radiofrequência excitatório. As caixas cinzas representam os gradientes aplicados para a obtenção das imagens em difusão. O primeiro gradiente coloca os *spins* dos átomos de hidrogênio em fase. Após um intervalo de tempo (Δ), um outro gradiente magnético é aplicado, com a mesma intensidade (G) e duração (δ), realinhando os *spins* que permanecerem na posição inicial. Na metade do tempo de eco, é aplicado um outro pulso de radiofrequência (segunda caixa preta) de 180° para realinhamento dos *spins* que estavam defasados devido ao decaimento T_2

Em cada momento da ponderação da difusão, o primeiro gradiente adiciona a cada *spin* de hidrogênio um fator de fase positivo, alterando levemente sua frequência de precessão de acordo com sua posição média ao longo da direção do gradiente e, durante a aplicação do segundo pulso de gradiente, um fator de fase negativo é adicionado, sendo dependente da posição média final dos *spins* em relação à direção do gradiente. O resultado, ou o sinal adquirido, depende da diferença de fase dos *spins* entre esses dois pulsos. Na ausência de translação molecular, todos os *spins* retornarão à fase inicial, emitindo um sinal magnético mais intenso. Mas, havendo deslocamento molecular, o sinal magnético será atenuado

exponencialmente pelo produto do coeficiente de difusão molecular, sendo também multiplicado por um fator b , que está correlacionado com as características do campo magnético e dos gradientes de difusão aplicados, conforme a equação (3):

$$b = (\gamma G \Delta)^2 (\Delta - \delta/3) \quad (3)$$

Onde γ é a constante giromagnética do hidrogênio, G é a intensidade dos gradientes de difusão, Δ é o tempo e o intervalo entre o início do primeiro gradiente e o início do segundo gradiente e δ é a duração de cada gradiente. Em todas as sequências de RM, o sinal magnético adquirido depende também dos tempos de recuperação T_1 e decaimento T_2 , além da densidade local de *spins* ou densidade de prótons, ou seja, nas propriedades moleculares do tecido ou material estudado. Portanto, para a mensuração dos coeficientes de difusão isoladamente, cada sequência de difusão consiste na aquisição de, pelo menos, dois volumes de dados, um com um gradiente de amplitude igual a zero, ou seja, $b = 0$ (S_0), e outro ponderado em difusão (S_D), com um gradiente diferente de zero. Como ambos os volumes de dados serão influenciados pelos tempos T_1 , T_2 e pela densidade de *spins* locais e apenas a sequência com gradiente diferente de zero será significativamente influenciada pela translação dos *spins*, o coeficiente de difusão será derivado de uma equação (4) baseada na razão entre os sinais de cada série de dados ¹¹⁹.

$$CDA = - [\text{Log} (S_D/S_0)] / b \quad (4)$$

Na equação acima, CDA é o coeficiente de difusão aparente, S_0 é o sinal magnético adquirido com $b = 0$ e S_D é o sinal adquirido com a ponderação em difusão. Neste caso, o b da equação é a diferença entre o fator de b mais alto e o mais baixo, ou seja, o fator de b da ponderação em difusão.

A aplicação de gradientes de difusão pode ser feita em qualquer direção ou em múltiplas direções. Isso se torna importante pois, em soluções, a difusividade do meio depende apenas de sua viscosidade, porém, em ambientes complexos como os tecidos vivos, existem barreiras que modulam a difusividade, tornando-a diferente nos diferentes eixos, ou orientada de acordo com a microarquitetura local. Quanto mais organizado o tecido em questão, mais a difusividade medida no local dependerá da direção de aplicação do gradiente¹²⁰. Quando são adquiridas ao menos seis direções de gradiente não colineares, é possível elaborar um modelo mais complexo de caracterização da difusão nas principais direções, configurando uma análise tridimensional, o que caracteriza o tensor de difusão (TD). O TD mais simples é uma matriz simétrica 3x3 (5)¹²¹, que contém as medidas de difusividade em cada direção, conforme demonstrado a seguir:

$$D = \begin{bmatrix} D_{xx} & D_{xy} & D_{xz} \\ D_{xy} & D_{yy} & D_{yz} \\ D_{xz} & D_{yz} & D_{zz} \end{bmatrix} \longrightarrow \begin{bmatrix} \lambda_1 & 0 & 0 \\ 0 & \lambda_2 & 0 \\ 0 & 0 & \lambda_3 \end{bmatrix} \quad (5)$$

Nessa matriz, D é o coeficiente de difusividade, e cada elemento no interior da matriz é a difusividade medida em cada eixo de gradiente. Após operações matemáticas para diagonalização obtém-se uma nova matriz (5) onde os elementos da sua diagonal correspondem às difusividades nos três principais eixos, que são chamados de *eigenvalues* ou autovalores (λ_1 , λ_2 e λ_3). A direção da difusividade para cada autovalor é expressa através dos correspondentes *eigenvectors* ou autovetores (ε_1 , ε_2 , e ε_3), e o autovetor principal, que corresponde à orientação principal do vetor, é definido por aquele que corresponde ao autovalor de maior amplitude ¹²⁰.

A partir dos componentes dessa matriz, podem ser extraídos alguns índices quantitativos e serem elaboradas representações gráficas de TD. Como a difusão da água no tecido cerebral é orientada e modulada pelas barreiras impostas pelas membranas celulares, esses índices oferecem informações indiretas sobre a microestrutura tecidual ¹¹⁵. Os principais índices quantitativos utilizados nos estudos clínicos são a difusividade média (DM) e a fração de anisotropia (FA). A DM é a média aritmética da soma dos três autovalores ($(\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3) / 3$). Com os valores de b tipicamente utilizados nos estudos clínicos ($b \leq 1500 \text{ s mm}^2$), a DM é, aproximadamente,

homogênea no tecido cerebral normal, sem diferenças significativas entre a substância branca e cinzenta ³⁵, não sofrendo tantas interferências secundárias à orientação vetorial do tecido, mas é variável de acordo com o grau de hidratação tecidual, o grau de restrição à mobilidade molecular pela presença de barreiras físicas e pela permeabilidade das membranas, sobretudo ¹²².

A fração de anisotropia (FA) é um índice que foi criado baseado no conceito de que a difusão das moléculas de água no tecido cerebral ou nos diferentes tecidos não possui uma amplitude igual em todas as direções, ou seja, é anisotrópica, em oposição à difusividade em soluções homogêneas, em que é isotrópica ¹²³. Dessa maneira, a FA é calculada pela variância de cada autovalor em relação às suas médias (ou seja, a DM) normalizada pela magnitude dos autovalores ³⁶, de acordo com a equação (6):

$$FA = \sqrt{\frac{3}{2} \frac{\sqrt{(\lambda_1 - DM)^2 + (\lambda_2 - DM)^2 + (\lambda_3 - DM)^2}}{\sqrt{\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2}}} \quad (6)$$

A FA é, então, um índice que varia de 0 a 1, sendo 0 quando a difusão é totalmente isotrópica, ou seja, os autovalores possuem amplitudes iguais, anulando o numerador da equação, e 1 quando a difusividade é totalmente anisotrópica, ou seja, é restrita a apenas um dos eixos principais ¹²⁰.

Outras informações podem ser obtidas a partir da matriz do TD. Uma delas é a representação gráfica do tensor, cuja mais típica é de uma

elipsóide, que é uma representação tridimensional do TD em cada ponto do espaço, sendo dependente das relações e diferenças dos autovalores. Os formatos mais globosos correspondem às regiões com menor anisotropia, e a situação mais isotrópica é representada por uma esfera ($\lambda_1 = \lambda_2 = \lambda_3$). Existem duas situações de alta anisotropia, os tensores em forma de “charuto” ou alongada ($\lambda_1 > \lambda_2 = \lambda_3$) e os tensores achatados ou em forma de “disco” ($\lambda_1 = \lambda_2 > \lambda_3$) (Figura 8).

Figura 8 - Representação gráfica elipsoidal do tensor de difusão em cérebro de indivíduo jovem saudável. Foi usado um filtro de anisotropia de 0,2 a 1,0, e as áreas com anisotropia muito baixas não são representadas, como o córtex cerebral ou os espaços liquóricos. No detalhe magnificado (imagem à direita), é possível observar que os tratos mais orientados, como o corpo caloso e porções do trato corticoespinal tendem a apresentar elipsoides mais espiculadas / alongadas (seta) ou planas / discóides (ponta de seta), indicando alta anisotropia, e os limites ventriculares demonstram elipsoides mais arredondadas, decorrentes de uma situação mais isotrópica

Além da forma gráfica do tensor, é proposto que a orientação do autovetor principal do TD segue a mesma orientação das fibras axonais, o que pode ser usado para o estudo da direção normal e patológica das fibras, sendo útil para a representação tridimensional dos tratos de substância branca, na tratografia, e também para os estudos de conectividade anatômica ^{120, 124}.

Esses princípios do TD podem ser amplamente aplicados no estudo do SNC, principalmente na abordagem da sua microarquitetura, de maneira não-invasiva, visto que, em seus compartimentos teciduais, o que modula a difusividade e o grau de anisotropia dos tecidos são os componentes e a organização das membranas celulares, a presença e as características de microtúbulos e neurofilamentos e, possivelmente, da regulação do transporte iônico e da água através de suas membranas ^{125, 126}. Na EM, a dissociação mielínica e das membranas celulares reduz a complexidade local do tecido, facilitando a movimentação das moléculas de água nas placas desmielinizantes e também no tecido cerebral aparentemente normal, inclusive em áreas com alta coerência de fibras, como a cápsula interna e o CC, com consequente aumento na DM e redução da FA ¹²⁷ (Figura 9).

Nos tecidos vivos, a água possui dois tipos de transporte: passivo e ativo. A velocidade e a direção do transporte passivo dependem do número e das características das barreiras físicas, e, dentro do tecido cerebral, as estruturas que constituem as mais significativas barreiras físicas à movimentação da água são as membranas celulares e, na substância branca cerebral, os constituintes que determinam maior modulação a esse

transporte são as bainhas de mielina e as membranas axonais ¹¹⁵. A movimentação passiva das moléculas de água e sua modulação nos diferentes vetores (ou autovetores) parece ser o maior fator que influencia a FA, sendo que estudos anteriores demonstraram valores similares de anisotropia *in vivo* e em amostras teciduais *post mortem* ¹²⁸. Outra evidência que reforça esse conceito são os achados de um estudo experimental que utilizou vimblastina, uma substância que, pela despolimerização de microtúbulos axonais, deprimia o transporte axonal rápido de fluidos e íons. Essa inibição do transporte axonal ativo não alterou a FA nos tecidos avaliados ¹²⁹. Por outro lado, o transporte ativo de água e a permeabilidade ativa das membranas parecem afetar os índices de difusividade, sendo observado que tanto em tecidos fixados em formaldeído como nos tecidos tratados com vimblastina nota-se uma redução global da difusividade, tanto no eixo paralelo aos axônios, quanto nos eixos perpendiculares ¹³⁰.

Figura 9 - Mapas de fração de anisotropia (FA) e difusividade média (DM) em indivíduo com esclerose múltipla remittente recorrente. Notam-se lesões na substância branca periventricular e subcortical, caracterizadas pela redução do sinal no mapa de FA (esquerda) e aumento no mapa de DM (direita), destacando-se uma lesão periventricular esquerda (seta). As imagens estão orientadas sob a convenção radiológica.

Em diversos estudos neurológicos, tem sido proposto que a FA e DM são afetadas pela perda da complexidade tecidual, quebra de membranas, colapso das barreiras celulares e aumento da concentração de água livre, ou seja, água com difusividade isotrópica (edema vasogênico, por exemplo) ¹³⁰. A FA, por exemplo, vem sendo destacada por apresentar alta dependência da complexidade microscópica dos meios, conforme elucidado anteriormente. Mas, alguns fatores fazem com que esse índice não seja o mais sensível dos índices obtidos pela *DTI*. Em um estudo com ratos

mutantes, desprovidos de mielina, a redução de 100% da mielina em seus tecidos esteve associada a uma redução de cerca de 15% na FA ¹³¹, inferindo que pequenas alterações nas medidas de FA podem refletir danos patológicos mais extensos. Além disso, a anisotropia pode variar como resultado de variações na difusividade paralela às fibras axonais ou na difusividade perpendicular, ou em uma combinação entre ambas. Por exemplo, uma amostra tecidual com difusividade paralela de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ e difusividade perpendicular de $0,5 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ e outra amostra com difusividade paralela de $0,5 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ e perpendicular de $0,25 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ vão apresentar FA iguais, visto que as relações entre os eixos de difusividade são semelhantes ¹³⁰.

Dessas observações, surgiu a idéia de analisar os índices de difusividade isoladamente em cada um dos eixos ou autovetores do TD. A difusividade paralela ou axial ($\lambda_{||}$) é dominante, seguindo o eixo de menor restrição à difusão, paralela às fibras axonais. A difusividade radial ($\lambda_{\perp}$) é perpendicular aos axônios e à maior parte das membranas celulares axonais e da bainha de mielina, correspondendo à media dos autovetores ortogonais à $\lambda_{||}$ ($\lambda_{\perp} = (\lambda_2 + \lambda_3) / 2$). Diversas evidências demonstram que a $\lambda_{||}$ reflete alterações relacionadas à axonopatia, e a $\lambda_{\perp}$ apresenta maior correlação com a degradação mielínica ¹³⁰.

Um estudo em nervos ciáticos de ratos demonstrou que logo após esmagamento neural notava-se redução na FA associada ao aumento da $\lambda_{\perp}$, sem alterações significativas na $\lambda_{||}$. O seguimento evolutivo dessas lesões demonstrou uma recuperação da FA em alguns tipos de lesão, sugerindo

reversibilidade dessas lesões e também demonstrando correspondência dos índices de *DTI* com o status das fibras neurais ¹³².

Outro grupo de pesquisadores induziu lesão axonal seletiva em ratos, induzida por metilmercúrio, demonstrando aumento isolado na $\lambda_{||}$ sem alterações significativas na $\lambda_{\perp}$, sugerindo que a difusividade axial como um possível marcador de lesão permanente e injúria axonal ¹³³.

A $\lambda_{\perp}$ demonstra-se quase sempre aumentada nos quadros onde existe predominância de desmielinização, porém, as variações da $\lambda_{||}$ nos quadros de lesão axonal tendem a ser mais variáveis e controversas, quando são analisados os resultados de diferentes estudos. Um estudo animal no qual foi induzida isquemia na retina e, portanto, lesão axonal secundária no nervo óptico, observou uma redução da $\lambda_{||}$ nos primeiros dias após a lesão e ausência de alterações significativas na $\lambda_{\perp}$ ³¹.

Em estudos animais, muitas vezes, observa-se uma redução progressiva da $\lambda_{||}$ acompanhando a perda axonal, persistindo durante as fases crônicas da lesão tecidual. Nesses casos, a indução artificial de lesão axonal isolada associa-se a reduções precoces na $\lambda_{||}$ e alterações apenas tardias na $\lambda_{\perp}$ ¹³⁴. Já em estudos de *DTI* em humanos, o comportamento das difusividades vetoriais é diferente. Em um dos estudos, observou-se aumento precoce da $\lambda_{\perp}$ após calosotomia, com redução da $\lambda_{||}$ nas primeiras semanas. Na fase tardia ou crônica após o procedimento cirúrgico, notou-se aumento progressivo na $\lambda_{||}$, enquanto a $\lambda_{\perp}$ também continuava a aumentar ¹³⁵. Comportamento semelhante foi observado em outros tipos de lesão do SNC. Por exemplo, nas áreas pericontusionais, pós-traumatismo encefálico,

observou-se redução da $\lambda_{||}$ nas primeiras 6 horas até 4 dias após a lesão e aumento depois de 1 a 4 semanas, com aumento progressivo da $\lambda_{\perp}$, desde os primeiros dias ^{136, 137}.

Na EM, os processos de desmielinização e perda axonal, embora heterogêneos, ocorrem de maneira associada, sendo virtualmente impossível separá-los. Os estudos de *DTI* realizados nas fases de remissão da doença demonstram predominantemente aumento nos índices de difusividade. A $\lambda_{\perp}$ quase sempre está aumentada, com alterações mais disseminadas nas lesões macroscópicas e na SBAN, acompanhando a queda na FA e o aumento na DM ¹³⁸⁻¹⁴¹. Em contrapartida, a $\lambda_{||}$ demonstra-se normal ou inalterada ¹⁴⁰, ou apresenta aumento em áreas mais localizadas ^{134, 139}. Como é virtualmente impossível isolar os processos de desmielinização e perda axonal na EM, o significado das alterações observadas nesses índices ainda não é totalmente compreendido, porém existe a hipótese de que a $\lambda_{||}$ seja um índice relacionado a alterações patológicas mais crônicas e tardias, possivelmente, traduzindo maior grau de degeneração. Esses achados reforçam a necessidade de estudos mais aprofundados a respeito das alterações dos índices de *DTI* nos diferentes tratos de substância branca nos pacientes com EM nas diversas fases da doença. Dessa maneira, será possível avançar os conhecimentos a respeito dessa técnica e ampliar seu potencial no estudo das alterações microestruturais no tecido neural.

2 Objetivos

-
- Avaliar os índices de *DTI* (FA, MD, $\lambda_{||}$ e $\lambda_{\perp}$) em cinco segmentos do corpo caloso (CC) de um grupo de indivíduos com EMRR com baixos escores de incapacidade funcional, comparando-os com um grupo de indivíduos saudáveis.
 - Avaliar o grau e a distribuição da atrofia da substância cinzenta cortical no grupo EMRR, caracterizada pelo afinamento do córtex cerebral em relação ao grupo de indivíduos saudáveis.
 - Correlacionar os índices de *DTI* do CC e a espessura cortical com os volumes de lesões macroscópicas na substância branca encefálica nos indivíduos com EMRR.
 - Correlacionar os índices de *DTI* do CC e a espessura cortical com os escores da *EDSS* nos indivíduos com EMRR.

3 Método

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo transversal grupo x controle, baseado na comparação da análise quantitativa das imagens de RM entre um grupo de indivíduos com EM remitente-recorrente (EMRR) e um grupo controle composto por indivíduos saudáveis.

O estudo foi desenvolvido no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), envolvendo os departamentos de Radiologia e Neurologia. Os indivíduos EMRR foram recrutados no ambulatório de clínica neurológica / doenças desmielinizantes, sendo incluídos no estudo após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (Anexo A), no período entre março de 2009 e fevereiro de 2011. Todos os exames foram acompanhados por médico radiologista, especializado em neuroimagem, e, clinicamente, por médicos neurologistas, especializados em doenças desmielinizantes.

Os parâmetros clínicos foram coletados por médicos neurologistas e expressos pelos escores da Escala Expandida do Estado de Incapacidade (*Expanded Disability Status Scale - EDSS*)¹⁴² e os subescores dos sistemas funcionais (*Functional Systems Scale - FSS*)¹⁴³ (Anexos B e C). Durante a avaliação clínica para a inclusão dos pacientes no estudo, foi quantificada também a duração da doença (DD), definida a partir do intervalo entre o episódio neurológico suspeito de exacerbação neurológica (referido pelo

paciente) e o momento de inclusão no protocolo de pesquisa (primeira consulta).

3.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

3.2.1 Pacientes – Grupo EMRR

Composto por 31 indivíduos (22 mulheres) com idades entre 19 e 48 anos (média 30,5 anos $\pm$ 8,7) com EMRR clinicamente definida pelos critérios revisados de McDonald⁷⁵ e com escore na *EDSS* menor ou igual a 3.

Todos os pacientes estavam fora de exacerbações clínicas da doença, sem uso de corticoesteroides por, pelo menos, 90 dias antes da realização dos exames de RM. Nenhum dos indivíduos desse grupo havia sido submetido previamente a terapias imunomoduladoras modificadoras da doença.

- **Critérios de exclusão:** Presença de diagnóstico prévio de outra doença neurológica ou psiquiátrica; cirurgia cerebral prévia; uso de corticoesteroides em período inferior de 90 dias antes da aquisição das imagens de RM ou utilização prévia de outras drogas imunomoduladoras específicas para o tratamento de EM; uso atual de drogas psicoativas; história prévia de abuso de álcool ou drogas ilícitas; presença de implantes metálicos, estimuladores

ou outros materiais incompatíveis com a RM; claustrofobia ou recusa em assinar o TCLE.

3.2.2 Grupo controle

Composto por 34 indivíduos saudáveis (27 mulheres) com idades entre 20 e 55 anos (média 32,3 anos $\pm$ 7,8), sem doenças neurológicas, psiquiátricas, autoimunes, neoplásicas ou cardiovasculares prévias. Os indivíduos do grupo controle foram selecionados aleatoriamente, sendo composto sobretudo de estudantes de graduação e pós-graduação, funcionários da instituição ou pessoas da população que se voluntariaram a participar da pesquisa ao serem informadas sobre a mesma, durante o mesmo período de inclusão dos indivíduos do grupo EMRR.

- **Critérios de exclusão:** Presença de diagnóstico prévio de outra doença neurológica ou psiquiátrica; cirurgia cerebral prévia; uso de corticoesteroides em período inferior de 90 dias, antes da aquisição das imagens de RM; história prévia de abuso de álcool ou drogas ilícitas; presença de implantes metálicos, estimuladores ou outros materiais incompatíveis com a RM; claustrofobia ou recusa em assinar o TCLE.

3.3 AQUISIÇÃO DAS IMAGENS DE RM

Os exames de RM de crânio foram realizados com bobina de prótons (^1H) de cabeça de 8 canais, em aparelho de 3,0 Tesla (3T) (*Intera Achieva, PHILIPS Healthcare, Best, The Netherlands*), obtido pelo programa Cinapce da FAPESP (Processo 05/56447-7).

Para as análises propostas neste estudo, foram utilizadas:

- *Diffusion tensor imaging (DTI)*, incluindo imagens ponderadas em difusão (*diffusion-weighted – DW*) com a técnica *spin-echo (SE)* *sensitivity encoding (SENSE)*, fatores de $b = 0$ e 1000 s/mm^2 , 32 direções não colineares de gradiente (campo de visão (*field of view - FOV*) = $256 \times 256 \text{ mm}$, matriz = 128×128 , espessura de corte = 2 mm , sem espaçamentos). A sequência *DTI* abrange todo o cranioencéfalo, com 67 cortes axiais contíguos, reconstrução tridimensional de *voxel* com resolução de $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$, com duração média de aquisição de 6 min 12 s.
- Sequência 3D ponderada em T1, com a técnica *Fast Field Echo (3DT1-FFE)*, adquirida no plano sagital, e os seguintes parâmetros: tempo de eco (TE) / tempo de repetição (TR) = $2,7 / 6,2 \text{ ms}$; tempo de inversão (TI) = 700 ms ; *FOV* = $240 \times 240 \times 180 \text{ mm}$; matriz = 240×240 ; resolução do *voxel* reconstruído = 1 mm^3 (isométrico); duração média de aquisição: 4 min 13 s.
- Sequência T2-*FLAIR* 2D, com cortes axiais e os seguintes parâmetros: TE/TR = $130/8613 \text{ ms}$; TI = 2800 ms ; *FOV* = 230×142

x 182 mm; espessura do corte= 3 mm, com espaçamento de 0,3 mm; tempo de aquisição: 3 min 01 s.

3.4 PÓS-PROCESSAMENTO DAS IMAGENS *DTI*

As imagens de *DTI* foram pós-processadas com o *software BioImage Suite 3.0* (<http://www.bioimagesuite.org>). As imagens foram co-registradas e realinhadas espacialmente, com correção das distorções induzidas pelas correntes de Foucault e de movimentação da cabeça. Após o realinhamento das imagens, uma imagem média foi calculada, a partir da qual foi realizada a extração do cérebro, retirando-se o crânio do volume médio. Essa operação permite o cálculo de uma máscara, que é aplicada aos 32 volumes de difusão. Uma tábua de gradientes é gerada para o estudo pelo *software DTI table creator* (www.birncommunity.org/tools-catalog/dti-gradient-table-creator/) e, aplicando-se aos volumes de imagens ponderadas em difusão, obtém-se a matriz do tensor de difusão (*diffusion tensor (DT)*), de onde são extraídos os mapas de fração de anisotropia (FA), difusividade média (DM) e os autovalores (λ_1 , λ_2 e λ_3). O autovalor principal (λ_1) representa a difusividade axial ($\lambda_{||}$), paralela às fibras axonais, e a difusividade radial ($\lambda_{\perp}$) é calculada pela média dos outros dois autovalores $((\lambda_2 + \lambda_3)/2)$.

Uma secção sagital mediana do corpo caloso com 4 mm de espessura foi segmentada manualmente nos mapas individuais de FA, conforme o algoritmo proposto por Hofer e Frahm ⁴¹, baseado na conectividade

anatômica e funcional do corpo caloso (Figura 10). CC1 corresponde ao sexto anterior, representando o rosto e joelho; CC2 é caracterizado pela metade anterior menos CC1, representando o tronco médio anterior; CC3 é a metade posterior menos o terço posterior, representando o tronco médio posterior; CC4 é o terço posterior menos o um quarto posterior, representando o istmo, e CC5 corresponde ao um quarto posterior, representando o esplênio. O quadro 6 expõe a projeção cortical de cada segmento do CC, segundo o estudo de Hofer e Frahm ⁴¹. Um limite inferior de FA de 0,2 foi utilizado na delimitação das regiões de interesse (do inglês *regions of interest – ROI*), para minimizar a influência de *voxels* de líquido ou das estruturas vizinhas na área do CC. A análise quantitativa da *DTI* do CC foi baseada nas estatísticas das *ROI*'s, obtendo-se os valores de FA, DM, $\lambda_{||}$ e $\lambda_{\perp}$ para cada segmento e para o CC total.

Figura 10 - Tractografia dos cinco segmentos do corpo caloso em um controle saudável. No topo à esquerda, está representada a segmentação do CC e as *ROI's* que foram utilizadas como sementes para o traçado da tractografia. À direita no topo, a vista sagital dos tratos obtidos, estando também projetados sobre cortes axiais ascendentes dos mapas de FA deste indivíduo.

CC1: joelho; CC2: tronco médio anterior; CC3: tronco médio posterior; CC4: istmo; CC5: esplênio

Quadro 6 - Projeção setorizada das fibras do corpo caloso

CC1	Córtices pré-frontal e orbitofrontal
CC2	Área pré-motora e motora suplementar
CC3	Área motora primária
CC4	Córtices sensorial primário e pré-piriforme
CC5	Lobos parietal, temporal e occipital

Quadro adaptado de Hofer e Ffham, 2006 ⁴¹

CC1: joelho; CC2: tronco médio anterior; CC3: tronco médio posterior; CC4: istmo; CC5: esplênio

3.5 PROCESSAMENTO E SEGMENTAÇÃO DAS IMAGENS 3D PONDERADAS EM T1

As imagens volumétricas de alta resolução ponderadas em 3DT1-*FFE* foram pós-processadas com a utilização do *software FreeSurfer v5.1.0* (<http://surfer.nmr.mgh.harvard.edu/>). Esse procedimento automático foi desenvolvido por um grupo de pesquisadores^{144, 145}, resultando em segmentações cerebrais de alta qualidade, baseadas no corregristo e comparação das imagens a modelos anatômicos populacionais e também na classificação do *voxel* pela intensidade do sinal.

A cadeia de processamento do *Freesurfer v5.1.0* inclui a segmentação cortical baseada nas superfícies cerebrais, classificando as superfícies piais (na interface entre o córtex e o espaço liquorico) e subcortical (na interface entre as substâncias branca e cinzenta)¹⁴⁶, uma segmentação subcortical, baseada na segmentação volumétrica¹⁴⁴, e a classificação das regiões corticais e subcorticais, baseada em atlas anatômicos¹⁴⁷.

A reconstrução e a segmentação das superfícies corticais seguem diversos passos. Primeiramente, as imagens volumétricas ponderadas em T1 são alinhadas ao atlas de Talairach¹⁴⁸ por uma transformação linear. As localizações prováveis dos *pixels* do parênquima encefálico são estimados com base em sua localização no espaço Talairach, bem como na classificação das intensidades locais de sinal e da relação com os *voxels* vizinhos. O crânio é extraído, e o volume do cérebro resultante é

reclassificado em substância cinzenta e branca. Os hemisférios cerebrais são divididos baseados nas localizações esperadas do CC e da ponte no atlas de Talairach, bem como em algoritmos matemáticos que calculam a forma esperada dessas estruturas. Uma superfície subcortical é inicialmente calculada com base na máscara de substância branca anteriormente calculada. Após, a superfície pial é estimada e alinhada à superfície subcortical, e a espessura cortical de cada localização é calculada a partir da menor distância entre os pontos das duas superfícies¹⁴⁶. Os volumes são inflados e registrados em um mapa esférico segmentado baseado nos padrões de giros e sulcos médios de uma população humana representativa, e a espessura cortical de cada segmento segue a classificação desses atlas^{147, 149}.

A segmentação volumétrica subcortical é baseada em dois parâmetros: na localização estimada no atlas de Talairach e na intensidade de sinal dos *voxels*¹⁴⁴. Por essas classificações, são diferenciadas as estruturas da substância cinzenta profunda e da substância branca e também são identificadas hipointensidades da substância branca que, em indivíduos saudáveis podem corresponder, mais provavelmente, a espaços perivasculares e no grupo de pacientes, no caso da EM, são compatíveis com placas lesionais hipointensas em T1. Apoiado nessa segmentação, foi obtido o volume de hipointensidades na sequência ponderada em T1, que no grupo EMRR corresponde à carga lesional T1, mensurando apenas as lesões ou hipointensidades localizadas na substância branca.

A reconstrução e segmentação automática de cada indivíduo foram checadas visualmente e, em caso de erros na segmentação, foram editadas pela pesquisadora responsável e reprocessadas, seguindo as instruções preconizadas no software *Freesurfer v5.1.0*.

A partir do processamento das imagens T1, foram extraídas as seguintes informações:

- Espessura cortical cerebral média (Ecc), calculada com base na soma das espessuras corticais de cada hemisfério cerebral (Echc) direito (dir) ou esquerdo (esq) multiplicadas pelas suas áreas de superfície (Suphc), divididas pela soma das áreas de superfície dos hemisférios $[(Echc\ dir \times Suphc\ dir) + (Echc\ esq \times Suphc\ esq)] / Suphc\ dir \times Suphc\ esq$;
- Segmentação cortical de cada indivíduo da amostra; e
- Volume de hipointensidades em T1 na substância branca encefálica (carga lesional T1)

3.6 SEGMENTAÇÃO DAS LESÕES HIPERINTESAS EM T2-FLAIR

As lesões hiperintensas em T2-FLAIR localizadas na substância branca encefálica foram delineadas manualmente, incluindo focos de alteração de sinal com, pelo menos, 3 mm no maior eixo em todo o volume encefálico. O volume lesional, ou seja, a carga lesional T2-FLAIR, foi

calculado com a ferramenta *lesion segmentation edition (LSE)* do software *SepInria v1.8.X* (<http://www-sop.inria.fr/asclepios/software/SepINRIA/>).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS DE DTI E SUAS CORRELAÇÕES COM AS VARIÁVEIS DA DOENÇA

Para o teste de diferenças entre os grupos, foi usado o teste de Mann-Whitney, considerando significativo os valores de $p < 0,05$, e nas tendências estatísticas, os valores de p entre 0,05 e 0,1.

Para avaliar as correlações entre os resultados de *DTI* com as cargas lesionais T1 e T2-*FLAIR* e os dados demográficos (idade e duração da doença – DD), foi utilizado o teste de Spearman, com $p < 0,05$, considerado significativo, e os valores entre 0,5 e 0,1, como tendências.

Para testar a correlação entre as medidas de *DTI* de cada segmento do CC e o grau de disfunção clínica dos pacientes com EM, foram realizados testes de regressão linear multivariada no grupo EMRR, utilizando-se os escores de *EDSS*, como variável dependente. Com testes semelhantes, foi feita a análise da correlação das cargas lesionais T1 e T2-*FLAIR*, a idade e duração da doença, para avaliar se as alterações mensuradas não eram influenciadas indiretamente por esses fatores.

3.8 ANÁLISE DE GRUPO DAS CARACTERÍSTICAS REGIONAIS DA ESPESSURA CORTICAL

As análises de grupo dos dados de espessura cortical foram realizadas com o emprego da ferramenta *QDEC* do software *FreeSurfer v5.1.0* (<http://surfer.nmr.mgh.harvard.edu/>). *QDEC* é um acrônimo para *Query, Design, Estimate, Contrast*, sendo uma ferramenta para análise intersujeitos e intergrupos, capaz de integrar estatisticamente os dados morfométricos a dados demográficos ou provenientes de técnicas variadas. A análise do *QDEC* é baseada em *general linear modeling (GLM)* que perfaz uma combinação linear de múltiplas variáveis mais o erro inferido na amostra, determinando a probabilidade da variável proposta influenciar a espessura cortical regional. A medida da espessura cortical baseia-se na distância entre cada vértice da superfície pial e o vértice correspondente da superfície da substância branca.

Para a análise de múltiplos indivíduos, as imagens individuais são suavizadas e registradas em uma imagem alvo que corresponde à média de todos os indivíduos da amostra (*fsaverage*) para cada parâmetro morfométrico de espessura e área corticais, padrão de sulcos e curvatura, volume, etc. Após o pré-processamento, os dados morfométricos de cada ponto são integrados a uma matriz de dados que perfaz uma combinação linear dos dados de espessura cortical aos fatores explanatórios desejados. Para os testes estatísticos, foi utilizado um fator de suavização das imagens (*Smoothing factor FWHM*) de 10 mm.

Em cada hipótese, foram testadas as correlações entre as espessuras corticais de cada região e a covariável ou fator explanatório escolhido, sendo corrigidos pelo teste de simulação de Monte Carlo (*Monte Carlo Null-Z Simulation*). O resultado do teste, ou seja, a magnitude da correlação, após a correção, é dado pelo valor de z , sendo valorizados os resultados com $|z| > 1,3 - \log(10)p$, que correspondem a valores de $p < 0,05$. As áreas corticais onde existe correlação significativa demonstram-se como conglomerados corticais, representados por áreas coloridas sobrepostas sobre os mapas de superfície da imagem média da amostra. As correlações positivas aparecem como áreas vermelhas a amarelas e as correlações negativas como áreas azul-escuro a azul-claro, da menor à maior significância da correlação, respectivamente.

As regiões estatisticamente significativas foram delineadas e, por meio de uma transformação inversa realizada pelo software *FreeSurfer*, transportadas para o espaço de cada indivíduo, na qual foram verificadas suas posições nos atlas individuais de segmentação cortical e recalculados os valores individuais de espessura média de cada conglomerado cortical que atingisse valor estatístico significativo.

Primeiramente, foram analisadas as diferenças das espessuras corticais e entre o grupo EMRR e controle, utilizando-se a variável discreta da doença como variável independente. A idade dos indivíduos do grupo foi utilizada como variável confundidora, para minimizar o efeito da idade na atrofia cortical.

Após a análise das diferenças regionais entre os grupos, foi analisada a correlação entre as variações da espessura cortical e as variáveis da doença no grupo EMRR. Foram testadas as correlações com as cargas lesionais T1 e T2-*FLAIR*, com a duração da doença (DD) e com o *EDSS* da amostra. Nessas análises, a idade dos indivíduos também foi utilizada como variável confundidora.

As medidas de espessura cortical nas áreas mais significativamente atrofiadas no grupo EMRR, obtidas pela transformação inversa das regiões de interesse descritas acima, foram mensuradas em cada indivíduo e realizada a comparação entre os grupos EMRR e controle por meio do teste de Mann-Whitney, considerando significativos os valores de $p < 0,05$ e as tendências estatísticas, os valores de p entre 0,05 e 0,1.

4 Resultados

4.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E VOLUMES LESIONAIS

O tempo médio de duração da doença (DD) era de 2,4 anos $\pm$ 2,0 (variando de 0,3 a 9,5 anos). Os resultados das escalas clínicas estão demonstrados resumidos nos dados da Tabela 1 e expostos em detalhes no Anexo D. O sistema funcional predominantemente afetado neste estágio inicial foi o piramidal, seguido pelos sensorial, visual e mental. Os demais sistemas apresentaram apenas alterações pontuais e eventuais.

Tabela 1 - Escores clínicos / escalas de déficit

	Média $\pm$ DP (faixa de escores)	N / porcentagem (escore $\neq$ 0)
EDSS (0-10)	1,1 $\pm$ 0,9 (0-3)	23 / 74,2%
FSS sub-escores (0-5)		
Visual	0,2 $\pm$ 0,4 (0-1)	6 / 19,4%
Tronco cerebral	0,0 $\pm$ 0,2 (0-1)	1 / 3,2%
Piramidal	0,4 $\pm$ 0,8 (0-3)	8 / 25,8%
Cerebelar	0,1 $\pm$ 0,4 (0-2)	1 / 3,2%
Sensorial	0,3 $\pm$ 0,7 (0-2)	6 / 19,4%
Esfíncteres	0,1 $\pm$ 0,2 (0-1)	2 / 6,5%
Mental	0,3 $\pm$ 0,6 (0-2)	6 / 19,4%

Os resultados estão expressos em média $\pm$ desvios padrão, com a faixa de escores entre parênteses.

EDSS: *Expanded Disability Status Scale*

FSS: *Functional Systems Scale*

N: número de pacientes com escores alterados / porcentagem de escores alterados

O volume lesional T1 médio nos pacientes EMRR era $3,79 \text{ cm}^3 \pm 2,3$ (variando de 1,2 a $11,1 \text{ cm}^3$). No grupo controle, foram mensuradas as hipointensidades na substância branca, que são compatíveis sobretudo com espaços perivasculares ou diminutos focos de gliose inespecífica, encontrando-se uma média de $1,29 \text{ cm}^3 \pm 0,3$ (variando de 0,7 a $1,8 \text{ cm}^3$), sendo significativamente mais baixa que o grupo ($p < 0,0001$) EMRR. Não foi encontrada correlação estatística entre a carga lesional T1 e idade ($p = 0,4$) ou gênero ($p = 0,3$) no grupo EMRR.

A média dos volumes de lesões hiperintensas em T2-*FLAIR* nos pacientes EMRR era $14,67 \text{ cm}^3 \pm 11,1$ (variando de 2,5 a $55,3 \text{ cm}^3$), sem correlação dos volumes lesionais em T2-*FLAIR* com a idade ou gênero dos pacientes. No grupo controle, não foram verificados focos de hiperintensidade em T2-*FLAIR* significativos, observando-se apenas alguns focos puntiformes esparsos em alguns indivíduos, menores que 3 mm no maior eixo, que são também interpretados como espaços perivasculares ou gliose inespecífica.

4.2 - CARACTERÍSTICAS DE *DTI* NOS SEGMENTOS DO CC NOS GRUPOS EMRR E CONTROLE

A) Análise da diferença dos índices da *DTI* entre os grupos

Os resultados das medidas escalares de *DTI* nos diferentes segmentos do CC estão resumidos nos dados da Tabela 2. No grupo EMRR, nota-se aumento significativo da difusividade radial ($\lambda_{\perp}$) e da difusividade média (DM) em todos os segmentos, e a fração de anisotropia (FA) só não está significativamente alterada no segmento CC3, porém observa-se uma tendência à sua redução. A difusividade axial ($\lambda_{\parallel}$) está aumentada em nível significativo nos segmentos CC2, CC3 e CC5. Todos os índices de *DTI* estão alterados significativamente nas medidas do CC total.

Os resultados de *DTI* da amostra de pacientes e controles estão expostos no Anexo E.

Tabela 2 - Características de DTI no CC nos grupo EMRR e controle

	FA		DM (10^{-3}mm/s^2)		$\lambda_{ }$ (10^{-3}mm/s^2)		$\lambda_{\perp}$ (10^{-3}mm/s^2)	
	EMRR	GC	EMRR	GC	EMRR	GC	EMRR	GC
CC1	0,67	0,70	0,88	0,83	1,69	1,65	0,48	0,42
	$\pm 0,04$	$\pm 0,04$	$\pm 0,09$	$\pm 0,05$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,05$
	p= 0,007		p= 0,007		p= 0,10		p= 0,004	
CC2	0,62	0,65	0,86	0,79	1,56	1,49	0,51	0,44
	$\pm 0,06$	$\pm 0,04$	$\pm 0,12$	$\pm 0,05$	$\pm 0,17$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	0,05
	p= 0,005		p= 0,004		p= 0,04		p= 0,002	
CC3	0,65	0,67	0,82	0,77	1,54	1,47	0,46	0,41
	$\pm 0,06$	$\pm 0,04$	$\pm 0,06$	$\pm 0,05$	$\pm 0,13$	$\pm 0,1$	$\pm 0,06$	$\pm 0,05$
	p= 0,07		p< 0,001		p= 0,01		p= 0,003	
CC4	0,63	0,67	0,87	0,81	1,59	1,55	0,50	0,44
	$\pm 0,08$	$\pm 0,04$	$\pm 0,06$	$\pm 0,05$	$\pm 0,14$	$\pm 0,1$	$\pm 0,08$	$\pm 0,05$
	p= 0,006		p= 0,003		p= 0,22		p< 0,001	
CC5	0,71	0,75	0,89	0,81	1,77	1,69	0,45	0,37
	$\pm 0,04$	$\pm 0,03$	$\pm 0,06$	$\pm 0,05$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,06$	$\pm 0,04$
	p< 0,001		p< 0,001		p= 0,007		p< 0,001	
CC total	0,66	0,7	0,88	0,81	1,66	1,60	0,48	0,42
	$\pm 0,04$	$\pm 0,02$	$\pm 0,1$	$\pm 0,03$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,03$
	p< 0,001		p< 0,001		p= 0,005		p< 0,001	

Teste Mann-Whitney de diferenças entre os grupos

Os resultados dos índices estão expressos em médias dos grupos $\pm$ desvios padrão. CC: Corpo caloso; CC1 a CC5: segmentos do corpo caloso em ordem crescente do segmento mais anterior para o mais posterior; CC total: corpo caloso total; $\lambda_{||}$: difusividade axial; DM: difusividade média; $\lambda_{\perp}$: difusividade radial; EMRR: grupo de pacientes com esclerose múltipla remitente-recorrente; FA: fração de anisotropia; GC: Grupo controle; p= valor de p (nível de significância do teste)

As células azuis representam as alterações estatisticamente significativas. A célula cinza destaca uma tendência estatística encontrada.

B) Correlação entre os parâmetros de *DTI* do CC e as cargas lesionais no grupo EMRR

Os dados da Tabela 3 demonstram as correlações entre os resultados de *DTI* dos segmentos do CC e do CC total com as idades, duração da doença (DD) e cargas lesionais no grupo EMRR. As principais correlações foram encontradas entre o volume lesional T2-*FLAIR* e os índices de *DTI*, sendo evidente em todos os segmentos do CC e no CC total, mais frequente nos índices de DM e $\lambda_{\perp}$ e, em terceiro lugar, na FA. O volume lesional T1 apresentou correlações significativas com os índices de FA, DM e $\lambda_{\perp}$ apenas no segmento CC2. Houve uma fraca tendência à correlação negativa no segmento CC1. As cargas lesionais não demonstraram correlações significativas com a $\lambda_{||}$.

A DD apresentou uma correlação isolada com a $\lambda_{||}$ no segmento CC5 e uma tendência no segmento CC1.

A idade da amostra não demonstrou correlações significativas com os índices de *DTI* do CC, observando-se apenas fracas tendências esparsas de correlação negativa com a DM nos segmentos CC1, CC4 e no CC total.

Tabela 3 - Correlação entre os parâmetros de DTI de cada segmento do CC, as cargas lesionais, as idades e a duração da doença nos pacientes nos pacientes com EMRR

		Idade	DD	CL T1	CL T2-FLAIR
CC1	FA	0,17 (0,38)	-0,001 (0,99)	-0,31 (0,09)	-0,48 (0,006)
	DM	-0,31 (0,09)	-0,22 (0,24)	0,24 (0,19)	0,35 (0,05)
	$\lambda_{ }$	-0,21 (0,25)	-0,34 (0,06)	0,11 (0,56)	0,10 (0,60)
	$\lambda_{\perp}$	-0,24 (0,19)	-0,09 (0,64)	0,31 (0,09)	0,43 (0,02)
CC2	FA	0,23 (0,21)	-0,21 (0,25)	-0,38 (0,04)	-0,62 (<0,001)
	DM	-0,05 (0,81)	-0,20 (0,28)	0,34 (0,07)	0,39 (0,03)
	$\lambda_{ }$	0,08 (0,69)	-0,25 (0,17)	0,16 (0,39)	0,11 (0,57)
	$\lambda_{\perp}$	-0,22 (0,24)	0,08 (0,67)	0,50 (0,005)	0,65(<0,001)
CC3	FA	0,09 (0,64)	-0,14 (0,47)	-0,15 (0,43)	-0,20 (0,28)
	DM	-0,05 (0,79)	0,14 (0,45)	0,26 (0,17)	0,38 (0,03)
	$\lambda_{ }$	-0,02 (0,91)	0,08 (0,67)	0,13 (0,50)	0,18 (0,33)
	$\lambda_{\perp}$	-0,15 (0,41)	0,20 (0,27)	0,21 (0,25)	0,34 (0,06)
CC4	FA	0,19 (0,32)	0,13 (0,50)	-0,15 (0,43)	-0,26 (0,15)
	DM	-0,32 (0,08)	0,04 (0,83)	0,14 (0,46)	0,35 (0,05)
	$\lambda_{ }$	-0,14 (0,46)	-0,06 (0,77)	0,05 (0,80)	0,11 (0,54)
	$\lambda_{\perp}$	-0,20 (0,28)	-0,02 (0,93)	0,1 (0,59)	0,37 (0,04)
CC5	FA	0,004 (0,98)	0,10 (0,77)	-0,27 (0,14)	-0,39 (0,03)
	DM	-0,07 (0,71)	0,31 (0,10)	0,10 (0,6)	0,26 (0,16)
	$\lambda_{ }$	-0,08 (0,68)	0,47 (0,008)	-0,07 (0,70)	-0,01 (0,95)
	$\lambda_{\perp}$	-0,14 (0,44)	0,15 (0,41)	0,18 (0,34)	0,36 (0,05)
CC total	FA	0,28 (0,14)	-0,08 (0,67)	-0,21 (0,25)	-0,54 (0,002)
	DM	-0,33 (0,07)	0,04 (0,82)	0,24 (0,20)	0,48 (0,007)
	$\lambda_{ }$	-0,16 (0,38)	-0,11 (0,56)	0,10 (0,58)	0,15 (0,42)
	$\lambda_{\perp}$	-0,24 (0,19)	0,11 (0,55)	0,20 (0,27)	0,54 (0,002)

Os resultados expressam a correlação de Spearman com o respectivo nível de significância (p) entre parênteses. CC: corpo caloso; CC1 a CC5: segmentos do corpo caloso em ordem crescente do segmento mais anterior para o mais posterior; CC total: corpo caloso total; CL T1= carga ou volume lesional T1; CL T2-FLAIR: carga ou volume lesional T2-FLAIR; $\lambda_{||}$: difusividade axial; DM: difusividade média; $\lambda_{\perp}$: difusividade radial; EMRR: grupo de pacientes com esclerose múltipla remitente-recorrente; FA: fração de anisotropia. As células azuis representam as alterações estatisticamente significativas. As células cinzas demonstram tendências estatísticas encontradas.

C) Correlação entre os parâmetros de *DTI* do CC, as cargas lesionais, idade e duração da doença e os escores da *EDSS*, no grupo EMRR

Análises de regressão linear multivariada foram utilizadas para avaliar a correlação entre os marcadores de imagem, a idade e a duração da doença e os escores de *EDSS*. Os dados da Tabela 4 mostram os resultados usando os escores da *EDSS*, como variáveis dependentes, e as cargas lesionais, como variáveis independentes, sem identificação de correlações significativas. A significância da regressão linear como um todo é também baixa (0,23), bem como o grau de oscilação da variável dependente em função da regressão proposta (*R Square*= 0,15).

Tabela 4 - Regressão linear multivariada, utilizando o *EDSS* como variável dependente e as cargas lesionais como covariáveis independentes

R Square: 0,15 / Significância da regressão (p): 0,23				
	B	Erro padrão	t	p
CL T1	0,00	0,00	1,25	0,22
CL T2- <i>FLAIR</i>	0,00	0,00	-0,28	0,78

CL T1: carga lesional T1= volume de lesões hipointensas no encéfalo

CL T2-*FLAIR*: carga lesional T2-*FLAIR*= volume de lesões hiperintensas em T2-*FLAIR* no encéfalo

EDSS: *Expanded Disability Status Scale*

p: nível de significância da correlação de cada variável

R Square: fração de variação da variável dependente em função do modelo de regressão proposto

t: correlação parcial, obtida pela divisão do coeficiente B/erro padrão

Não foram também identificadas correlações significativas entre a duração da doença e a idade dos pacientes e os escores de *EDSS* (Tabela 5).

Tabela 5 - Regressão linear multivariada, utilizando o *EDSS* como variável dependente e a idade e duração da doença como covariáveis independentes

R Square: 0,05 / Significância da regressão (p): 0,48				
	B	Erro padrão	t	p
DD	0,00	0,00	1,22	0,23
Idade	0,00	0,00	0,04	0,97

EDSS: Expanded Disability Status Scale

B: coeficiente de regressão

DD: duração da doença

p: nível de significância da correlação de cada variável

R Square: fração de variação da variável dependente em função do modelo de regressão proposto

t: correlação parcial, obtida pela divisão do coeficiente B/erro padrão

Os dados da Tabela 6 mostram os resultados da regressão linear multivariada, utilizando os resultados de $\lambda_{||}$ de cada segmento do CC e do CC total dos pacientes com EMRR, como covariáveis independentes. O modelo de regressão mostrou correlação significativa entre a $\lambda_{||}$ e o *EDSS* (0,01), com os segmentos CC2 e CC5 demonstrando correlações mais intensas.

Tabela 6 - Regressão linear multivariada, utilizando o *EDSS* como variável dependente e os resultados regionais de difusividade axial como covariáveis independentes

R Square: 0,49 / Significância da regressão (p): 0,01				
	B	Erro padrão	t	p
$\lambda_{ }$ CC1	0,60	2,39	0,25	0,80
$\lambda_{ }$ CC2	4,62	1,49	3,09	0,00
$\lambda_{ }$ CC3	0,48	1,83	0,26	0,80
$\lambda_{ }$ CC4	-0,80	1,98	-0,40	0,69
$\lambda_{ }$ CC5	6,24	1,83	3,40	0,00
$\lambda_{ }$ CC total	-6,82	5,33	-1,28	0,21

CC: corpo caloso; CC1 a CC5: segmentos do corpo caloso, crescente de anterior a posterior; CC total: corpo caloso total

$\lambda_{||}$: difusividade axial

EDSS: *Expanded Disability Status Scale*

p: nível de significância da correlação de cada variável

R Square: fração de variação da variável dependente em função do modelo de regressão proposto

t: correlação parcial, obtida pela divisão do coeficiente B/erro padrão

As células azuis destacam as correlações significativas com segmentos do CC

Os dados da Tabela 7 mostram os resultados da regressão linear multivariada utilizando os resultados de $\lambda_{\perp}$ de cada segmento do CC e do CC total dos pacientes com EMRR como co-variáveis independentes.

Tabela 7 - Regressão linear multivariada, utilizando o *EDSS* como variável dependente e os resultados regionais de difusividade radial como covariáveis independentes

R Square: 0,32 / Significância da regressão (p): 0,12				
	B	Erro padrão	t	p
$\lambda_{\perp}$ CC1	7,07	1,38	1,97	0,06
$\lambda_{\perp}$ CC2	1,09	2,25	0,48	0,63
$\lambda_{\perp}$ CC3	7,00	2,96	2,37	0,03
$\lambda_{\perp}$ CC4	-4,34	2,80	-1,55	0,13
$\lambda_{\perp}$ CC5	4,22	4,01	1,05	0,30
$\lambda_{\perp}$ CC total	-9,02	7,40	-1,22	0,23

CC: corpo caloso; CC1 a CC5: segmentos do corpo caloso, crescente de anterior a posterior; CC total: corpo caloso total

$\lambda_{\perp}$: difusividade axial

EDSS: *Expanded Disability Status Scale*

p: nível de significância da correlação de cada variável

R Square: fração de variação da variável dependente em função do modelo de regressão proposto

t: correlação parcial, obtida pela divisão do coeficiente B/erro padrão

A célula azul destacam as correlações significativas com o segmento CC3 do CC

A regressão linear multivariada utilizando os resultados de $\lambda_{\perp}$ como variáveis independentes não apresentou uma correlação significativa (0,12). Mas, observou-se uma correlação isolada com a $\lambda_{\perp}$ CC3, sendo realizada um teste de regressão linear dessa variável isoladamente para isso (Tabela 8).

Tabela 8 - Regressão linear simples, utilizando o *EDSS* como variável dependente e os resultados regionais de difusividade radial de CC3 como covariável independente

R Square: 0,27 / Significância da regressão (p): 0,00				
	B	Erro padrão	t	P
$\lambda_{\perp}$ CC3	6,45	1,36	4,74	0,00

CC3: segmento médio posterior do corpo caloso

$\lambda_{\perp}$: difusividade radial

EDSS: *Expanded Disability Status Scale*

p: nível de significância da correlação de cada variável

R Square: fração de variação da variável dependente em função do modelo de regressão proposto

t: correlação parcial, obtida pela divisão do coeficiente B/erro padrão

As células azuis destacam a correlação significativa com o segmento CC3 do CC

Os dados da Tabela 9 mostram os resultados da regressão linear multivariada, utilizando os resultados de FA de cada segmento do CC e do CC total dos pacientes com EMRR, como covariáveis independentes.

Tabela 9 - Regressão linear multivariada, utilizando o *EDSS* como variável dependente e os resultados regionais de fração de anisotropia como covariáveis independentes

R Square: 0,31 / Significância da regressão (p): 0,00				
	B	Erro padrão	t	p
FA CC1	-5,25	3,21	-1,63	0,11
FA CC2	-0,37	2,38	-0,16	0,88
FA CC3	-2,91	2,19	-1,33	0,19
FA CC4	3,08	2,18	1,42	0,16
FA CC5	-3,94	4,14	-0,95	0,35
FA CC total	-2,16	7,48	-0,29	0,77

EDSS: Expanded Disability Status Scale

R Square: fração de variação da variável dependente em função do modelo de regressão proposto

t: correlação parcial, obtida pela divisão do coeficiente B/erro padrão

p: nível de significância da correlação de cada variável

FA: fração de anisotropia

CC: corpo caloso; CC1 a CC5: segmentos do corpo caloso, crescente de anterior a posterior; CC total: corpo caloso total

Os dados da tabela 10 mostram os resultados da regressão linear multivariada, utilizando os resultados de FA de cada segmento do CC e do CC total dos pacientes com EMRR, como covariáveis independentes.

Tabela 10 - Regressão linear multivariada, utilizando o *EDSS* como variável dependente e os resultados regionais de difusividade média como covariáveis independentes

R Square: 0,49 / Significância da regressão (p): 0,01				
	B	Erro padrão	t	p
DM CC1	4,77	3,64	1,31	0,20
DM CC2	4,05	2,24	1,81	0,08
DM CC3	6,83	2,94	2,32	0,03
DM CC4	-3,34	3,31	-1,01	0,32
DM CC5	9,78	3,09	3,16	0,00
DM CC total	-14,78	8,12	-1,82	0,08

CC: corpo caloso; CC1 a CC5: segmentos do corpo caloso, crescente de anterior a posterior; CC total: corpo caloso total

DM: difusividade média

EDSS: Expanded Disability Status Scale

p: nível de significância da correlação de cada variável

R Square: fração de variação da variável dependente em função do modelo de regressão proposto

t: correlação parcial, obtida pela divisão do coeficiente B/erro padrão

As células azuis destacam as correlações significativas com segmentos do CC

4.3 DIFERENÇAS REGIONAIS NA ESPESSURA CORTICAL ENTRE OS GRUPOS EMRR E CONTROLE

A) Análise da diferença das espessuras corticais entre os grupos

A espessura cortical média total (Ecc) ou de cada um dos hemisférios direito (Echc dir) ou esquerdo (Echc esq) não apresentou diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,1$) (Tabela 11).

Tabela 11 - Espessuras corticais médias nos grupos EMRR e GC

	EMRR	GC	p
Ecc (mm)	2,57 ± 0,1	2,61 ± 0,1	0,15
Echc dir (mm)	2,57 ± 0,1	2,61 ± 0,1	0,10
Echc esq (mm)	2,58 ± 0,1	2,61 ± 0,1	0,23

Os resultados expressam as espessuras corticais médias em mm observadas em ambos os hemisférios cerebrais (Ecc), no hemisfério cerebral direito (Echc dir) e esquerdo (Echc esq) no grupo de pacientes com esclerose múltipla remitente-recorrente (EMRR) e no grupo controle (GC). O nível de significância (p) foi obtido pelo teste de Mann-Whitney.

A análise de grupo “vértice a vértice” das regiões corticais demonstrou correlações negativas entre a variável qualitativa de grupo em algumas áreas corticais localizadas no lobo temporal esquerdo, abrangendo as porções anteriores dos giros temporal superior, médio e inferior e o polo temporal, com nível de significância de $-3,00 -\log(10)p$. À direita, observam-se três áreas com correlações negativas significativas: a primeira, abrangendo a *pars orbitalis*, a região orbitofrontal e parte da ínsula

(significância de $-4,00 -\log(10)p$); a segunda, abrangendo as porções anteriores do giros temporal superior e médio e pequena porção do giro temporal transversal (significância de $-3,15 -\log(10)p$), e uma terceira região, abrangendo a porção posterior do giro temporal inferior, porções do giro parietal inferior e do giro latero-occipital (significância de $-1,90 -\log(10)p$) (Figura 11). Ou seja, os indivíduos classificados no grupo EMRR possuem espessura cortical significativamente menor nessas áreas, em relação ao grupo controle.

Figura 11 - Áreas de atrofia cortical significativa no grupo EMRR em relação ao grupo controle (GC). As áreas azuis demonstram áreas com redução significativa da espessura cortical no grupo com esclerose múltipla remittente-recorrente (EMRR) em relação ao grupo controle. No hemisfério cerebral esquerdo, a área demarcada abrange as porções anteriores do lobo temporal. À direita, observam-se afilamentos corticais significativos na pars orbitalis e região orbitofrontal do lobo frontal, na região insular, no lobo temporal (região anterior e transição temporo-occipital), na região parietal inferior e latero-occipital

B) Análise da correlação entre a espessura cortical e as cargas lesionais no grupo EMRR

Isolando-se o grupo EMRR e utilizando-se as cargas de lesões hipointensas em T1 (CL T1) como variáveis preditivas, observam-se algumas áreas de correlações negativas significativas em ambos os hemisférios, ou seja, quanto maior a carga lesional menor será a espessura em algumas áreas corticais nos pacientes com EMRR (Figura 12).

No hemisfério cerebral esquerdo, observam-se três áreas de correlação significativa: a primeira, abrangendo pequena porção do giro latero-orbitofrontal e da ínsula, o polo temporal e porção do terço anterior do giro temporal superior (significância de $-3,30 -\log(10)p$); a segunda, abrangendo porções anteriores dos giros temporal superior e médio (significância de $-2,09 -\log(10)p$), e a terceira, abrangendo parte do giro frontal superior (significância de $-1,77 -\log(10)p$).

No hemisfério cerebral direito, observa-se uma área que envolve os terços médio e anterior dos giros temporal superior e médio, com significância de $-4,00 -\log(10)p$.

Figura 12 - Áreas de correlação entre as cargas lesionais T1 e a espessura cortical no grupo EMRR. As áreas azuis demonstram áreas de correlação negativa significativa entre as cargas de lesão T1 e a espessura cortical no grupo com esclerose múltipla remitente-recorrente (EMRR). No hemisfério cerebral esquerdo, observam-se três áreas em que a espessura cortical é menor com o aumento da carga lesional, localizadas no lobo temporal, em pequena porção orbito-frontal e da ínsula e no giro frontal superior. À direita, observam-se correlações semelhantes no lobo temporal, abrangendo os giros temporal superior e médio

Utilizando-se as cargas lesionais T2-*FLAIR* como variável preditiva, observam-se correlações negativas significativas em áreas semelhantes às encontradas na análise da correlação com as cargas lesionais T1, porém com uma extensão discretamente menor (Figura 13).

No hemisfério cerebral esquerdo, observam-se dois conglomerados significativos, o primeiro deles abrangendo uma diminuta porção da ínsula e porções do polo temporal e giro temporal superior (significância de -3,52 –

$\log(10)p$) e outro abrangendo porções do giro frontal superior (significância de $-2,41 -\log(10)p$).

No hemisfério cerebral direito, nota-se um pequeno conglomerado abrangendo as porções anteriores dos giros temporal superior, médio e inferior e pequena porção do polo temporal (significância de $-2,82 -\log(10)p$).

Figura 13 - Áreas de correlação entre as cargas lesionais T2-FLAIR e a espessura cortical no grupo EMRR. As áreas azuis demonstram áreas de correlação negativa significativa entre as cargas de lesão T2-FLAIR e a espessura cortical no grupo com esclerose múltipla remitente-recorrente (EMRR). No hemisfério cerebral esquerdo, observam-se duas áreas em que a espessura cortical é menor com o aumento da carga lesional, uma delas localizada no lobo temporal e diminuta porção da ínsula e a outra no giro frontal superior. À direita, observa-se correlação negativa no lobo temporal, abrangendo pequenas porções dos giros temporal superior, médio e inferior, bem como o polo temporal

C) Análise da correlação entre a espessura cortical e os escores da *EDSS* e a duração da doença no grupo EMRR

Observa-se um conglomerado cortical de correlação negativa entre os escores de *EDSS* e a espessura cortical localizado no giro frontal superior do hemisfério cerebral esquerdo (significância de $-1,44 -\log(10)p$) (Figura 14). Não foram encontradas correlações com o *EDSS* no hemisfério direito.

Figura 14 - Correlação entre os escores da *EDSS* e a espessura cortical no grupo EMRR. A área azul indica o conglomerado cortical de correlação negativa encontrada entre os escores da *EDSS* e a espessura cortical no giro frontal superior do hemisfério cerebral esquerdo, indicando que a espessura cortical nessa região demonstra uma atrofia maior nos indivíduos com maiores escores naquela escala

Não foram encontradas áreas de correlação significativa entre a espessura cortical e a duração da doença.

Foram realizadas transformações inversas com base nos conglomerados corticais resultantes nas imagens médias (*fsaverage*) para os espaços de imagem nativos de cada indivíduo. A transformação inversa dos conglomerados corticais com resultados estatísticos significativos de redução da espessura cortical no grupo EMRR (demonstradas na Figura 12) foi obtida pelos conglomerados corticais: temporal esquerdo (Temp-Esq); fronto-insular direito (Front-Ins Dir); temporal direito (Temp-Dir), e temporoparieto-occipital direito (Temppar-occip Dir).

Por meios da imagem obtida da área resultante no espaço nativo de cada indivíduo nos grupos controle e pacientes, foi obtida a espessura cortical de cada conglomerado.

Os resultados das médias e desvios-padrão dessas regiões nos grupos EMRR e controle (GC) estão demonstrados nos dados da Tabela 12 (expostos em detalhes no anexo E), onde são apresentados também os resultados dos testes de Mann-Whitney de comparação entre os grupos. Todas as áreas demonstram redução estatisticamente significativa da espessura cortical no grupo EMRR.

Tabela 12 - Médias das espessuras corticais nas áreas de atrofia significativa no grupo EMRR

	EMRR	GC	p
Temp Esq (mm)	3,06 ± 0,31	3,34 ± 0,22	0,0001
Front-Ins Dir (mm)	2,95 ± 0,17	3,13 ± 0,14	<0,0001
Temp-Dir (mm)	3,06 ± 0,24	3,28 ± 0,20	0,0002
Temppar-occip Dir (mm)	2,49 ± 0,21	2,72 ± 0,19	0,0002

Teste Mann-Whitney de diferença entre os grupos.

Os resultados das médias das espessuras corticais nos grupos de pacientes com esclerose múltipla remitente-recorrente (EMRR) e controle (GC) estão expressos em média (mm) ± desvio padrão. Na última coluna, estão expressos os níveis de significância (p) de cada teste estatístico.

Front-Ins Dir: conglomerado fronto-insular direito; Temp-Dir: conglomerado temporal direito; Temp-Esq: conglomerado temporal esquerdo; Temppar-occip Dir: conglomerado temporoparieto-occipital direito.

5 Discussão

5.1 AS CARACTERÍSTICAS DE *DTI* NO CORPO CALOSO NOS PACIENTES COM EMRR

A EM é uma doença primariamente desmielinizante que cursa com a destruição das células que compõem a bainha de mielina, tanto nas placas lesionais como no tecido cerebral aparentemente normal^{105, 106}. A destruição das bainhas de mielina, por si só, determina uma desorganização microarquitetural no tecido cerebral, reduzindo as barreiras celulares que orientam a difusão da água nesses espaços, corroborando para a redução da FA na substância branca. Concomitantemente, há um aumento na água livre tecidual, o que pode ser consequência, tanto da lise celular como dos processos inflamatórios que acompanham a EM, aumentando a permeabilidade celular e a hidratação local.

O CC é a maior comissura cerebral, com fibras axonais que se conectam amplamente ao córtex cerebral de todos os lobos cerebrais, interconectando os dois hemisférios supratentoriais^{41, 42}. Pela sua representatividade espacial na substância branca encefálica, pode-se inferir que a distribuição da lesão em suas fibras apresenta certa correlação com a disseminação da patologia no compartimento supratentorial. Dessa maneira, as alterações difusas encontradas na FA e DM no CC fortalecem os achados de estudos anteriores que demonstram sinais de desmielinização e desorganização tecidual difusa na EM¹⁵⁰.

Um dos segmentos do CC, o CC3, que representa o tronco médio posterior, apresentou menor redução da FA, em comparação aos demais segmentos. A análise estatística demonstrou apenas uma tendência à diminuição da FA nos pacientes em relação ao grupo controle. Algumas hipóteses podem explicar esse achado. O CC é composto por fibras axonais altamente orientadas e compactas. Ele tende a manter a densidade das fibras de cada uma de suas regiões relativamente constante, após as variações de volume ⁴⁸. Dessa maneira, pode-se interpretar que, após as agressões iniciais da EM, a substância branca do CC pode sofrer alterações adaptativas, com colapamento ou aproximação de suas fibras ocupando o espaço das fibras perdidas, mantendo a densidade e a orientação das fibras, o que pode resultar em uma pseudonormalização de alguns índices de *DTI* em alguns estágios da doença, conforme discutido anteriormente por Mesaros *et al.* ¹⁵¹. Estes autores observaram fenômeno semelhante no CC nos pacientes com EM benigna, demonstrando diferenças na DM do CC entre os pacientes sem e com déficit cognitivo, sem diferenças significativas na FA em algumas regiões correspondentes.

Outro fator que pode explicar a discreta diferença das medidas de FA no segmento CC3 é a diferença na composição das fibras do CC, o que pode conduzir, tanto a uma sensibilidade diferenciada às agressões patológicas como a uma adaptação microarquitetural diferente às lesões celulares em cada segmento de substância branca. Apesar de sua aparência macroscópica homogênea, o CC possui uma organização microestrutural particular, com fibras de diferentes espessuras e graus de

mielinização, além de variações na densidade axonal entre os segmentos ⁴⁷⁻
⁴⁹. O grau de mielinização segue a especialização somatotópica e funcional das fibras calosais, atendendo às diferentes demandas de velocidade de condução neural. Observou-se que os segmentos centrais, sobretudo o tronco médio posterior e o istmo, por estarem ligados à conexão inter-hemisférica das áreas motoras e sensitivas primárias, apresentam as fibras mais espessas e mielinizadas ⁴⁴. É possível que as fibras das regiões mais mielinizadas demorem mais tempo para apresentar uma destruição crítica da mielina a ponto de demonstrar uma desorganização microestrutural detectável pela FA, principalmente no tronco médio posterior, que é uma das regiões mais mielinizadas do CC. Outra hipótese, sugerida no estudo de Evangelou *et al.* ¹⁵² é de que as fibras axonais menos espessas são mais susceptíveis às agressões patológicas da EM. Sendo assim, as regiões mais sujeitas ao dano celular inicial são as compostas por fibras associativas, presentes, mais abundantemente, nas extremidades do CC. Por outro lado, as regiões mais centrais, com fibras mais espessas e mielinizadas seriam atingidas mais tardiamente.

A análise vetorial ou a decomposição dos autovalores do TD pode contribuir na discussão desses achados. Conforme proposto por estudos anteriores, a $\lambda_{\perp}$ vem sendo utilizada como marcador de desmielinização, e a $\lambda_{\parallel}$ tem sido utilizada como marcador de perda axonal ^{31, 32}. Apesar da necessidade do aprofundamento de estudos histológicos para confirmar a especificidade e correspondência microscópica desses índices ¹⁵³, a maior parte dos estudos de *DTI* na EM tem demonstrado áreas de aumento nas $\lambda_{\perp}$

e $\lambda_{||}$ na substância branca e correlacionando esses achados a aquelas alterações histológicas propostas^{138, 154, 155}. Nos resultados deste estudo, observou-se um aumento difuso da $\lambda_{\perp}$ no CC de nossa amostra de pacientes com EMRR, porém um aumento significativo da $\lambda_{||}$ apenas nos segmentos CC2, CC3 e CC5, que correspondem ao tronco médio anterior e posterior e ao esplênio do CC. Esse achado foi compatível com uma desmielinização difusa, porém uma predominância de perda axonal ou axonopatia nos segmentos com a $\lambda_{||}$ alterada. Retornando à composição de fibras do CC, as descrições histológicas advogam que o joelho e o esplênio do CC possuem as maiores concentrações de fibras finas e menos mielinizadas, apresentando composições microscópicas semelhantes^{44, 47, 48}. Um estudo experimental em ratos demonstrou também que a concentração de fibras nesses segmentos é semelhante no joelho e esplênio e mais alta que nos demais segmentos⁴⁹. Se nos basearmos apenas na espessura das fibras para explicar a sensibilidade semelhante às agressões patológicas da EM, conforme proposto anteriormente^{25, 152, 156}, esperaríamos observar alterações semelhantes no joelho e esplênio do CC. Mas, os resultados obtidos demonstram sinais de perda axonal mais precoce no esplênio do que no joelho da comissura, o que abre a possibilidade para outras hipóteses.

Por um lado, a sensibilidade das diferentes fibras de substância branca pode estar associada a outras características das fibras, como comprimento ou abrangência de conexões corticais, que não foram mensuradas no presente estudo. Mas também, a distribuição regional das

áreas de perda axonal pode estar associada a fatores intrínsecos da doença, como por exemplo, uma distribuição preferencial ou mais acentuada da inflamação e desmielinização para algumas regiões encefálicas nos diferentes estágios da doença. Desde as primeiras revisões dos critérios diagnósticos da EM ⁵, descreve-se o acometimento precoce e preferencial das regiões temporais pela EM, o que foi confirmado mais recentemente pela quantificação de maiores volumes lesionais nas regiões temporais, inferoparietais e occipitais nos pacientes com *EDSS* menor ou igual a 3 ⁵¹. Essas áreas correspondem às projeções de algumas das fibras associativas do esplênio do CC, o que poderia ser um dos fatores que conduzem às alterações observadas na $\lambda_{||}$ neste segmento.

Outros estudos demonstraram também alterações semelhantes na $\lambda_{||}$ nos segmentos do CC em pacientes com síndromes desmielinizantes, com um predomínio de sinais de perda axonal nos segmentos centrais e no esplênio ^{138, 154}. O estudo de Onu *et al.* ¹³⁸ avaliou pacientes com EMRR e EMSP, enquanto Lin *et al.* ¹⁵⁴ avaliaram indivíduos com SCI. Ambos observaram alterações difusas na $\lambda_{\perp}$ e alterações segmentares na $\lambda_{||}$, demonstrando a existência de uma distribuição particular da degeneração axonal, desde os estágios mais iniciais da doença.

Outro estudo ¹⁵⁷, embora tenha encontrado uma distribuição diferente de alterações da $\lambda_{||}$, demonstrando alterações mais significativas nessa medida no tronco posterior e istmo dos pacientes com EM, notou um maior acometimento do esplênio em relação ao joelho do CC. Esse estudo incluía pacientes com maiores escores de *EDSS*, variando de 0 a 7, o que pode

explicar parcialmente as diferenças regionais nos índices de *DTI* mensurados. Apesar das diferenças regionais nos resultados de *DTI*, esse estudo também observou alterações difusas na $\lambda_{\perp}$ e na DM, com alterações localizadas na $\lambda_{\parallel}$, o que pode ser interpretado pela presença de desmielinização difusa, porém, perda axonal localizada e mais proeminente em algumas regiões do tecido cerebral.

Três principais hipóteses podem explicar a lesão axonal na substância branca: (1) existe uma axonopatia primária que, independentemente da inflamação ou degeneração conduz a perda neuronal e axonal; (2) a perda axonal é causada pela transecção das fibras nas lesões desmielinizantes e degeneração Walleriana secundária, e (3) a lesão axonal é secundária ao acúmulo de desmielinização, seja nas lesões macroscópicas, seja no tecido aparentemente normal, conduzindo a uma axonopatia secundária.

A hipótese de neuropatia primária na EMRR é menos provável, pois tem sido valorizada principalmente no subtipo EMPP, na qual existem sinais de perda axonal sem menor acúmulo de placas lesionais, sendo observada mais precocemente e sem forte correlação com o grau de desmielinização ^{86,}

156, 158

A hipótese de degeneração Walleriana é relativamente antiga, mas até hoje bem aceita. Existe uma correlação temporal e espacial entre o acúmulo de lesões desmielinizantes e a progressão da EM, observando-se um maior volume lesional nos pacientes com maior tempo de evolução da doença, sobretudo na fase remitente-recorrente ¹². No CC, observou-se que

o grau de perda axonal estava correlacionado à concentração de lesões nas áreas de projeção de suas fibras ¹⁵⁶, tendo sido também observada correlação semelhante com o grau de perda axonal no tecido cerebral aparentemente normal ²⁵.

Apenas a formação de placas visíveis parece explicar parcialmente a perda axonal na EMRR. Em parte pelo caráter histopatológico heterogêneo atribuído às lesões macroscópicas, que podem apresentar espectros variáveis de edema, degeneração e desmielinização, e uma parcela dessas lesões apresentam áreas de remielinização e depósito de tecido glial frouxo e menos organizado ^{11, 159}. Outra justificativa deve-se, provavelmente, ao caráter mais disseminado da desmielinização e perda axonal, que podem ser encontrados na SBAN em métodos mais avançados de IRM, como a *DTI* ^{160, 161}.

Seja no interior das placas lesionais ou no tecido cerebral aparentemente normal, tem-se sugerido que a desmielinização é o processo primário da EM e caracteriza um fator preponderante na evolução da doença e na degeneração tecidual. É possível que, na EMRR, a perda mielínica determine a instalação de uma neuropatia secundária. Atribui-se um importante papel neuroprotetor à mielina ¹⁶². A desmielinização pode predispor os axônios à lesão degenerativa, seja pela exposição à toxicidade das células T e outros agentes inflamatórios, seja pela falência dos fatores neurotróficos provenientes dos oligodendrócitos ¹⁶³. A mielina aparenta possuir duas funções principais: uma estrutural e outra fisiológica. Uma vez mielinizados, os axônios dependem do suporte dos oligodendrócitos para a

manutenção da microestrutura dos tratos, mantendo uma organização de microtúbulos que orienta o reconhecimento dos alvos axonais e as relações espaciais entre as fibras. Além disso, os oligodendrócitos produzem uma série de proteínas, moléculas e organelas que são responsáveis pela adesão celular e também pela biossíntese e tráfego de substâncias, apresentando, portanto, funções críticas para o metabolismo e fisiologia neuronais^{162, 164}. Uma das hipóteses patogênicas da EM coloca-a como uma doença inflamatória autoimune com a presença de autoanticorpos cujos alvos encontram-se em proteínas mielínicas específicas, como a proteína básica da mielina, proteína proteolipídica e glicoproteína mielínica do oligodendrócito, dentre outras¹⁶⁵, o que reforça as teorias de que a desmielinização é um fenômeno anterior à perda neuronal. Deve-se considerar, portanto, que a exposição dos axônios à desmielinização, uma possível alteração secundária na fisiologia celular e uma hipotética sensibilidade distinta de grupos celulares podem ser processos que, conjuntamente, conduzem à degeneração tecidual.

Um fator que deve ser considerado é a diferença observada nas correlações entre os distintos índices de *DTI* com as cargas lesionais. Enquanto as FA, DM e $\lambda_{\perp}$ se correlacionaram com os volumes de lesões macroscópicas, não se observou correlação significativa com a $\lambda_{\parallel}$. Isso aponta para a existência de causas distintas para os diferentes processos histopatológicos no SNC, na EM. Por um lado, existe uma alteração microarquitetural difusa na substância branca do CC, que cursa com alterações nas FA, DM e $\lambda_{\perp}$. Desses índices, o mais específico é a $\lambda_{\perp}$, que

vem sendo associada à desmielinização ³¹. O fato desses índices correlacionarem-se com os volumes lesionais é um provável indício de que a desmielinização associa-se ao acúmulo e recorrência dos processos inflamatórios. A ausência dessa correlação com a $\lambda_{||}$ abre portas para uma nova discussão. A axonopatia, na EM, pode ser desencadeada pelos processos desmielinizantes que cursam com a doença, mas pode também ser influenciada por uma série de fatores, ainda não totalmente esclarecidos, dentre eles, as características morfológicas dos axônios, como espessura e comprimento, particularidades fisiológicas das fibras ou outras causas, como características genéticas ou moleculares.

As fortes correlações da $\lambda_{||}$ com os escores da *EDSS*, de certa forma, reforçam seu potencial como marcador de degeneração tecidual. A *EDSS* vem recebendo diversas críticas na caracterização dos déficits funcionais na EM, pois ela é bastante voltada para as funções sensorimotoras e sabe-se que os pacientes com EM apresentam significativas alterações em outros sistemas, desde os estágios iniciais da doença ¹⁶. Mas, essa escala possui grande valor na estratificação dos tempos evolutivos da doença, demarcando as passagens para as fases progressivas, mais influenciadas pelos processos degenerativos ^{15, 166}. Sendo assim, a correlação entre a $\lambda_{||}$ e os escores da *EDSS* podem estar associados à progressão da EM e ao acúmulo dos processos degenerativos.

Pelo fato da $\lambda_{||}$ ser representada pelo autovalor paralelo às fibras axonais, é plausível associá-la à perda ou ruptura de membranas axonais. Mas ela deve ser interpretada com cuidado, pois restringir a degeneração

axonal a apenas um evento histopatológico simplifica demasiadamente o processo de degeneração celular ¹⁵³. O axônio saudável é caracterizado como um cilindro semipermeável. Durante o processo de degeneração, o axônio passa por modificações morfológicas, sendo propostos três modelos de lesão, que alteram a sua forma cilíndrica de modo progressivo: protuberâncias ou dilatações “varicosas”; constrictões, e secção ¹⁶⁷. A alteração na configuração axonal pode modificar as características da difusão das moléculas de água nos tecidos, devendo-se atentar para o fato de que as alterações na $\lambda_{||}$ possam representar diversos estágios evolutivos na degeneração celular ou alteração da morfologia axonal, secundárias à patologia, não sendo totalmente esclarecido como esse índice se comporta em cada uma dessas fases.

Os modelos patológicos evolutivos da EM mais difundidos na atualidade defendem que a doença inicia-se com áreas focais desmielinizantes que rapidamente cursam com disseminação dos eventos inflamatórios para o tecido cerebral aparentemente normal, conduzindo a uma desmielinização difusa, já nos estágios iniciais da doença. A persistência da inflamação e desmielinização determina uma cadeia de eventos que culmina na degeneração tecidual com perda ou degeneração axonal e neuronal. Com a cronicidade da doença e a recorrência das exacerbações inflamatórias, os mecanismos compensatórios do tecido cerebral tendem a se esgotar, com acúmulo de tecido desmielinizado e/ou remielinização desorganizada e, nessa fase, instala-se uma progressão da degeneração tecidual parcialmente independente de novos insultos

inflamatórios, iniciando-se a fase progressiva da EM ¹⁵⁰. Mas, apesar dessa sequência lógica ser plausível, ainda não são totalmente esclarecidos os motivos pelos quais existe uma distribuição regional específica, provavelmente progressiva, na degeneração tecidual.

De acordo com estes achados de *DTI*, pode-se inferir que os índices de FA, DM e $\lambda_{\perp}$ são sensíveis em detectar alterações na substância branca do CC o que, provavelmente, está associado à uma perda difusa na complexidade microestrutural do tecido. Os índices de difusividade, especialmente o aumento na DM, são frequentemente associados ao aumento de água livre no tecido secundariamente à lise de membranas, mas também associados à atividade inflamatória ¹⁵¹. A $\lambda_{\perp}$ é um índice mais específico que tem demonstrado correlações com o grau de desmielinização do tecido e, por ter demonstrado alterações em todos os segmentos do CC avaliados, vai de acordo com a hipótese de que esse processo patológico é deflagrado precocemente e de modo disseminado na EMRR.

Por outro lado, enquanto esses índices demonstram sensibilidade para a caracterização do dano tecidual difuso na EM, a $\lambda_{\parallel}$ mostra ser um índice mais específico de dano tecidual localizado e, possivelmente, para um grau mais avançado de perda ou lesão celular. Pela sua capacidade em se correlacionar com a patologia axonal, esse índice provavelmente possui uma maior especificidade em caracterizar dano tecidual permanente e a degeneração. Por ter-se encontrado uma distribuição setorizada de alterações na $\lambda_{\parallel}$, pode-se supor a existência de um gradiente evolutivo específico na EMRR, o que também reforça a necessidade de estudos

direcionados e localizados da substância branca encefálica, ou seja, a compreensão evolutiva da doença demanda a segmentação dos espaços encefálicos para a melhor compreensão das síndromes clínicas e do curso da degeneração encefálica nessa doença.

5.2 AS CARACTERÍSTICAS E A DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DA ATROFIA CORTICAL NOS PACIENTES COM EMRR

A atrofia tecidual tem sido considerada um marcador da degeneração tecidual na EM, por ser considerada o resultado final e mais definitivo da perda tecidual nas neuropatias centrais crônicas^{56, 159, 168, 169}. Inicialmente, acreditava-se que a perda volumétrica na substância branca era mais proeminente e significativa na EM, principalmente nos estágios iniciais da doença, pela sua maior concentração de mielina. Mas, mais recentemente, sabe-se que existe uma perda tecidual significativa nos compartimentos de substância cinzenta, cortical e profunda, desde os estágios iniciais da EM^{28, 168}.

A perda volumétrica global e a perda volumétrica da substância branca são bastante evidentes em todos os subtipos da EM, sendo também observada nos quadros de SCI que evoluem para EM, em relação aos indivíduos que permanecem estáveis e livres da doença¹⁷⁰. Embora esses estudos tenham demonstrado com êxito a presença de atrofia em pacientes com EMRR e, em estudos similares, tenha sido mostrado que a taxa de atrofia cerebral é mais acentuada em pacientes com quadros progressivos,

seja EMSP ou EMPP ¹⁷¹, a avaliação dos volumes cerebrais globais ou das frações volumétricas dos compartimentos cerebrais não é capaz de diferenciar os subtipos da EM ¹⁶⁸. A análise global da espessura cortical na nossa amostra também se mostrou ineficaz em detectar atrofia da substância cinzenta nos pacientes com EMRR, possivelmente, pelos baixos escores de *EDSS* e pelo tamanho amostral. Um estudo anterior foi capaz de detectar reduções na espessura cortical global em pacientes com EMRR, porém esse estudo inclui 115 pacientes e os indivíduos com atrofia global significativa apresentavam *EDSS* médio de 2,2. Nesse estudo, os indivíduos com *EDSS* médio de 1,4 também não demonstraram diferenças significativas em relação ao grupo controle ⁵³.

A análise dos padrões de distribuição regional da atrofia tem demonstrado características típicas de degeneração tecidual nos subtipos da EM ^{172, 173} e nos diferentes estágios evolutivos da doença ⁵². Apesar das discretas diferenças nos achados dos diferentes estudos, nos quadros de EMRR existe uma susceptibilidade maior ao acometimento precoce nas regiões temporais, com destaque para o giro temporal superior e em algumas regiões frontais ^{52, 168, 174}. Embora o acometimento de regiões frontais ou fronto-orbitárias seja também precoce na EM, parece haver uma tendência à maior atrofia do giro frontal superior em estágios intermediários da doença, sendo mais proeminente em pacientes com *EDSS* próximos ou maiores a 3 ⁵². Na presente amostra, os pacientes possuíam *EDSS* de 0 a 3, com uma média de escores baixa (1,1), observando-se uma atrofia mais significativa nas regiões temporais e algumas áreas fronto-orbitárias e

insulares. Mas, foram notadas áreas de correlação entre as cargas lesionais e a *EDSS* em uma maior área frontal, com destaque para o giro frontal superior direito, demonstrando existir uma atrofia incipiente nessa região e que está correlacionada com a maior carga lesional e/ou maiores escores da *EDSS*, ou seja, com pacientes em estágios mais avançados da EM.

Interessantemente, embora a maior parte dos indivíduos de nossa amostra apresentassem sintomas piramidais e, em segundo lugar, sensitivos, definindo significativamente seus escores clínicos, não foi observada atrofia significativa nas áreas motoras ou sensitivas primárias. De fato, mesmo em outros estudos, os córtices pré e pós-centrais aparentam ser mais frequentemente e mais intensamente acometidos nas fases ou subtipos progressivos da EM ¹⁷² ou em estágios mais avançados, com *EDSS* maior que 5,5 ⁵². A disfunção motora nos estágios iniciais da EM, com *EDSS* menor que 3 é leve, sem incapacidade significativa na marcha ou mobilidade. É possível que os neurônios ou axônios das áreas motoras e sensitivas primárias sejam mais resistentes ou mais mielinizados ou, então, a atividade inflamatória e desmielinizante que desencadeia a destruição neuronal e a degeneração tecidual seja menos intensa nessas regiões encefálicas nos estágios iniciais da EM.

A maior parte dos estudos anteriores demonstra atrofia precoce mais significativa em áreas corticais associativas, sejam elas temporais, insulares ou frontais ^{52, 56, 168}. Conforme discutido no item anterior desta tese, alguns autores discutem que as regiões associativas possuem fibras mais finas e menos mielinizadas e são, portanto, mais susceptíveis à lesão permanente

¹⁵². Quando foram observados nossos resultados de correlações entre as cargas lesionais em T1 e T2, foram notadas áreas de correlação mais significativa entre os volumes lesionais e a espessura cortical nas áreas corticais associativas, o que pode estar relacionado a uma maior propensão dessas regiões à degeneração secundária aos surtos inflamatórios iniciais. Mas, deve-se considerar também a hipótese de uma maior concentração ou intensidade dos processos inflamatórios nas regiões mais acometidas pelos sinais de degeneração. Embora, neste estudo, não se tenha realizado uma quantificação regional das lesões macroscópicas, foi descrita uma maior concentração de placas lesionais nas regiões temporais, inferoparietais e occipitais tanto em pacientes com EMRR quanto na forma EMSP ⁵¹. A maior incidência de lesões em áreas associativas é observada já há algum tempo, com destaque para as lesões temporais, que caracterizam um achado precoce na EM, tendo sido conferido um alto fator preditivo positivo para elas no diagnóstico inicial da doença ⁵.

A *EDSS* é uma escala altamente ponderada pelo grau de incapacidade motora e de mobilidade, sendo essa uma das críticas à sua utilização como principal escala de avaliação do déficit funcional na EM. Embora tenha um peso menor nessa escala, a função cognitiva é uma das mais precocemente afetadas nos pacientes com EM e baixos escores de *EDSS* ^{151, 175, 176}. Normalmente, seria esperada uma maior correlação entre a espessura cortical do giro pré-central, que compõe a área motora primária, com a *EDSS*, porém, em nossos resultados, as regiões nas quais a redução da espessura cortical correlacionou-se com os escores dessa escala

estavam projetadas na topografia do giro frontal superior, que compõe parte fundamental da área pré-motora. Embora essa área seja parcialmente correlacionada com a motricidade, é implicada sobretudo no planejamento e iniciação do movimento, bem como em funções executivas. A atrofia de outras regiões pré-frontais e do giro do cíngulo também demonstraram correlações com os escores da *EDSS* em outro estudo ⁵⁶, o que pode demonstrar a evolução da atrofia para áreas de sensibilidade intermediária à degeneração com a progressão da doença ou migração das áreas de maior inflamação para essas regiões.

Então, pode-se refletir que, embora a *EDSS* não avalie com precisão todo o espectro de disfunção neurológica da EM, seja capaz de classificar o estágio evolutivo da doença. Estudos epidemiológicos em larga escala defendem essa teoria ao afirmar que a maior parte dos indivíduos com EMRR apresenta *EDSS* até 3 ou 4, e esses níveis de incapacidade funcional aparentam representar a transição para a fase secundariamente progressiva. Além disso, aparentemente, os níveis de *EDSS* inferiores a 3 ou 4, nos quadros que se iniciam com caráter remittente recorrente, caracterizam a fase da doença com maior frequência de exacerbações clínicas, na qual a disfunção está mais associada ao acúmulo de episódios inflamatórios ^{14, 15, 177}. Esse caráter da história natural da doença pode explicar parcialmente, tanto a correlação da atrofia cortical com as cargas lesionais, na presente amostra, como a possibilidade das agressões iniciais da EM conduzirem à degeneração de regiões cerebrais mais susceptíveis à inflamação e desmielinização iniciais.

Estes achados, bem como a literatura médica anterior, confirmam a presença de atrofia cortical e sinais de degeneração parenquimatosa desde os estágios iniciais da EM, com evidências de um padrão de distribuição predominante nos quadros de EMRR que, possivelmente, estratifiquem estágios evolutivos da doença e possam auxiliar na criação de novas hipóteses sobre a evolução natural e os processos patológicos envolvidos em seu curso. No entanto, ainda não é totalmente compreendido se a atrofia cortical está relacionada à patologia localizada na substância cinzenta ou se ela é secundária à doença da substância branca ou a ambas. Com o intuito de abordar uma dessas hipóteses, a próxima seção desta tese discutirá as relações entre os resultados de *DTI* e de atrofia cortical encontrados em nossos resultados.

5.3 A RELAÇÃO ENTRE AS ÁREAS DE ATROFIA CORTICAL E OS SINAIS DE ACOMETIMENTO DA SUBSTÂNCIA BRANCA DO CORPO CALOSO POR *DTI*

Conforme discutido anteriormente, a atrofia tecidual e, consequentemente, a atrofia da substância cinzenta cortical são o resultado final das agressões teciduais crônicas ao SNC^{52, 168}. Como os recentes conceitos da doença apontam para a existência de um extenso acometimento precoce do córtex cerebral, com sinais de placas corticais, desmielinização e perda celular desde o início da patologia^{150, 175, 178},

similarmente ao encontrado na substância branca, ainda não é bem definido se a atrofia cortical é secundária à patologia intrínseca da substância cinzenta ou se ela está associada à degeneração da substância branca.

A *DTI* é uma técnica com grande potencial para a análise microestrutural do tecido cerebral, principalmente da substância branca, o que se confirma, tanto pelos achados do nosso estudo como pelas inúmeras publicações sobre esse assunto^{31, 32, 141, 179}. Na substância branca, a alteração tecidual mais relacionada à perda celular permanente ou à degeneração é a perda axonal. De acordo com estudos anteriores, a decomposição e a análise vetorial dos componentes do tensor de difusão podem colaborar para a diferenciação entre os processos de desmielinização e perda axonal, sendo que as alterações na $\lambda_{||}$ podem representar um marcador indireto de perda axonal^{31, 32}.

Na nossa amostra, observa-se uma predominância de sinais de degeneração cortical nos lobos temporais e parietal inferior direito. Nos resultados de *DTI*, a maior alteração da $\lambda_{||}$ no grupo de pacientes EMRR foi encontrada no segmento CC5, que corresponde ao esplênio. Esse segmento apresenta uma das maiores áreas de interconexão hemisférica, abrangendo as regiões parietais, occipitais e temporais^{41, 42}. O esplênio do corpo caloso apresenta também um grupo de fibras mais finas, relacionadas às funções cognitivas, com implicações em vias da memória, sistema límbico, na linguagem e outras vias associativas¹⁸⁰ e, conforme explicitado anteriormente, as fibras mais finas e menos mielinizadas aparentam ser mais susceptíveis aos insultos inflamatórios iniciais da EM¹⁵².

Os outros segmentos onde são encontradas alterações na $\lambda_{||}$ foram os CC2 e CC3, correspondendo ao tronco médio anterior e tronco médio posterior. De acordo com estudos anteriores, esses segmentos são interconectados às regiões pré-frontais (principalmente a área pré-motora) e à área motora primária, respectivamente ^{41, 42}. Quando foram analisadas as áreas de atrofia cortical significativas encontradas no grupo EMRR em relação ao grupo controle, não foram detectadas anormalidades significativas nas áreas corticais correspondentes às conexões desses segmentos do CC. Mas, quando foram avaliadas as áreas que apresentaram correlação com as cargas lesionais e os escores da *EDSS*, uma área significativa foi encontrada na projeção do giro frontal superior esquerdo, que é uma das regiões de projeção das fibras de CC2. Pode-se refletir que a degeneração da substância branca precede a atrofia cortical. Tomando a $\lambda_{||}$ como marcador indireto de patologia axonal, esse índice de *DTI* seria hipoteticamente mais sensível em deflagrar os processos de degeneração tecidual precoce na EM, sendo, conseqüentemente, um indício de que a patologia cortical seria produto, ao menos em parte, de uma espécie de degeneração Walleriana.

Interessantemente, tanto a espessura cortical como as áreas de anormalidades na $\lambda_{||}$ demonstraram áreas de correlação com a *EDSS* em áreas relacionadas ao processamento pré-motor e motor suplementar, sendo encontradas correlações com a espessura cortical do giro frontal superior e com a $\lambda_{||}$ do segmento CC2, respectivamente. Essa região está localizada na região posterior do córtex pré-frontal, mantendo uma íntima

relação com a área motora primária (Brodmann 4), com importante papel no planejamento, iniciação do movimento e aprendizado motor ¹⁸¹. Analisando os subescores da escala funcional (*FSS – functional systems scale*), nota-se que a função mais freqüentemente afetada na população do estudo era o sistema piramidal (25,8% dos pacientes). De acordo com esses resultados, é possível supor que a lesão das fibras axonais do corpo médio anterior possa estar associada parcialmente ao déficit piramidal inicial.

Embora uma parcela significativa dos pacientes da amostra estudada apresentasse sinais de alteração no sistema funcional piramidal, o grau de déficit funcional motor em pacientes com *EDSS* menor ou igual a 3 foi sutil. Além disso, os pacientes da amostra apresentam déficits funcionais em outros sistemas como o sistema visual, sensorial e mental, dentre outros. Os déficits do sistema visual poderiam estar parcialmente associados à lesão nas fibras da região occipital e, conseqüentemente, à degeneração das fibras do esplênio do CC que se projetam nessa topografia. O esplênio do CC apresenta também um grupo de fibras relacionadas às funções cognitivas, projetadas para as áreas corticais temporais e parietais inferiores, com implicações em vias da memória, sistema límbico, na linguagem e outras vias associativas ¹⁸⁰. Como uma parcela considerável da amostra de pacientes EMRR (20%) deste estudo demonstrou sinais de déficit nas funções mentais dos subescores da *FSS* e como o esplênio do CC demonstrou sinais claros de lesão microscópica, é natural a tendência a associar essas disfunções à desconexão das fibras associativas desse segmento.

Alguns dos déficits encontrados na escala funcional podem ser explicados, tanto pelos achados de atrofia cortical como pelas alterações da $\lambda_{||}$, principalmente quando se analisa a correspondência entre a atrofia temporal e parietal inferior e as alterações na $\lambda_{||}$ no esplênio do CC, o que pode estar associado aos déficits cognitivos ou mentais. Mas, os déficits visuais, por exemplo, podem estar associados à degeneração de fibras da substância branca occipital, região na qual não foi observada atrofia cortical significativa no grupo EMRR em relação aos controles saudáveis. Esse achado poderia reforçar a hipótese de que a degeneração cortical seria secundária à transecção das fibras axonais. E, possivelmente, pelo maior grau de mielinização das fibras occipitais, elas seriam menos susceptíveis à morte celular precoce. No entanto, algumas limitações deste estudo não nos permitem uma confirmação direta dessa afirmação. Em primeiro lugar, não foi realizado um estudo direto da conectividade das regiões do CC em nossos indivíduos, portanto, não foram segmentados no esplênio as fibras temporais, occipitais e parietais, não sendo possível estimar o grau de lesão isolada das fibras occipitais. Em segundo lugar, não foi feita a mensuração de outros fatores que poderiam estar envolvidos na lesão tecidual predominantemente regional, como a distribuição regional das lesões na substância branca e as lesões corticais. Embora a literatura anterior tenha destacado uma predominância de lesões nas regiões temporais nos estágios iniciais da EMRR ⁵¹, não se sabe se essa distribuição confirma-se na nesta amostra e também não há informação, nos nossos pacientes ou em estudos anteriores, a respeito da distribuição preferencial das lesões

corticais na EMRR. Portanto, não é possível mensurar a patologia cortical intrínseca e nem afirmar com absoluta certeza se a atrofia cortical é secundária somente à doença da substância branca, dificultando o estabelecimento de uma conclusão definitiva sobre a causa principal da degeneração neuronal na doença. No entanto, pode-se observar que existe uma correspondência espacial entre ambas as medidas de degeneração tecidual deste estudo, que também possuem alguma associação com o grau de disfunção clínica dos indivíduos afetados.

Retornando à discussão das correlações entre os índices de *DTI* e a espessura cortical e a *EDSS*, alguns dos achados podem ser explicados por meio de uma hipotética correlação funcional direta. É o caso da função piramidal, que pode estar associada tanto à atrofia de áreas do córtex pré-motor como à degeneração das fibras da substância branca na projeção de CC2. Porém, outras importantes funções, como as funções cognitivas, estão alteradas desde o princípio da doença e, como a *EDSS* é altamente ponderada pelo déficit motor ¹⁵¹, a correspondência direta com a atrofia ou degeneração das áreas associativas pode não corresponder exatamente à qualidade do déficit funcional. Mas, apesar das limitações da *EDSS* em quantificar minuciosamente todos os tipos de déficits neurológicos que afetam os indivíduos com EM, ela continua a ser uma escala prática, objetiva e útil em estratificar a gravidade da doença e mostrou-se útil na identificação de estágios clínicos com alto risco de transformação para as fases progressivas, ou seja, pontos nos quais existe um hipotético predomínio de degeneração tecidual ¹⁴.

É importante destacar que o tempo de duração da doença não se correlaciona com os escores da *EDSS*, demonstrando que o grau de degeneração tecidual é possivelmente mais importante no estabelecimento do déficit neurológico na EM do que a duração isolada da doença. E, como se encontram correlações entre os índices de imagem medidos neste exame e a escala de disfunção mais utilizada na EM, pode-se propor que, tanto a espessura cortical como a $\lambda_{||}$ são potenciais marcadores da degeneração tecidual nesses pacientes. Além disso, a provável correspondência espacial das áreas de substância branca nas quais encontram-se alterações na $\lambda_{||}$ e a atrofia de suas projeções corticais demonstra a existência de uma predileção para a degeneração tecidual em algumas regiões encefálicas e um possível gradiente de progressão da degeneração com a evolução da doença. Dessa maneira, o estudo dos marcadores de *DTI* e da atrofia cortical pode colaborar para a compreensão dos mecanismos patológicos e da evolução natural da doença e, no futuro, a evolução desses métodos poderá contribuir para o seguimento dos pacientes com EM.

5.4 LIMITAÇÕES DO ESTUDO E PERSPECTIVAS FUTURAS

A EM é uma doença crônica complexa e, com os novos métodos de imagem, vem se provando que a extensão dos danos teciduais provocados por ela é maior que o postulado pelos métodos convencionais ou do que as lesões macroscopicamente identificáveis. Além disso, a própria evolução da

RM tem sido capaz de detectar um maior número de lesões desmielinizantes e comprovado o acometimento mais difuso, abrangendo regiões de substância branca e cinzenta.

Com base nas novas observações, tem sido possível também a identificação e diferenciação dos processos de degeneração e desmielinização tecidual de uma maneira mais acurada que, no nosso estudo foi abordada a partir da mensuração da atrofia cortical e dos índices obtidos por meio da *DTI*. Em nossos achados, foi observada uma correspondência espacial entre os sinais de degeneração da substância branca e da substância cinzenta cortical, porém, a análise de cada compartimento foi realizada de maneira isolada e os resultados comparados. Nas próximas etapas, será possível lançar mão de análises combinadas de conectividade, avaliando as conexões do corpo caloso que se estendem a cada uma das áreas corticais atrofiadas e mensurar os índices de *DTI* em cada uma dessas fibras, avaliando o grau de degeneração, desmielinização e perda de densidade ou volume de fibras em cada compartimento. As técnicas de conectividade por *DTI* têm se demonstrado eficazes no estudo das relações entre o córtex e as suas extensões de fibras axonais na substância branca e possíveis readaptações ou mudanças em situações patológicas¹⁸².

Além disso, apesar das proposições de estudos anteriores a respeito do significado dos índices de difusividade obtidos através da *DTI*, advogando o potencial das $\lambda_{||}$ e $\lambda_{\perp}$ em diferenciar os processos de perda axonal e desmielinização, respectivamente³¹, essas medidas são índices

indiretos e sujeitas a diferentes interpretações¹⁵³, sendo necessárias análises adicionais para caracterizar sua real correspondência com a histopatologia. É claro que estudos histológicos com comparação direta com os achados de RM seriam o padrão ouro para essas confirmações, mas, com os dados obtidos no nosso estudo, poderíamos aumentar a força dos nossos dados na predição dos processos patológicos que cursam com as alterações observadas na *DTI* correlacionando esses resultados com outros métodos de imagem, como a taxa de transferência de magnetização ou espectroscopia. A própria comparação com a atrofia cortical, que caracteriza um sinal relativamente objetivo de perda tecidual e degeneração já acrescentou força aos nossos achados. O prosseguimento do estudo, estendendo para outras regiões das substâncias branca e cinzenta será útil para a melhor compreensão dos dados. Nesse mesmo sentido, a realização do seguimento longitudinal poderia ser de grande valor, analisando a correspondência entre a taxa de atrofia evolutiva e a modificação dos índices de *DTI* nas áreas mais afetadas.

Neste estudo, foram encontradas algumas correlações entre as cargas lesionais globais encefálicas e a atrofia cortical e os índices de *DTI*. Porém, não foi realizada uma segmentação regional das cargas lesionais e nem a quantificação regional de lesões corticais. Na próxima etapa deste estudo, será realizada a quantificação de lesões na projeção das fibras de substância branca de cada região do CC para avaliar com maior acurácia a influência do número e volume de lesões na modificação dos índices de *DTI* e dos parâmetros indiretos de degeneração e desmielinização.

Em suma, a EM é uma doença do SNC na qual o impacto dos métodos de imagem é significativo na evolução da sua compreensão e no monitoramento diagnóstico e terapêutico. Porém, a enormidade de estudos voltados a essa doença contribui também para a evolução da RM. Para uma compreensão mais avançada da patologia e de suas manifestações nas imagens qualitativas e quantitativas é necessária uma abordagem multiparamétrica, na qual se aplica o teste de novos algoritmos de processamento e aquisição.

6 Conclusão

- Foram detectadas alterações nos índices de FA, DM e $\lambda_{\perp}$ em todos os segmentos estudados do corpo caloso. As alterações na $\lambda_{\perp}$ denotam sinais de desmielinização difusa, acometendo todo o CC. A $\lambda_{\parallel}$ estava alterada em apenas alguns segmentos (esplênio, tronco médio anterior e tronco médio posterior), inferindo alterações axonais localizadas.
- Notaram-se sinais de atrofia cortical nos pacientes com EMRR e baixos escores de *EDSS*, sendo mais localizada nas regiões temporais, parietais inferiores, fronto-basais e insulares.
- Os índices de FA, DM e $\lambda_{\perp}$ correlacionam-se com as cargas lesionais T1 e T2-FLAIR, com correlações mais frequentes e mais significativas com o volume lesional T2-FLAIR. Não houve correlação significativa entre a $\lambda_{\parallel}$ e os volumes lesionais. A espessura cortical também se correlacionou com os volumes lesionais T1 e T2-FLAIR, mais extensa e mais significativamente com o volume lesional T1.
- Os escores da *EDSS* apresentaram correlações com a $\lambda_{\parallel}$ no tronco médio anterior e no esplênio do CC e com a DM no tronco médio posterior e no esplênio. Notou-se correlação entre a *EDSS* e a $\lambda_{\perp}$ no tronco médio posterior. Os escores da *EDSS* correlacionam-se com a espessura cortical no giro frontal superior esquerdo.

7 Anexos

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – HC-FMUSP****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐
DATA:/...../..... NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONES: DDD (.....).....
2. NOME DO RESPONSÁVEL LEGAL:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐
DATA:/...../..... NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONES: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **As características do tecido neural aparentemente normal e o grau de atrofia cerebral em pacientes com esclerose múltipla remitente-recorrente.**

PESQUISADORA: **Carolina de Medeiros Rimkus**; CARGO/FUNÇÃO: **Médica Radiologista**

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº **111.750**

UNIDADE DO HCFMUSP: **Departamento de radiologia/ Divisão de Ressonância Magnética**

AValiação DO RISCO DA PESQUISA: **Risco baixo a moderado**

DURAÇÃO DA PESQUISA: **12 meses**

OBSERVAÇÕES:

- a) O objetivo deste estudo é identificar fatores que possam estar associados a maior ou menor grau de perda de substância neural ou volume cerebral em pacientes em tratamento de esclerose múltipla.
- b) Para a avaliação desses fatores serão realizados exames de imagem por ressonância magnética do crânio. Caso o senhor(a) seja portador(a) de esclerose múltipla e aceite participar do estudo, serão realizados dois exames de imagem, um no início do tratamento e outro após 12 meses após o início do uso da medicação específica para esclerose múltipla.

- c) O senhor(a) deverá permanecer dentro do aparelho de ressonância magnética por um período médio de 40 a 60 minutos, imóvel, deitado dentro de um tubo com cerca de 1,20m de diâmetro. Durante a execução do exame o aparelho emite barulhos. Para minimizar o desconforto sonoro, serão utilizados protetores auditivos.
- d) Caso o senhor(a) apresentar claustrofobia, dor ou qualquer tipo de mal estar durante a realização do exame, você terá um botão sonoro nas suas mãos possibilitando a comunicação com a equipe médica e biomédica, podendo interromper o exame a qualquer momento.
- e) Nos pacientes com esclerose múltipla, será realizada a administração de endovenosa (na veia) de contraste paramagnético gadolínio. Esse meio de contraste é bem tolerado pela maioria dos indivíduos, com uma taxa baixa de reações adversas. As reações esporadicamente relatadas são náuseas, cefaléias transitórias, hipotensão, irritação cutânea, urticária ou irritação gastrointestinal. Reações alérgicas graves são raras. Esse meio de contraste é contra-indicado em pacientes com insuficiência ou falência renal e ou com história anterior de reações alérgicas graves após a sua utilização. Todos os exames serão acompanhados por médicos, biomédicos e enfermeiros capacitados.
- f) Caso o senhor(a) esteja participando do estudo como voluntário saudável, será realizado apenas um exame de ressonância magnética, SEM a injeção do contraste gadolínio. Serão válidas as informações dos itens “c” e “d”.
- g) Para todos os indivíduos, é contra-indicada a realização de qualquer tipo de exame de ressonância magnética em portadores de marca-passos cardíacos, outros tipos de implantes elétricos e eletrônicos ou cliques metálicos intra-cranianos ou vasculares. Próteses metálicas ortopédicas são contra-indicações relativas. Todos os indivíduos passarão por uma entrevista de triagem e avaliação e serão excluídos aqueles que apresentarem qualquer tipo de implante / fragmento metálico ou estimulador elétrico / eletrônico que o ponha em risco durante a realização do exame.
- h) O senhor(a) pode, por qualquer motivo, se recusar à realização do exame, sem qualquer prejuízo ao seu tratamento ou aos seus atendimentos dentro do Hospital das Clínicas.
- i) Os pacientes com esclerose múltipla receberão um medicamento imunomodulador, que poderá ser *Interferon 1beta (INF-1b)* ou *acetato de*

glatimer. O *INF-1b* é aplicado através de injeções subcutâneas em dias alternados e o *acetato de glatimer* é aplicado através de injeções subcutâneas diárias. As primeiras doses serão aplicadas com acompanhamento da equipe médica e enfermagem do ambulatório de neurologia e o senhor(a) ou acompanhante responsável serão capacitados para a administração das injeções subsequentes. Esses medicamentos são utilizados de maneira rotineira no tratamento da esclerose múltipla, tendo sido aprovados para o uso pela federação americana (FDA) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), com eficácia e tolerância semelhantes. O tipo de tratamento e as principais reações adversas serão informados antes do início do tratamento.

- j) As principais reações adversas ao *INF-1b*: depressão, ansiedade e sintomas gripais (febre, cansaço, suor, dores musculares). A depressão não é infrequente em pacientes com esclerose múltipla, mesmo sem a utilização do *INF-1b*. Em casos de tristeza profunda ou sentimentos depressivos, deve-se contatar um amigo ou familiar e procurar o auxílio médico o mais cedo possível.
- k) As principais reações adversas ao *acetato de glatimer* são dores no peito, palpitações, ansiedade e falta de ar. Essas reações costumam ser transitórias e auto-limitadas. Em caso de persistência dos sintomas, deve-se procurar auxílio médico.
- l) Qualquer medicamento pode provocar reações alérgicas em pacientes sensíveis aos seus componentes. Essas reações costumam ocorrer logo após a injeção das primeiras doses, reduzindo o risco de ocorrência das dores subsequentes. Reações adversas leves são caracterizadas por coceira, vermelhidão, manchas ou pápulas na pele. Reações mais graves são menos frequentes, mas podem ocorrer. Os sintomas de alerta são: dificuldade de respirar ou engolir ou inchaço na língua. Se você suspeitar de alguma reação alérgica, o uso do medicamento deve ser interrompido e deve-se procurar atendimento médico imediatamente, principalmente nos sintomas mais graves.
- m) Em caso de suspeita de gravidez, deve-se interromper o uso dos medicamentos e avisar ao médico neurologista e aos pesquisadores responsáveis pelo projeto. Caso a gestação seja confirmada, a senhora será excluída deste estudo, porém o seu tratamento continuará no ambulatório de neurologia da maneira mais segura para o seu caso.
- n) Os voluntários saudáveis NÃO utilizarão medicamentos imunomoduladores.

- o) A evolução clínica e a caracterização dos resultados das imagens de ressonância magnética serão avaliadas seqüencialmente por médicos especializados nas áreas de interesse.
- p) O tempo de participação no estudo será de 12 meses, após o início do tratamento.
- q) Os voluntários saudáveis devem comparecer para a realização do exame e para o preenchimento dos formulários de entrevista clínica e demográfica, realizados geralmente na mesma semana do exame de imagem.
- r) O participante deste estudo terá o benefício de realizar detalhado acompanhamento neurológico direcionado especificamente para seu problema.
- s) O senhor(a) coloca-se à disposição, durante o período da pesquisa, para responder questões relevantes ao seu quadro clínico e à pesquisa.
- t) Garantia de acesso: Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A investigadora executante do projeto é a Dra. **Carolina de Medeiros Rimkus** que pode ser encontrada na Av. Dr. Ovídio Pires Campos s/n. Ressonância Magnética – Tel.: 30697619. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel.: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br;
- u) É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
- v) Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;
- w) O senhor(a) têm o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;
- x) Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

y) O pesquisador tem o compromisso de utilizar os dados e o material coletado somente para os projetos oriundos desta linha de pesquisa.

Acredito ter sido bem informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **“As características do tecido neural aparentemente normal e o grau de atrofia cerebral em pacientes com esclerose múltipla remitente-recorrente”**.

Eu discuti com a Dra. **Carolina de Medeiros Rimkus** sobre a minha livre decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

São Paulo, _____

Assinatura do paciente / representante legal: _____

Data: ____/____/____

Assinatura da testemunha: _____

Data: ____/____/____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Dra. Carolina de Medeiros Rimkus - CRM 111750

Pesquisadora Executante

Medica radiologista

Dra. Claudia da Costa Leite – CRM 65349

Orientadora- Pesquisadora Responsável

Chefe do Serviço de Ressonância Magnética

ANEXO B – ESCALA EXPANDIDA DO ESTADO DE INCAPACIDADE (ou

Expanded Disability Status Scale – EDSS)

Escore	Característica
0	Exame neurológico normal (todos os SF grau 0; mental grau 1 aceitável)
1,0	Sem incapacidade (1 SF grau 1)
1,5	Sem incapacidade (2 SF grau 1)
2,0	Incapacidade mínima em 1 SF (1 SF grau 2, outros grau 0 ou 1)
2,5	Incapacidade mínima em 2 SF (2 SF grau 2, outros grau 0 ou 1)
3,0	Incapacidade moderada em 1 SF (1 SF grau 3, outros grau 0 ou 1) ou incapacidade discreta em 3 ou 4 SF (3/4 SF grau 2, outros grau 0 ou 1). Deambulando plenamente.
3,5	Deambulação plena, com incapacidade moderada em 1SF (1 SF grau 3) e 1 ou 2 SF grau 2; ou 2SF grau 3; ou 5 SF grau 2 (outros 0 ou 1)
4,0	Deambulação plena, até 500 m sem ajuda ou descanso (1 SF grau 4, outros 0 ou 1)
4,5	Deambulação plena, até 300 m sem ajuda ou descanso. Com alguma limitação da atividade ou requer assistência mínima (1 SF grau 4, outros 0 ou 1)
5,0	Deambulação até 200 m sem ajuda ou descanso. Limitação nas atividades diárias (equivalentes são 1 SF grau 5, outros 0 ou 1; ou combinação de graus menores excedendo o escore 4.0)
5,5	Deambulação até 100 m sem ajuda ou descanso. Incapacidade impedindo atividades plenas diárias (equivalentes são 1SF grau 5, outros 0 ou 1; ou combinações de graus menores excedendo o escore 4.0)
6,0	Assistência intermitente ou com auxílio unilateral constante de bengala, muleta ou suporte (equivalentes são mais que 2 SF graus 3+)
6,5	Assistência bilateral (equivalentes são mais que 2 SF graus 3+)
7,0	Não anda 5 m mesmo com ajuda. Restrito a cadeira de rodas. Transfere da cadeira para cama (equivalentes são combinações com mais que 1 SF 4+, ou piramidal grau 5 isoladamente)
7,5	Consegue apenas dar poucos passos. Restrito á cadeira de rodas. Necessita ajuda para transferir-se (equivalentes são combinações com mais que 1 SF grau 4+)
8,0	Restrito ao leito, mas pode ficar fora da cama. Retém funções de autocuidado; bom uso dos braços (equivalentes são combinações de vários SF grau 4+)
8,5	Restrito ao leito constantemente. Retém algumas funções de autocuidade e dos braços (equivalentes são combinações de vários SF grau 4+)
9,0	Paciente incapacitado no leito. Pode comunicar, não come, não deglute (equivalentes é a maioria de SF grau 4+)
9,5	Paciente totalmente incapacitado no leito. Não comunica, não come, não deglute (equivalentes são quase todos de SF grau 4+)
10,0	Morte por esclerose múltipla

ESCORE TOTAL:

Tabela adaptada de Kurtzke 1983 ¹⁴²

SF: sistema funcional

ANEXO C – SUB-ESCORES DOS SISTEMAS FUNCIONAIS (*Functional Systems Scale - FSS*)

Funções Piramidais

- 0. Normal
- 1. Sinais anormais sem incapacidade motora
- 2. Incapacidade mínima
- 3. Discreta ou moderada paraparesia ou hemiparesia; monoparesia grave
- 4. Paraparesia ou hemiparesia acentuada; quadriparesia moderada; ou monoplegia
- 5. Paraplegia, hemiplegia ou acentuada quadriparesia
- 6. Quadriplegia
- V. Desconhecido

Funções Cerebelares

- 0. Normal
- 1. Sinais anormais sem incapacidade
- 2. Ataxia discreta em qualquer membro
- 3. Ataxia moderada do tronco ou de membros
- 4. Incapaz de realizar movimentos coordenados devido á ataxia
- V. Desconhecido

Funções do Tronco Cerebral

- 0. Normal
- 1. Somente sinais anormais
- 2. Nistagmo moderado ou outra incapacidade leve
- 3. Nistagmo grave, acentuada paresia extra-ocular ou incapacidade moderada de outros cranianos
- 4. Disartria acentuada ou outra incapacidade acentuada
- 5. Incapacidade de deglutir ou falar
- V. Desconhecido

Funções Sensitivas

0. Normal

1. Diminuição de sensibilidade ou estereognosia em 1-2 membros
2. Diminuição discreta de tato ou dor, ou da sensibilidade posicional, e/ou diminuição moderada da vibratória ou estereognosia em 1-2 membros; ou diminuição somente da vibratória em 3-4 membros
3. Diminuição moderada de tato ou dor, ou posicional, e/ou perda da vibratória em 1-2 membros; ou diminuição discreta de tato ou dor, e/ou diminuição moderada de toda propriocepção em 3-4 membros
4. Diminuição acentuada de tato ou dor, ou perda da propriocepção em 1-2 membros, ou diminuição moderada de tato ou dor e/ou diminuição acentuada da propriocepção em mais de 2 membros
5. Perda da sensibilidade de 1-2 membros; ou moderada da diminuição de tato ou dor e/ou perda da propriocepção na maior parte do corpo abaixo da cabeça

V. Desconhecido

Funções Vesicais

0. Normal

1. Sintomas urinários sem incontinência
2. Incontinência < ou igual uma vez por semana
3. Incontinência > que uma vez por semana
4. Incontinência diária ou mais que 1 vez por dia
5. Caracterização contínua
6. Grau para bexiga e grau 5 para disfunção retal

V. Desconhecido

Funções intestinais

0. Normal

1. < obstipação diária e sem incontinência
2. Obstipação diária sem incontinência
3. Obstipação < uma vez por semana
4. Incontinência > uma vez por semana mas não diária
5. Sem controle de esfíncter retal
6. Grau 5 para bexiga e grau 5 para disfunção retal

V. desconhecido

Funções Visuais

0. Normal

1. Escotoma com acuidade visual (AV) igual ou melhor que 20/30
2. Pior olho com escotoma e AV de 20/30 a 20/59
3. Pior olho com grande escotoma, ou diminuição moderada dos campos, mas com AV de 20/60 a 20/99
4. Pior olho com diminuição acentuada dos campos e AV de 20/100 a 20/200; ou grau 3 com AV do melhor olho igual ao menor que 20/60
5. Pior olho com AV menor que 20/200; ou grau 4 com AV do melhor olho igual ao menor que 20/60
6. Grau 5 com AV do melhor olho igual ou menor que 20/60

V. Desconhecido

Funções mentais

0. Normal

1. Alterações apenas do humor
2. Diminuição discreta da mentação
3. Diminuição normal da mentação
4. Diminuição acentuada da mentação (moderada síndrome cerebral crônica)
5. Demência ou grave síndrome cerebral crônica

V. Desconhecido

Outras funções

0. Nenhuma

1. Qualquer outro achado devido à EM
2. Desconhecido

ANEXO D – Distribuição dos resultados dos escores das escalas funcionais, duração da doença e sexo na amostra de pacientes EMRR

Tabela de dados das escalas de incapacidade (*EDSS*) e distribuição dos sistemas funcionais afetados (*FSS*)

P	S	EDSS	DD	Visual	Tronco	Piramidal	Cerebelar	Sensitivo	Esfincter	Mental
P01	F	0,0	398	0	0	0	0	0	0	0
P02	F	2,5	995	0	0	2	0	2	0	0
P03	F	0,0	637	0	0	0	0	0	0	0
P04	F	1,0	166	0	0	1	0	0	0	0
P05	F	2,0	1316	0	0	0	0	0	0	2
P06	F	1,0	721	0	0	1	0	0	0	0
P07	F	3,0	500	1	0	3	0	0	0	1
P08	M	2,0	367	0	0	0	0	2	0	0
P09	M	1,0	814	0	0	0	0	1	0	0
P10	F	1,0	246	1	0	0	0	0	0	0
P11	F	2,5	1297	0	0	2	2	0	0	0
P12	M	0,0	481	0	0	0	0	0	0	0
P13	F	1,0	1636	0	0	0	0	0	1	0
P14	F	1,0	3460	0	0	1	0	0	0	0
P15	F	2,0	1560	0	0	2	0	0	0	1
P16	F	1,0	2639	0	0	0	0	1	0	0
P17	F	1,0	736	0	1	0	0	0	0	0
P18	F	1,5	1576	1	0	0	0	1	0	0
P19	F	2,0	921	0	0	0	0	0	0	2
P20	M	0,0	449	0	0	0	0	0	0	0
P21	F	1,0	114	1	0	0	0	0	0	0
P22	F	1,0	280	1	0	0	0	0	0	0
P23	M	0,0	867	0	0	0	0	0	0	0
P24	M	1,0	811	0	0	0	0	0	1	0
P25	M	1,0	914	0	0	0	0	0	0	0
P26	F	0,0	400	0	0	0	0	0	0	0
P27	F	0,0	350	0	0	0	0	0	0	0
P28	F	1,5	231	1	0	0	0	0	0	1
P29	M	2,0	1481	0	0	0	0	2	0	0
P30	F	0,0	220	0	0	0	0	0	0	0
P31	M	1,5	300	0	0	1	0	0	0	1
Média		1,11	867,19	0,19	0,03	0,42	0,06	0,29	0,06	0,26
DP		0,85	745,37	0,40	0,18	0,81	0,36	0,64	0,25	0,58

DD: dias de doença; DP: desvio padrão; P: paciente; S: sexo (F: feminino; M: masculino)

ANEXO E – Resultados de *DTI* nos 5 segmentos do CC

Resultados individuais de *DTI* no grupo de pacientes EMRR obtidos no segmento CC1

PACIENTE	$\lambda_{ }$ CC1	$\lambda_{\perp}$ CC1	FA CC1	DM CC1
P01	1,6702	0,4414	0,6906	0,851
P02	1,6141	0,4611	0,6693	0,8454
P03	1,7409	0,4741	0,7068	0,8964
P04	1,6743	0,5111	0,6413	0,8988
P05	1,558	0,4443	0,6675	0,8155
P06	1,7198	0,5341	0,656	0,9293
P07	1,6977	0,5156	0,6565	0,9096
P08	1,6449	0,4176	0,6978	0,8267
P09	1,6669	0,4759	0,677	0,8729
P10	1,8334	0,489	0,6914	0,9372
P11	1,6701	0,4593	0,6769	0,8629
P12	1,7491	0,4321	0,7272	0,8711
P13	1,6606	0,479	0,6594	0,8729
P14	1,5286	0,5036	0,6276	0,8453
P15	1,7514	0,442	0,7105	0,8785
P16	1,5541	0,3721	0,7223	0,7661
P17	1,6576	0,441	0,6947	0,8466
P18	1,7886	0,6505	0,5892	1,0299
P19	1,634	0,4481	0,6791	0,8434
P20	1,6146	0,4054	0,7116	0,8085
P21	1,6745	0,4825	0,6562	0,8816
P22	1,8103	0,5907	0,6345	0,9972
P23	1,705	0,4948	0,6568	0,8982
P24	1,7184	0,3998	0,7232	0,8393
P25	1,7601	0,4185	0,7301	0,8657
P26	1,6785	0,3666	0,7406	0,8039
P27	1,5835	0,4611	0,6641	0,8352
P28	2,1409	0,8296	0,5767	1,2667
P29	1,5607	0,543	0,5892	0,8853
P30	1,6503	0,5438	0,6853	0,8602
P31	1,6902	0,4711	0,6557	0,9282
Média	1,69037	0,483832258	0,673067742	0,886112903
DP	0,112080502	0,087872083	0,041348522	0,088652937

CC1: Segmento 1 do corpo caloso, correspondente ao rostro e joelho

DP: desvio padrão; $\lambda_{||}$ (10^{-3}mm/s^2): difusividade axial; $\lambda_{\perp}$ (10^{-3}mm/s^2): difusividade radial; FA: fração de anisotropia; DM (10^{-3}mm/s^2): difusividade média; P: paciente

Resultados individuais de *DTI* no grupo de pacientes EMRR obtidos no segmento CC2

PACIENTE	$\lambda_{ }$ CC2	$\lambda_{\perp}$ CC2	FA CC2	DM CC2
P01	1,4934	0,538	0,5701	0,8565
P02	1,8925	0,6556	0,6105	1,0679
P03	1,5067	0,4196	0,6804	0,782
P04	1,71	0,4157	0,7162	0,8472
P05	1,4418	0,4015	0,6694	0,7483
P06	1,5235	0,4625	0,6409	0,8162
P07	1,5945	0,4933	0,6407	0,8604
P08	1,6937	0,4493	0,6878	0,8641
P09	1,412	0,4344	0,6399	0,7603
P10	1,7011	0,4468	0,6966	0,8649
P11	1,5215	0,5131	0,6108	0,8495
P12	1,5932	0,4778	0,6542	0,8496
P13	1,3668	0,4982	0,5705	0,7878
P14	1,3504	0,4435	0,6257	0,7458
P15	1,5703	0,4327	0,6747	0,8119
P16	1,4263	0,4724	0,6136	0,7895
P17	1,5448	0,6325	0,5259	0,9366
P18	1,9098	0,7713	0,5401	1,1508
P19	1,4853	0,4858	0,617	0,8196
P20	1,3965	0,4858	0,5921	0,7894
P21	1,4228	0,5604	0,5337	0,8478
P22	1,7296	0,5819	0,617	0,9645
P23	1,6093	0,5526	0,6003	0,9048
P24	1,4487	0,4412	0,647	0,777
P25	1,4433	0,5007	0,5924	0,8149
P26	1,4063	0,4681	0,6093	0,7809
P27	1,5047	0,4893	0,6179	0,8277
P28	2,0735	0,9223	0,4791	1,306
P29	1,5971	0,6467	0,5325	0,9628
P30	1,4751	0,4068	0,6768	0,7629
P31	1,5595	0,4419	0,6666	0,8144
Média	1,561419355	0,514248387	0,617732258	0,863290323
DP	0,168142276	0,113157232	0,056168528	0,122013607

CC2: Segmento 2 do corpo caloso, correspondente ao tronco médio anterior

DP: desvio padrão; $\lambda_{||}$ (10^{-3} mm/s²): difusividade axial; $\lambda_{\perp}$ (10^{-3} mm/s²): difusividade radial; FA: fração de anisotropia; DM (10^{-3} mm/s²): difusividade média; P: paciente

Resultados individuais de *DTI* no grupo de pacientes EMRR obtidos no segmento CC3

PACIENTE	$\lambda_{ }$ CC3	$\lambda_{\perp}$ CC3	FA CC3	DM CC3
P01	1,5932	0,4423	0,6716	0,8259
P02	1,8868	0,554	0,6679	0,9983
P03	1,5485	0,4029	0,7013	0,7848
P04	1,4856	0,4326	0,6658	0,7836
P05	1,4355	0,3947	0,679	0,7416
P06	1,5585	0,5386	0,599	0,8786
P07	1,5483	0,5059	0,6125	0,8534
P08	1,593	0,3945	0,7096	0,794
P09	1,4073	0,4403	0,6312	0,7626
P10	1,71	0,3834	0,7475	0,8256
P11	1,5574	0,5809	0,5509	0,9064
P12	1,5112	0,4178	0,667	0,7822
P13	1,2994	0,5274	0,5236	0,7847
P14	1,5603	0,4078	0,69	0,792
P15	1,6375	0,5033	0,645	0,8814
P16	1,4415	0,3926	0,6798	0,7422
P17	1,5181	0,5237	0,5969	0,8552
P18	1,9222	0,4219	0,7459	0,922
P19	1,4608	0,3745	0,6995	0,7366
P20	1,3889	0,4328	0,6318	0,7515
P21	1,4508	0,5026	0,5868	0,8186
P22	1,5927	0,4596	0,6619	0,8373
P23	1,5865	0,5256	0,6118	0,8802
P24	1,5682	0,4474	0,671	0,821
P25	1,4653	0,5051	0,5957	0,8251
P26	1,4094	0,41	0,6551	0,7432
P27	1,5276	0,4996	0,6201	0,8423
P28	1,6717	0,4404	0,6821	0,8508
P29	1,4455	0,5872	0,5233	0,8733
P30	1,4807	0,3641	0,71	0,7363
P31	1,6181	0,4801	0,6577	0,8595
Média	1,544532258	0,461083871	0,648106452	0,822264516
DP	0,130743936	0,06282386	0,056527916	0,062093953

CC3: Segmento 3 do corpo caloso, correspondente ao tronco médio posterior

DP: desvio padrão; $\lambda_{||}$: difusividade axial; $\lambda_{\perp}$: difusividade radial; FA: fração de anisotropia; DM: difusividade média; P: paciente

Resultados individuais de *DTI* no grupo de pacientes EMRR obtidos no segmento CC4

PACIENTE	$\lambda_{ }$ CC4	$\lambda_{\perp}$ CC4	FA CC4	DM CC4
P01	1,6427	0,4514	0,679	0,8485
P02	1,8118	0,5522	0,6493	0,9721
P03	1,7065	0,5329	0,6363	0,9241
P04	1,4008	0,4647	0,6225	0,7767
P05	1,4964	0,4025	0,6874	0,7672
P06	1,5613	0,5812	0,5655	0,9079
P07	1,5646	0,431	0,6778	0,8089
P08	1,6869	0,4452	0,6932	0,8591
P09	1,5242	0,4445	0,6587	0,8044
P10	1,6948	0,4345	0,7032	0,8546
P11	1,6169	0,4167	0,6966	0,8168
P12	1,6844	0,4501	0,688	0,8615
P13	1,5084	0,5959	0,537	0,9001
P14	1,4489	0,475	0,6105	0,7996
P15	1,6411	0,499	0,6504	0,8797
P16	1,593	0,392	0,7171	0,7923
P17	1,7464	0,4821	0,6761	0,9036
P18	1,8478	0,514	0,6881	0,9586
P19	1,4539	0,484	0,6062	0,8073
P20	1,5084	0,5219	0,5923	0,8507
P21	1,4335	0,5645	0,532	0,8542
P22	1,7494	0,709	0,5366	1,0558
P23	1,624	0,6106	0,5625	0,9484
P24	1,6645	0,4587	0,6797	0,8606
P25	1,5164	0,4569	0,6495	0,8101
P26	1,3995	0,4815	0,5925	0,7875
P27	1,4496	0,4614	0,6244	0,7908
P28	1,8701	0,6849	0,5862	1,0799
P29	1,3922	0,6489	0,4694	0,8967
P30	1,5183	0,442	0,6581	0,8008
P31	1,5968	0,4695	0,6603	0,8452
Média	1,592048387	0,501893548	0,631819355	0,865280645
DP	0,133149562	0,080999732	0,060989898	0,077082451

CC4: Segmento 4 do corpo caloso, correspondente ao istmo

DP: desvio padrão; $\lambda_{||}$ (10^{-3}mm/s^2): difusividade axial; $\lambda_{\perp}$ (10^{-3}mm/s^2): difusividade radial; FA: fração de anisotropia; DM (10^{-3}mm/s^2): difusividade média; P: paciente

Resultados individuais de *DTI* no grupo de pacientes EMRR obtidos no segmento CC5

PACIENTE	$\lambda_{ }$ CC5	$\lambda_{\perp}$ CC5	FA CC5	DM CC5
P01	1,769	0,5361	0,6551	0,9471
P02	1,6807	0,4705	0,6783	0,8739
P03	1,8324	0,4398	0,7244	0,904
P04	1,6345	0,3527	0,7549	0,78
P05	1,8689	0,4839	0,7077	0,9456
P06	1,8695	0,465	0,7227	0,9332
P07	1,8606	0,4912	0,6976	0,9476
P08	1,8351	0,3482	0,7777	0,8439
P09	1,7623	0,48	0,6992	0,9074
P10	1,678	0,4455	0,6986	0,8563
P11	1,802	0,5125	0,6843	0,9423
P12	1,6659	0,3277	0,7722	0,7738
P13	1,777	0,5027	0,6793	0,9251
P14	1,8917	0,3747	0,7797	0,8804
P15	1,8329	0,4344	0,7218	0,9005
P16	1,9525	0,452	0,7468	0,9522
P17	1,8736	0,4923	0,7102	0,9528
P18	1,6967	0,4307	0,7094	0,8527
P19	1,8416	0,4166	0,7419	0,8916
P20	1,4923	0,4114	0,6813	0,7717
P21	1,6797	0,4381	0,6996	0,852
P22	1,7952	0,5202	0,6685	0,9452
P23	1,6941	0,488	0,6671	0,89
P24	1,8727	0,4407	0,7387	0,918
P25	1,7806	0,4409	0,7274	0,8875
P26	1,6551	0,4315	0,7021	0,8394
P27	1,6921	0,4243	0,7039	0,8496
P28	1,6612	0,5835	0,5974	0,9427
P29	1,8263	0,5703	0,639	0,989
P30	1,7429	0,4096	0,738	0,8541
P31	1,9332	0,4554	0,7394	0,948
Média	1,772590323	0,453883871	0,708522581	0,893470968
DP	0,103257198	0,059233786	0,040519516	0,056231558

CC5: Segmento 5 do corpo caloso, correspondente ao esplênio

DP: desvio padrão; $\lambda_{||}$ (10^{-3}mm/s^2): difusividade axial; $\lambda_{\perp}$ (10^{-3}mm/s^2): difusividade radial; FA: fração de anisotropia; DM (10^{-3}mm/s^2): difusividade média; P: paciente

Resultados individuais de *DTI* no grupo de pacientes EMRR obtidos no CC total

PACIENTE	$\lambda_{ }$ CCtotal	$\lambda_{\perp}$ CCtotal	FA CCtotal	DM CCtotal
P01	1,6562	0,5061	0,6415	0,8895
P02	1,6433	0,5369	0,6212	0,9057
P03	1,7492	0,52	0,6683	0,9297
P04	1,6042	0,4295	0,6883	0,821
P05	1,5843	0,4379	0,6774	0,8201
P06	1,6889	0,5428	0,6296	0,9248
P07	1,7002	0,4818	0,6704	0,8879
P08	1,7205	0,419	0,7119	0,8528
P09	1,6185	0,4584	0,6746	0,8451
P10	1,6759	0,4928	0,6603	0,8872
P11	1,6542	0,504	0,6421	0,8874
P12	1,6455	0,4106	0,7096	0,8222
P13	1,5857	0,5239	0,6101	0,8779
P14	1,6034	0,4641	0,661	0,8439
P15	1,7245	0,4516	0,6966	0,8759
P16	1,6495	0,4291	0,6985	0,8359
P17	1,6993	0,5016	0,6578	0,9009
P18	1,7908	0,5474	0,6531	0,9619
P19	1,6023	0,4295	0,6824	0,8204
P20	1,5765	0,4405	0,6765	0,8192
P21	1,596	0,4961	0,6316	0,8627
P22	1,7336	0,5341	0,6455	0,9339
P23	1,6852	0,5455	0,6275	0,9254
P24	1,7024	0,413	0,7159	0,8428
P25	1,6283	0,4265	0,6919	0,8271
P26	1,5629	0,4357	0,6697	0,8114
P27	1,6	0,4668	0,6581	0,8445
P28	1,8761	0,7074	0,5812	1,0969
P29	1,5847	0,5872	0,5642	0,9197
P30	1,6238	0,4256	0,7011	0,825
P31	1,7106	0,4526	0,6947	0,872
Média	1,660532258	0,484451613	0,661696774	0,876477419
DP	0,070612593	0,063637562	0,036689494	0,058357289

CCtotal: Corpo caloso total

DP: desvio padrão; $\lambda_{||}$ (10^{-3}mm/s^2): difusividade axial; $\lambda_{\perp}$ (10^{-3}mm/s^2): difusividade radial; FA: fração de anisotropia; DM (10^{-3}mm/s^2): difusividade média; P: paciente

Resultados individuais de *DTI* no grupo controle obtidos no CC1

CONTROLE	$\lambda_{ }$ CC1	$\lambda_{\perp}$ CC1	FA CC1	DM CC1
C01	1,6778	0,4492	0,6754	0,8587
C02	1,6797	0,4835	0,6689	0,8823
C03	1,7208	0,4818	0,6659	0,8948
C04	1,7673	0,3965	0,7475	0,8534
C05	1,5577	0,3532	0,7371	0,7547
C06	1,6399	0,3562	0,7452	0,7841
C07	1,6454	0,3575	0,7497	0,7868
C08	1,7143	0,5512	0,6306	0,9389
C09	1,6422	0,3817	0,7183	0,8019
C10	1,7021	0,4169	0,7147	0,8453
C11	1,6575	0,4281	0,6965	0,8379
C12	1,5621	0,4203	0,6973	0,8009
C13	1,5916	0,4083	0,7155	0,8027
C14	1,5982	0,3459	0,7522	0,7633
C15	1,7854	0,4474	0,7134	0,8934
C16	1,716	0,4046	0,7359	0,8417
C17	1,5483	0,3394	0,7439	0,7424
C18	1,6393	0,378	0,7334	0,7984
C19	1,6873	0,4075	0,7131	0,8341
C20	1,6152	0,5046	0,6327	0,8748
C21	1,5362	0,3477	0,739	0,7439
C22	1,7496	0,4018	0,7268	0,8511
C23	1,6265	0,3958	0,7163	0,806
C24	1,4748	0,4181	0,6923	0,7703
C25	1,7064	0,5145	0,6579	0,9118
C26	1,7259	0,3602	0,7635	0,8154
C27	1,6466	0,4244	0,6926	0,8318
C28	1,6303	0,4214	0,6939	0,8244
C29	1,7628	0,4421	0,7102	0,8823
C30	1,5928	0,4094	0,7103	0,8039
C31	1,602	0,4987	0,6407	0,8665
C32	1,162	0,5682	0,5873	0,9175
C33	1,626	0,3818	0,7278	0,7966
C34	1,5835	0,4807	0,6442	0,8483
Média	1,647873529	0,422841176	0,702647059	0,831185294
DP	0,07247786	0,059017897	0,041553902	0,050612264

CC1: Segmento 1 do corpo caloso, correspondente ao rostro e joelho

DP: desvio padrão; $\lambda_{||}$ (10^{-3} mm/s²): difusividade axial; $\lambda_{\perp}$ (10^{-3} mm/s²): difusividade radial; FA: fração de anisotropia; DM (10^{-3} mm/s²): difusividade média; C: indivíduo controle

Resultados individuais de *DTI* no grupo controle obtidos no CC2

CONTROLE	$\lambda_{ }$ CC2	$\lambda_{\perp}$ CC2	FA CC2	DM CC2
C01	1,5904	0,4726	0,6577	0,8464
C02	1,3925	0,4701	0,6025	0,7776
C03	1,4795	0,4604	0,6367	0,8001
C04	1,5813	0,4174	0,695	0,8054
C05	1,4212	0,3571	0,7031	0,7118
C06	1,5335	0,3364	0,7515	0,7354
C07	1,4426	0,3773	0,6944	0,7324
C08	1,6037	0,432	0,6889	0,8213
C09	1,4704	0,476	0,6276	0,8075
C10	1,4957	0,4371	0,6566	0,79
C11	1,5239	0,5079	0,6081	0,8466
C12	1,3456	0,4459	0,6119	0,7451
C13	1,3163	0,3778	0,6652	0,6897
C14	1,3705	0,4265	0,6378	0,7412
C15	1,6136	0,4315	0,6886	0,8255
C16	1,5361	0,4533	0,6628	0,8142
C17	1,5438	0,3798	0,7204	0,7678
C18	1,4582	0,4214	0,6625	0,767
C19	1,4998	0,4756	0,6293	0,817
C20	1,4525	0,4674	0,6254	0,7958
C21	1,3675	0,4294	0,6343	0,7421
C22	1,6025	0,4811	0,6596	0,8549
C23	1,5362	0,4345	0,6652	0,8018
C24	1,5194	0,3912	0,7038	0,7673
C25	1,5844	0,469	0,6492	0,8408
C26	1,5512	0,4215	0,6719	0,7981
C27	1,4679	0,4439	0,6383	0,7852
C28	1,5611	0,4691	0,6463	0,8331
C29	1,4978	0,4171	0,675	0,7773
C30	1,3441	0,3746	0,6744	0,6978
C31	1,6856	0,5521	0,6267	0,9299
C32	1,4613	0,5737	0,538	0,8693
C33	1,3724	0,4751	0,5958	0,7742
C34	1,3728	0,5263	0,5503	0,8085
Média	1,488097059	0,443591176	0,651611765	0,791708824
DP	0,09149378	0,052361722	0,044123709	0,050861829

CC2: Segmento 2 do corpo caloso, correspondente ao tronco médio anterior

DP: desvio padrão; $\lambda_{||}$ (10^{-3} mm/s²): difusividade axial; $\lambda_{\perp}$ (10^{-3} mm/s²): difusividade radial; FA: fração de anisotropia; DM (10^{-3} mm/s²): difusividade média; C: indivíduo controle

Resultados individuais de *DTI* no grupo controle obtidos no CC3

CONTROLE	$\lambda_{ }$ CC3	$\lambda_{\perp}$ CC3	FA CC3	DM CC3
C01	1,6183	0,4813	0,6609	0,8603
C02	1,4369	0,4291	0,6478	0,765
C03	1,4612	0,5358	0,5766	0,8443
C04	1,6046	0,4429	0,6791	0,8301
C05	1,4868	0,4097	0,6753	0,7688
C06	1,4886	0,4273	0,6692	0,7811
C07	1,2944	0,3683	0,6658	0,677
C08	1,641	0,4362	0,6976	0,8378
C09	1,5583	0,4039	0,6985	0,7887
C10	1,5485	0,4129	0,6897	0,7914
C11	1,3744	0,41	0,6521	0,7315
C12	1,4189	0,3791	0,6849	0,7257
C13	1,4655	0,3796	0,6972	0,7416
C14	1,352	0,4155	0,6404	0,7277
C15	1,4917	0,4354	0,655	0,7875
C16	1,5409	0,3514	0,7326	0,7479
C17	1,4719	0,4212	0,6647	0,7714
C18	1,4895	0,3993	0,6834	0,7627
C19	1,3941	0,3762	0,6877	0,7155
C20	1,4364	0,4752	0,6114	0,7956
C21	1,3144	0,3561	0,6835	0,6755
C22	1,5997	0,4576	0,6758	0,8383
C23	1,4105	0,4522	0,6165	0,7716
C24	1,4379	0,3053	0,7576	0,6828
C25	1,424	0,4395	0,64	0,7677
C26	1,5169	0,3639	0,7203	0,7482
C27	1,4521	0,4328	0,6445	0,7726
C28	1,48	0,371	0,7071	0,7406
C29	1,4428	0,4044	0,6708	0,7505
C30	1,3699	0,3729	0,6787	0,7052
C31	1,7231	0,4145	0,721	0,8507
C32	1,4903	0,5306	0,5923	0,8504
C33	1,3602	0,436	0,6263	0,7441
C34	1,3348	0,4186	0,6349	0,724
Média	1,468544118	0,41605	0,6688	0,766876471
DP	0,096961042	0,047729251	0,038793775	0,050623405

CC3: Segmento 2 do corpo caloso, correspondente ao tronco médio posterior

DP: desvio padrão; $\lambda_{||}$ (10^{-3}mm/s^2): difusividade axial; $\lambda_{\perp}$ (10^{-3}mm/s^2): difusividade radial;
 FA: fração de anisotropia; DM(10^{-3}mm/s^2): difusividade média; C: indivíduo controle

Resultados individuais de *DTI* no grupo controle obtidos no CC4

CONTROLE	$\lambda_{ }$ CC4	$\lambda_{\perp}$ CC4	FA CC4	DM CC4
C01	1,609	0,3993	0,7178	0,8025
C02	1,5657	0,4411	0,6626	0,816
C03	1,5102	0,4816	0,6253	0,8245
C04	1,6184	0,5241	0,6218	0,8889
C05	1,5083	0,4012	0,6953	0,7702
C06	1,7971	0,5034	0,6878	0,9347
C07	1,4666	0,368	0,7112	0,7342
C08	1,493	0,4384	0,6544	0,7899
C09	1,5996	0,4396	0,6808	0,8262
C10	1,4967	0,4557	0,6449	0,8027
C11	1,4698	0,499	0,611	0,8226
C12	1,696	0,4218	0,7114	0,8466
C13	1,531	0,3977	0,695	0,7754
C14	1,6186	0,5208	0,6322	0,8867
C15	1,5136	0,4679	0,6369	0,8165
C16	1,6562	0,3698	0,7399	0,7986
C17	1,6292	0,3866	0,7236	0,8008
C18	1,5936	0,473	0,6566	0,8465
C19	1,5026	0,368	0,7183	0,7462
C20	1,5744	0,4747	0,6445	0,8413
C21	1,2904	0,3551	0,6826	0,6668
C22	1,5617	0,4884	0,6395	0,8462
C23	1,6182	0,4706	0,6685	0,8531
C24	1,5216	0,4683	0,6402	0,8194
C25	1,5386	0,4134	0,687	0,7884
C26	1,592	0,3807	0,7247	0,7845
C27	1,6407	0,4078	0,7045	0,8188
C28	1,4748	0,4548	0,6351	0,7972
C29	1,4973	0,3824	0,704	0,754
C30	1,3054	0,4482	0,6094	0,7339
C31	1,7275	0,415	0,7222	0,8525
C32	1,6759	0,5756	0,6066	0,9423
C33	1,4338	0,5156	0,5795	0,8216
C34	1,571	0,4912	0,6251	0,8511
Média	1,555838235	0,444082353	0,667652941	0,814729412
DP	0,103899357	0,054081821	0,042222988	0,054983631

CC4: Segmento 2 do corpo caloso, correspondente ao istmo

DP: desvio padrão; $\lambda_{||}$ (10^{-3}mm/s^2): difusividade axial; $\lambda_{\perp}$ (10^{-3}mm/s^2): difusividade radial; FA: fração de anisotropia; DM (10^{-3}mm/s^2): difusividade média; C: indivíduo controle

Resultados individuais de *DTI* no grupo controle obtidos no CC5

CONTROLE	$\lambda_{ }$ CC5	$\lambda_{\perp}$ CC5	FA CC5	DM CC5
C01	1,6086	0,3948	0,7179	0,7994
C02	1,7556	0,4521	0,703	0,8866
C03	1,8472	0,4711	0,7138	0,9298
C04	1,7017	0,3469	0,776	0,7985
C05	1,7532	0,3824	0,757	0,8394
C06	1,7507	0,3975	0,7554	0,8486
C07	1,8054	0,3517	0,7857	0,8362
C08	1,6522	0,3617	0,7487	0,7918
C09	1,683	0,396	0,7308	0,825
C10	1,7551	0,3797	0,7547	0,8381
C11	1,5434	0,3729	0,7204	0,7631
C12	1,6314	0,3796	0,7333	0,7969
C13	1,7612	0,2746	0,8247	0,7701
C14	1,6815	0,3978	0,7387	0,8257
C15	1,68	0,3752	0,7415	0,8101
C16	1,8056	0,3326	0,7905	0,8236
C17	1,7079	0,3395	0,7752	0,7956
C18	1,7792	0,4111	0,7338	0,8671
C19	1,6845	0,2959	0,7958	0,7588
C20	1,7076	0,4144	0,7169	0,8454
C21	1,606	0,3912	0,7259	0,7961
C22	1,7549	0,3422	0,7883	0,8131
C23	1,733	0,3358	0,7864	0,8015
C24	1,671	0,3819	0,7506	0,8116
C25	1,8871	0,3869	0,7717	0,887
C26	1,6941	0,4008	0,7431	0,8319
C27	1,5275	0,3167	0,7615	0,7203
C28	1,7208	0,3584	0,765	0,8125
C29	1,6569	0,3918	0,7355	0,8135
C30	1,6465	0,3403	0,7679	0,7753
C31	1,7737	0,3906	0,7567	0,8516
C32	1,7392	0,4465	0,7072	0,8774
C33	1,2606	0,3304	0,7038	0,6405
C34	1,6282	0,4195	0,7035	0,8224
Média	1,693955882	0,375308824	0,749438235	0,814838235
DP	0,109325932	0,042323962	0,030440752	0,051317266

CC5: Segmento 2 do corpo caloso, correspondente ao esplênio

DP: desvio padrão; $\lambda_{||}$ (10^{-3}mm/s^2): difusividade axial; $\lambda_{\perp}$ (10^{-3}mm/s^2): difusividade radial; FA: fração de anisotropia; DM (10^{-3}mm/s^2): difusividade média; C: indivíduo controle

Resultados individuais de *DTI* no grupo controle obtidos no CC total

CONTROLE	$\lambda_{ }$ CC total	$\lambda_{\perp}$ CC total	FA CC total	DM CC total
C01	1,6242	0,4488	0,6781	0,8406
C02	1,5968	0,4396	0,6736	0,8253
C03	1,6446	0,4907	0,6488	0,8753
C04	1,6775	0,4196	0,7118	0,8398
C05	1,576	0,378	0,7189	0,7755
C06	1,6555	0,4177	0,7145	0,8303
C07	1,5853	0,3822	0,7181	0,7832
C08	1,6503	0,457	0,6817	0,8547
C09	1,6273	0,4447	0,6806	0,8389
C10	1,6351	0,429	0,6914	0,831
C11	1,5757	0,4763	0,652	0,8427
C12	1,5357	0,4144	0,6855	0,7882
C13	1,5602	0,3563	0,7317	0,7576
C14	1,5584	0,4226	0,6861	0,8012
C15	1,648	0,4268	0,6965	0,8338
C16	1,6987	0,3771	0,7451	0,8176
C17	1,6035	0,364	0,7373	0,7771
C18	1,6317	0,4087	0,7075	0,8164
C19	1,5913	0,3724	0,7239	0,7787
C20	1,5917	0,4619	0,6575	0,8385
C21	1,4797	0,3768	0,7055	0,7444
C22	1,6899	0,4129	0,7186	0,8386
C23	1,6108	0,401	0,7087	0,8043
C24	1,5468	0,3943	0,7153	0,7784
C25	1,6904	0,4436	0,6957	0,8592
C26	1,6316	0,3913	0,7253	0,8047
C27	1,5509	0,3934	0,699	0,7792
C28	1,609	0,412	0,6995	0,811
C29	1,6183	0,4412	0,6862	0,8336
C30	1,5042	0,3938	0,6969	0,7639
C31	1,699	0,4509	0,6956	0,8669
C32	1,6146	0,5161	0,626	0,8823
C33	1,4103	0,3987	0,6696	0,7359
C34	1,5488	0,4751	0,6408	0,8329
Média	1,602111765	0,420261765	0,694802941	0,814167647
DP	0,06357151	0,038063464	0,02793545	0,037314054

CC total: Corpo caloso total

DP: desvio padrão; $\lambda_{||}$ (10^{-3} mm/s²): difusividade axial; $\lambda_{\perp}$ (10^{-3} mm/s²): difusividade radial;
 FA: fração de anisotropia; DM (10^{-3} mm/s²): difusividade média; C: indivíduo controle

ANEXO E – Resultados de espessura cortical nos conglomerados corticais com correlações estatísticas significativas

Resultados individuais nos pacientes EMRR da espessura cortical media em cada conglomerado cortical com diferença estatística significativa entre o grupo EMRR e controle

PACIENTE	Temp Esq (mm)	Front-Ins Dir (mm)	Temp Dir (mm)	Temp-par-occip Dir (mm)
P01	3,11	2,955	3,179	2,454
P02	3,364	3,03	3,049	2,601
P03	3,45	3,169	3,419	2,578
P04	2,954	2,751	2,968	2,339
P05	2,687	2,889	2,966	2,477
P06	3,041	2,863	2,921	2,282
P07	2,435	2,843	2,497	1,896
P08	2,872	2,9	2,951	2,443
P09	3,266	3,004	3,245	2,602
P10	3,22	2,687	3,133	2,657
P11	2,575	2,854	2,675	2,422
P12	3,411	3,193	3,479	2,766
P13	3,141	3,08	3,066	2,632
P14	3,762	3,267	3,48	2,286
P15	2,869	2,701	2,769	2,241
P16	3,166	3,038	3,112	2,224
P17	3,098	3,085	3,067	2,398
P18	3,285	2,872	3,257	2,475
P19	3,165	2,976	3,177	2,305
P20	2,714	2,894	2,579	2,424
P21	3,005	2,944	3,107	2,255
P22	3,072	3,133	2,982	2,699
P23	3,388	3,02	3,32	2,431
P24	3,353	2,854	3,353	2,873
P25	3,109	3,047	3,201	2,709
P26	3,214	2,768	2,986	2,617
P27	2,819	2,715	2,93	2,482
P28	2,288	2,586	2,776	2,426
P29	3,206	3,066	3,115	2,803
P30	3,024	3,266	2,951	2,853
P31	2,885	3,025	3,15	2,529
Média	3,06283871	2,970032258	2,950806452	3,06
DP	0,311439464	0,319882841	0,170454573	0,239955829

Fronto-Ins Dir: conglomerado cortical fronto-insular direito; Temp Dir: conglomerado cortical temporal direito; Temp Esq: conglomerado cortical temporal esquerdo; Temp-par-occip Dir: conglomerado cortical temporoparieto-occipital direito; P: paciente

Resultados individuais nos controles saudáveis da espessura cortical media em cada conglomerado cortical com diferença estatística significativa entre o grupo EMRR e controle

PACIENTE	Temp Esq (mm)	Front-Ins Dir (mm)	Temp Dir (mm)	Temp-par-occip Dir (mm)
C01	3,86	3,432	3,412	2,79
C02	3,377	3,268	3,021	2,842
C03	3,41	3,201	3,232	2,865
C04	3,431	3,118	3,385	2,631
C05	3,585	3,084	3,339	2,73
C06	3,377	2,978	3,374	2,809
C07	3,502	3,136	3,477	2,79
C08	3,339	3,12	3,44	2,474
C09	3,214	3,141	3,177	2,312
C10	3,586	3,051	3,118	2,536
C11	3,593	3,051	3,576	2,523
C12	3,583	3,074	3,219	2,499
C13	3,439	3,179	3,287	2,674
C14	3,067	3,045	3,209	2,666
C15	3,5	3,077	3,531	2,677
C16	3,08	2,899	3,066	2,705
C17	2,776	3,148	3,019	2,594
C18	3,211	2,979	3,152	2,641
C19	3,673	3,257	3,255	2,954
C20	3,397	3,108	3,273	2,963
C21	3,496	3,162	3,575	3,053
C22	3,033	3,061	2,751	2,383
C23	3,384	3,113	3,602	3,019
C24	3,241	3,1	3,311	2,832
C25	3,194	3,112	3,165	2,621
C26	3,079	3,088	3,069	2,537
C27	3,567	3,291	3,52	3,118
C28	3,176	3,285	3,256	2,722
C29	3,22	3,114	3,033	2,617
C30	3,274	3,193	3,443	2,814
C31	3,131	3,094	3,107	2,83
Média	3,340705882	3,093088235	3,134617647	3,276764706
DP	0,226089353	0,210998401	0,136163007	0,200984404

Fronto-Ins Dir: conglomerado cortical fronto-insular direito; Temp Dir: conglomerado cortical temporal direito; Temp Esq: conglomerado cortical temporal esquerdo; Temp-par-occip Dir: conglomerado cortical temporoparieto-occipital direito; C: controle

7 Referências

1. Alonso A, Hernan MA. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. *Neurology*. 2008;71(2):129-35. Epub 2008/07/09.
2. McDonald WI. Pathophysiology in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 1974;97(1):179-96. Epub 1974/03/01.
3. Bruck W, Stadelmann C. Inflammation and degeneration in multiple sclerosis. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*. 2003;24 Suppl 5:S265-7. Epub 2003/12/04.
4. Dhib-Jalbut S. Pathogenesis of myelin/oligodendrocyte damage in multiple sclerosis. *Neurology*. 2007;68(22 Suppl 3):S13-21; discussion S43-54. Epub 2007/07/20.
5. Barkhof F, Filippi M, Miller DH, Scheltens P, Campi A, Polman CH, et al. Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 1997;120 (Pt 11):2059-69. Epub 1997/12/16.
6. Ichikawa M, Koh CS, Inoue A, Tsuyusaki J, Yamazaki M, Inaba Y, et al. Anti-IL-12 antibody prevents the development and progression of multiple

sclerosis-like relapsing--remitting demyelinating disease in NOD mice induced with myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide. *Journal of neuroimmunology*. 2000;102(1):56-66. Epub 2000/01/08.

7. Ristori G, Giubilei F, Giunti D, Perna A, Gasperini C, Buttinelli C, et al. Myelin basic protein intramolecular spreading without disease progression in a patient with multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 2000;110(1-2):240-3. Epub 2000/10/12.

8. Stefferl A, Brehm U, Linington C. The myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG): a model for antibody-mediated demyelination in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Journal of neural transmission Supplementum*. 2000(58):123-33. Epub 2000/12/29.

9. Matthews PM, Pioro E, Narayanan S, De Stefano N, Fu L, Francis G, et al. Assessment of lesion pathology in multiple sclerosis using quantitative MRI morphometry and magnetic resonance spectroscopy. *Brain : a journal of neurology*. 1996;119 (Pt 3):715-22. Epub 1996/06/01.

10. Kolind SH, Laule C, Vavasour IM, Li DK, Traboulsee AL, Madler B, et al. Complementary information from multi-exponential T2 relaxation and diffusion tensor imaging reveals differences between multiple sclerosis lesions. *NeuroImage*. 2008;40(1):77-85. Epub 2008/01/30.

11. Bagnato F, Jeffries N, Richert ND, Stone RD, Ohayon JM, McFarland HF, et al. Evolution of T1 black holes in patients with multiple sclerosis imaged monthly for 4 years. *Brain : a journal of neurology*. 2003;126(Pt 8):1782-9. Epub 2003/06/25.
12. Nijeholt GJ, van Walderveen MA, Castelijns JA, van Waesberghe JH, Polman C, Scheltens P, et al. Brain and spinal cord abnormalities in multiple sclerosis. Correlation between MRI parameters, clinical subtypes and symptoms. *Brain : a journal of neurology*. 1998;121 (Pt 4):687-97. Epub 1998/05/13.
13. Filippi M, Paty DW, Kappos L, Barkhof F, Compston DA, Thompson AJ, et al. Correlations between changes in disability and T2-weighted brain MRI activity in multiple sclerosis: a follow-up study. *Neurology*. 1995;45(2):255-60. Epub 1995/02/01.
14. Confavreux C, Vukusic S. Age at disability milestones in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 2006;129(Pt 3):595-605. Epub 2006/01/18.
15. Confavreux C, Vukusic S, Adeleine P. Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. *Brain : a journal of neurology*. 2003;126(Pt 4):770-82. Epub 2003/03/05.

16. McDonald WI, Sears TA. Effect of demyelination on conduction in the central nervous system. *Nature*. 1969;221(5176):182-3. Epub 1969/01/11.

17. Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Bruck W. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain : a journal of neurology*. 2000;123 (Pt 6):1174-83. Epub 2000/05/29.

18. Bitsch A, Kuhlmann T, Stadelmann C, Lassmann H, Lucchinetti C, Bruck W. A longitudinal MRI study of histopathologically defined hypointense multiple sclerosis lesions. *Annals of neurology*. 2001;49(6):793-6. Epub 2001/06/21.

19. Esiri MM, Gay D. Immunological and neuropathological significance of the Virchow-Robin space. *Journal of the neurological sciences*. 1990;100(1-2):3-8. Epub 1990/12/01.

20. Ge Y, Grossman RI, Udupa JK, Babb JS, Mannon LJ, McGowan JC. Magnetization transfer ratio histogram analysis of normal-appearing gray matter and normal-appearing white matter in multiple sclerosis. *Journal of computer assisted tomography*. 2002;26(1):62-8. Epub 2002/01/22.

21. Stefano ND, Narayanan S, Matthews PM, Mortilla M, Dotti MT, Federico A, et al. Proton MR spectroscopy to assess axonal damage in

multiple sclerosis and other white matter disorders. *Journal of neurovirology*. 2000;6 Suppl 2:S121-9. Epub 2000/06/29.

22. De Stefano N, Narayanan S, Matthews PM, Francis GS, Antel JP, Arnold DL. In vivo evidence for axonal dysfunction remote from focal cerebral demyelination of the type seen in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 1999;122 (Pt 10):1933-9. Epub 1999/10/03.

23. Filippi M, Bozzali M, Rovaris M, Gonen O, Kesavadas C, Ghezzi A, et al. Evidence for widespread axonal damage at the earliest clinical stage of multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 2003;126(Pt 2):433-7. Epub 2003/01/23.

24. Hasan KM, Gupta RK, Santos RM, Wolinsky JS, Narayana PA. Diffusion tensor fractional anisotropy of the normal-appearing seven segments of the corpus callosum in healthy adults and relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI*. 2005;21(6):735-43. Epub 2005/05/21.

25. Evangelou N, Esiri MM, Smith S, Palace J, Matthews PM. Quantitative pathological evidence for axonal loss in normal appearing white matter in multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 2000;47(3):391-5. Epub 2000/03/15.

26. De Stefano N, Matthews PM, Fu L, Narayanan S, Stanley J, Francis GS, et al. Axonal damage correlates with disability in patients with relapsing-

remitting multiple sclerosis. Results of a longitudinal magnetic resonance spectroscopy study. *Brain : a journal of neurology*. 1998;121 (Pt 8):1469-77. Epub 1998/08/26.

27. Audoin B, Ibarrola D, Malikova I, Soulier E, Confort-Gouny S, Duong MV, et al. Onset and underpinnings of white matter atrophy at the very early stage of multiple sclerosis--a two-year longitudinal MRI/MRSI study of corpus callosum. *Mult Scler*. 2007;13(1):41-51. Epub 2007/02/14.

28. Audoin B, Zaaraoui W, Reuter F, Rico A, Malikova I, Confort-Gouny S, et al. Atrophy mainly affects the limbic system and the deep grey matter at the first stage of multiple sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2010;81(6):690-5. Epub 2010/04/16.

29. Benedict RH, Hussein S, Englert J, Dwyer MG, Abdelrahman N, Cox JL, et al. Cortical atrophy and personality in multiple sclerosis. *Neuropsychology*. 2008;22(4):432-41. Epub 2008/07/02.

30. Yuan W, McAllister JP, 2nd, Lindquist DM, Gill N, Holland SK, Henkel D, et al. Diffusion tensor imaging of white matter injury in a rat model of infantile hydrocephalus. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*. 2011. Epub 2011/10/14.

31. Song SK, Sun SW, Ju WK, Lin SJ, Cross AH, Neufeld AH. Diffusion tensor imaging detects and differentiates axon and myelin degeneration in

mouse optic nerve after retinal ischemia. *NeuroImage*. 2003;20(3):1714-22. Epub 2003/12/04.

32. Song SK, Yoshino J, Le TQ, Lin SJ, Sun SW, Cross AH, et al. Demyelination increases radial diffusivity in corpus callosum of mouse brain. *NeuroImage*. 2005;26(1):132-40. Epub 2005/05/03.

33. Chenevert TL, Brunberg JA, Pipe JG. Anisotropic diffusion in human white matter: demonstration with MR techniques in vivo. *Radiology*. 1990;177(2):401-5. Epub 1990/11/01.

34. Chien D, Buxton RB, Kwong KK, Brady TJ, Rosen BR. MR diffusion imaging of the human brain. *Journal of computer assisted tomography*. 1990;14(4):514-20. Epub 1990/07/01.

35. Pierpaoli C, Jezzard P, Basser PJ, Barnett A, Di Chiro G. Diffusion tensor MR imaging of the human brain. *Radiology*. 1996;201(3):637-48. Epub 1996/12/01.

36. Basser PJ, Pierpaoli C. Microstructural and physiological features of tissues elucidated by quantitative-diffusion-tensor MRI. *Journal of magnetic resonance Series B*. 1996;111(3):209-19. Epub 1996/06/01.

37. Fasano F, Bozzali M, Cercignani M, Hagberg GE. A highly sensitive radial diffusion measurement method for white matter tract investigation. *Magnetic resonance imaging*. 2009;27(4):519-30. Epub 2008/10/03.
38. Bhadelia RA, Price LL, Tedesco KL, Scott T, Qiu WQ, Patz S, et al. Diffusion tensor imaging, white matter lesions, the corpus callosum, and gait in the elderly. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2009;40(12):3816-20. Epub 2009/10/03.
39. Chang MC, Jang SH. Corpus callosum injury in patients with diffuse axonal injury: a diffusion tensor imaging study. *NeuroRehabilitation*. 2010;26(4):339-45. Epub 2010/06/18.
40. Coombs BD, Best A, Brown MS, Miller DE, Corboy J, Baier M, et al. Multiple sclerosis pathology in the normal and abnormal appearing white matter of the corpus callosum by diffusion tensor imaging. *Mult Scler*. 2004;10(4):392-7. Epub 2004/08/26.
41. Hofer S, Frahm J. Topography of the human corpus callosum revisited--comprehensive fiber tractography using diffusion tensor magnetic resonance imaging. *NeuroImage*. 2006;32(3):989-94. Epub 2006/07/21.
42. Hofer S, Merboldt KD, Tammer R, Frahm J. Rhesus monkey and human share a similar topography of the corpus callosum as revealed by

diffusion tensor MRI in vivo. *Cereb Cortex*. 2008;18(5):1079-84. Epub 2007/08/22.

43. Wahl M, Lauterbach-Soon B, Hattingen E, Jung P, Singer O, Volz S, et al. Human motor corpus callosum: topography, somatotopy, and link between microstructure and function. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(45):12132-8. Epub 2007/11/09.

44. Pandya DN, Karol EA, Heilbronn D. The topographical distribution of interhemispheric projections in the corpus callosum of the rhesus monkey. *Brain research*. 1971;32(1):31-43. Epub 1971/09/10.

45. Dineen RA, Vilisaar J, Hlinka J, Bradshaw CM, Morgan PS, Constantinescu CS, et al. Disconnection as a mechanism for cognitive dysfunction in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 2009;132(Pt 1):239-49. Epub 2008/10/28.

46. Aboitiz F, Montiel J. One hundred million years of interhemispheric communication: the history of the corpus callosum. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica* [et al]. 2003;36(4):409-20. Epub 2003/04/18.

-
47. Aboitiz F, Scheibel AB, Fisher RS, Zaidel E. Individual differences in brain asymmetries and fiber composition in the human corpus callosum. *Brain research*. 1992;598(1-2):154-61. Epub 1992/12/11.
48. Aboitiz F, Scheibel AB, Fisher RS, Zaidel E. Fiber composition of the human corpus callosum. *Brain research*. 1992;598(1-2):143-53. Epub 1992/12/11.
49. Barazany D, Basser PJ, Assaf Y. In vivo measurement of axon diameter distribution in the corpus callosum of rat brain. *Brain : a journal of neurology*. 2009;132(Pt 5):1210-20. Epub 2009/05/01.
50. Horakova D, Dwyer MG, Havrdova E, Cox JL, Dolezal O, Bergsland N, et al. Gray matter atrophy and disability progression in patients with early relapsing-remitting multiple sclerosis: a 5-year longitudinal study. *Journal of the neurological sciences*. 2009;282(1-2):112-9. Epub 2009/01/27.
51. Antulov R, Carone DA, Bruce J, Yella V, Dwyer MG, Tjoa CW, et al. Regionally distinct white matter lesions do not contribute to regional gray matter atrophy in patients with multiple sclerosis. *Journal of neuroimaging : official journal of the American Society of Neuroimaging*. 2011;21(3):210-8. Epub 2010/04/24.

-
52. Sailer M, Fischl B, Salat D, Tempelmann C, Schonfeld MA, Busa E, et al. Focal thinning of the cerebral cortex in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 2003;126(Pt 8):1734-44. Epub 2003/06/14.
53. Calabrese M, Atzori M, Bernardi V, Morra A, Romualdi C, Rinaldi L, et al. Cortical atrophy is relevant in multiple sclerosis at clinical onset. *Journal of neurology*. 2007;254(9):1212-20. Epub 2007/03/16.
54. Bergsland N, Horakova D, Dwyer MG, Dolezal O, Seidl ZK, Vaneckova M, et al. Subcortical and Cortical Gray Matter Atrophy in a Large Sample of Patients with Clinically Isolated Syndrome and Early Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *AJNR American journal of neuroradiology*. 2012. Epub 2012/04/14.
55. Bendfeldt K, Kappos L, Radue EW, Borgwardt SJ. Progression of gray matter atrophy and its association with white matter lesions in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences*. 2009;285(1-2):268-9; author reply 9. Epub 2009/06/09.
56. Charil A, Dagher A, Lerch JP, Zijdenbos AP, Worsley KJ, Evans AC. Focal cortical atrophy in multiple sclerosis: relation to lesion load and disability. *NeuroImage*. 2007;34(2):509-17. Epub 2006/11/23.
57. Gorgoraptis N, Wheeler-Kingshott CA, Jenkins TM, Altmann DR, Miller DH, Thompson AJ, et al. Combining tractography and cortical

measures to test system-specific hypotheses in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2010;16(5):555-65. Epub 2010/03/11.

58. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Annals of neurology.* 1983;13(3):227-31. Epub 1983/03/01.

59. Cazzullo CL, Ghezzi A, Zibetti A. [Neurophysiological tests in the diagnosis of multiple sclerosis. Visual and somatosensory evoked potential studies]. *Minerva medica.* 1981;72(26):1689-96. Epub 1981/06/30. Test neurofisiologici nella diagnosi di sclerosi multipla. Studio mediante potenziali evocati visivi e somatosenoriali.

60. Likosky W, Elmore RS. Exacerbation detection in multiple sclerosis by clinical and evoked potential techniques: a preliminary report. *Advances in neurology.* 1982;32:535-40. Epub 1982/01/01.

61. Gerson B, Orr JM. Oligoclonal bands and quantitation of IgG in cerebrospinal fluid as indicators of multiple sclerosis. *American journal of clinical pathology.* 1980;73(1):87-91. Epub 1980/01/01.

62. Paty DW, Oger JJ, Kastrukoff LF, Hashimoto SA, Hooge JP, Eisen AA, et al. MRI in the diagnosis of MS: a prospective study with comparison of

clinical evaluation, evoked potentials, oligoclonal banding, and CT. *Neurology*. 1988;38(2):180-5. Epub 1988/02/01.

63. Lee KH, Hashimoto SA, Hooge JP, Kastrukoff LF, Oger JJ, Li DK, et al. Magnetic resonance imaging of the head in the diagnosis of multiple sclerosis: a prospective 2-year follow-up with comparison of clinical evaluation, evoked potentials, oligoclonal banding, and CT. *Neurology*. 1991;41(5):657-60. Epub 1991/05/01.

64. Fazekas F, Offenbacher H, Fuchs S, Schmidt R, Niederkorn K, Horner S, et al. Criteria for an increased specificity of MRI interpretation in elderly subjects with suspected multiple sclerosis. *Neurology*. 1988;38(12):1822-5. Epub 1988/12/01.

65. Tas MW, Barkhol F, van Walderveen MA, Polman CH, Hommes OR, Valk J. The effect of gadolinium on the sensitivity and specificity of MR in the initial diagnosis of multiple sclerosis. *AJNR American journal of neuroradiology*. 1995;16(2):259-64. Epub 1995/02/01.

66. Horowitz AL, Kaplan RD, Grewe G, White RT, Salberg LM. The ovoid lesion: a new MR observation in patients with multiple sclerosis. *AJNR American journal of neuroradiology*. 1989;10(2):303-5. Epub 1989/03/01.

67. Namer IJ, Yu O, Mauss Y, Dumitresco BE, Chambron J. An evaluation of the significance of areas of intense signal in the MR brain images of

patients with multiple sclerosis. Magnetic resonance imaging. 1993;11(3):311-7. Epub 1993/01/01.

68. Gean-Marton AD, Vezina LG, Marton KI, Stimac GK, Peyster RG, Taveras JM, et al. Abnormal corpus callosum: a sensitive and specific indicator of multiple sclerosis. Radiology. 1991;180(1):215-21. Epub 1991/07/01.

69. Grossman RI, Gonzalez-Scarano F, Atlas SW, Galetta S, Silberberg DH. Multiple sclerosis: gadolinium enhancement in MR imaging. Radiology. 1986;161(3):721-5. Epub 1986/12/01.

70. Tintore M, Rovira A, Martinez MJ, Rio J, Diaz-Villoslada P, Brieva L, et al. Isolated demyelinating syndromes: comparison of different MR imaging criteria to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. AJNR American journal of neuroradiology. 2000;21(4):702-6. Epub 2000/04/27.

71. Roman GC. Vascular dementia revisited: diagnosis, pathogenesis, treatment, and prevention. The Medical clinics of North America. 2002;86(3):477-99. Epub 2002/08/10.

72. Roman GC. On the history of lacunes, etat crible, and the white matter lesions of vascular dementia. Cerebrovasc Dis. 2002;13 Suppl 2:1-6. Epub 2002/03/20.

-
73. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 2001;50(1):121-7. Epub 2001/07/18.
74. Swanton JK, Rovira A, Tintore M, Altmann DR, Barkhof F, Filippi M, et al. MRI criteria for multiple sclerosis in patients presenting with clinically isolated syndromes: a multicentre retrospective study. *Lancet neurology*. 2007;6(8):677-86. Epub 2007/07/10.
75. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Annals of neurology*. 2005;58(6):840-6. Epub 2005/11/12.
76. Swanton JK, Fernando K, Dalton CM, Miszkiel KA, Thompson AJ, Plant GT, et al. Modification of MRI criteria for multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndromes. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2006;77(7):830-3. Epub 2005/07/27.
77. Rovira A, Swanton J, Tintore M, Huerga E, Barkhof F, Filippi M, et al. A single, early magnetic resonance imaging study in the diagnosis of multiple sclerosis. *Archives of neurology*. 2009;66(5):587-92. Epub 2009/05/13.

78. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Annals of neurology*. 2011;69(2):292-302. Epub 2011/03/10.
79. Montalban X, Tintore M, Swanton J, Barkhof F, Fazekas F, Filippi M, et al. MRI criteria for MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology*. 2010;74(5):427-34. Epub 2010/01/08.
80. Barkhof F, Rocca M, Francis G, Van Waesberghe JH, Uitdehaag BM, Hommes OR, et al. Validation of diagnostic magnetic resonance imaging criteria for multiple sclerosis and response to interferon beta1a. *Annals of neurology*. 2003;53(6):718-24. Epub 2003/06/05.
81. Filippi M, Rocca MA, Calabrese M, Sormani MP, Rinaldi F, Perini P, et al. Intracortical lesions: relevance for new MRI diagnostic criteria for multiple sclerosis. *Neurology*. 2010;75(22):1988-94. Epub 2010/12/01.
82. Grassiot B, Desgranges B, Eustache F, Defer G. Quantification and clinical relevance of brain atrophy in multiple sclerosis: a review. *Journal of neurology*. 2009;256(9):1397-412. Epub 2009/04/09.
83. Agosta F, Pievani M, Sala S, Geroldi C, Galluzzi S, Frisoni GB, et al. White matter damage in Alzheimer disease and its relationship to gray matter atrophy. *Radiology*. 2011;258(3):853-63. Epub 2010/12/24.

-
84. Anderson VM, Fernando KT, Davies GR, Rashid W, Frost C, Fox NC, et al. Cerebral atrophy measurement in clinically isolated syndromes and relapsing remitting multiple sclerosis: a comparison of registration-based methods. *Journal of neuroimaging : official journal of the American Society of Neuroimaging*. 2007;17(1):61-8. Epub 2007/01/24.
85. Gauthier SA, Berger AM, Liptak Z, Duan Y, Egorova S, Buckle GJ, et al. Rate of brain atrophy in benign vs early multiple sclerosis. *Archives of neurology*. 2009;66(2):234-7. Epub 2009/02/11.
86. Ceccarelli A, Rocca MA, Valsasina P, Rodegher M, Pagani E, Falini A, et al. A multiparametric evaluation of regional brain damage in patients with primary progressive multiple sclerosis. *Human brain mapping*. 2009;30(9):3009-19. Epub 2009/01/28.
87. Brainin M, Neuhold A, Reisner T, Maida E, Lang S, Deecke L. Changes within the "normal" cerebral white matter of multiple sclerosis patients during acute attacks and during high-dose cortisone therapy assessed by means of quantitative MRI. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1989;52(12):1355-9. Epub 1989/12/01.
88. van Walderveen MA, Barkhof F, Hommes OR, Polman CH, Tobi H, Frequin ST, et al. Correlating MRI and clinical disease activity in multiple sclerosis: relevance of hypointense lesions on short-TR/short-TE (T1-

weighted) spin-echo images. *Neurology*. 1995;45(9):1684-90. Epub 1995/09/01.

89. De Coene B, Hajnal JV, Gatehouse P, Longmore DB, White SJ, Oatridge A, et al. MR of the brain using fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR) pulse sequences. *AJNR American journal of neuroradiology*. 1992;13(6):1555-64. Epub 1992/11/01.

90. Palmer S, Bradley WG, Chen DY, Patel S. Subcallosal striations: early findings of multiple sclerosis on sagittal, thin-section, fast FLAIR MR images. *Radiology*. 1999;210(1):149-53. Epub 1999/01/14.

91. Filippi M, Yousry T, Baratti C, Horsfield MA, Mammi S, Becker C, et al. Quantitative assessment of MRI lesion load in multiple sclerosis. A comparison of conventional spin-echo with fast fluid-attenuated inversion recovery. *Brain : a journal of neurology*. 1996;119 (Pt 4):1349-55. Epub 1996/08/01.

92. Filippi M, Horsfield MA, Campi A, Mammi S, Pereira C, Comi G. Resolution-dependent estimates of lesion volumes in magnetic resonance imaging studies of the brain in multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 1995;38(5):749-54. Epub 1995/11/01.

93. Bink A, Schmitt M, Gaa J, Mugler JP, 3rd, Lanfermann H, Zanella FE. Detection of lesions in multiple sclerosis by 2D FLAIR and single-slab 3D

FLAIR sequences at 3.0 T: initial results. *European radiology*. 2006;16(5):1104-10. Epub 2006/01/21.

94. Tubridy N, Barker GJ, Macmanus DG, Moseley IF, Miller DH. Three-dimensional fast fluid attenuated inversion recovery (3D fast FLAIR): a new MRI sequence which increases the detectable cerebral lesion load in multiple sclerosis. *The British journal of radiology*. 1998;71(848):840-5. Epub 1998/11/26.

95. Geurts JJ, Pouwels PJ, Uitdehaag BM, Polman CH, Barkhof F, Castelijns JA. Intracortical lesions in multiple sclerosis: improved detection with 3D double inversion-recovery MR imaging. *Radiology*. 2005;236(1):254-60. Epub 2005/07/01.

96. Geurts JJ, Rosendaal SD, Calabrese M, Ciccarelli O, Agosta F, Chard DT, et al. Consensus recommendations for MS cortical lesion scoring using double inversion recovery MRI. *Neurology*. 2011;76(5):418-24. Epub 2011/01/07.

97. Simon B, Schmidt S, Lukas C, Gieseke J, Traber F, Knol DL, et al. Improved in vivo detection of cortical lesions in multiple sclerosis using double inversion recovery MR imaging at 3 Tesla. *European radiology*. 2010;20(7):1675-83. Epub 2010/01/23.

-
98. Stankiewicz JM, Glanz BI, Healy BC, Arora A, Neema M, Benedict RH, et al. Brain MRI lesion load at 1.5T and 3T versus clinical status in multiple sclerosis. *Journal of neuroimaging : official journal of the American Society of Neuroimaging*. 2011;21(2):e50-6. Epub 2009/11/06.
99. de Graaf WL, Kilsdonk ID, Lopez-Soriano A, Zwanenburg JJ, Visser F, Polman CH, et al. Clinical application of multi-contrast 7-T MR imaging in multiple sclerosis: increased lesion detection compared to 3 T confined to grey matter. *European radiology*. 2012. Epub 2012/08/18.
100. de Graaf WL, Zwanenburg JJ, Visser F, Wattjes MP, Pouwels PJ, Geurts JJ, et al. Lesion detection at seven Tesla in multiple sclerosis using magnetisation prepared 3D-FLAIR and 3D-DIR. *European radiology*. 2012;22(1):221-31. Epub 2011/08/30.
101. Wolff SD, Balaban RS. Magnetization transfer contrast (MTC) and tissue water proton relaxation in vivo. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*. 1989;10(1):135-44. Epub 1989/04/01.
102. Brochet B, Dousset V. Pathological correlates of magnetization transfer imaging abnormalities in animal models and humans with multiple sclerosis. *Neurology*. 1999;53(5 Suppl 3):S12-7. Epub 1999/09/25.

-
103. Chen JT, Collins DL, Atkins HL, Freedman MS, Arnold DL. Magnetization transfer ratio evolution with demyelination and remyelination in multiple sclerosis lesions. *Annals of neurology*. 2008;63(2):254-62. Epub 2008/02/08.
104. Filippi M, Comi G. Magnetization transfer ratio changes in a symptomatic lesion of a patient at presentation with possible multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences*. 1997;151(1):79-81. Epub 1997/10/23.
105. Ge Y, Grossman RI, Babb JS, He J, Mannon LJ. Dirty-appearing white matter in multiple sclerosis: volumetric MR imaging and magnetization transfer ratio histogram analysis. *AJNR American journal of neuroradiology*. 2003;24(10):1935-40. Epub 2003/11/20.
106. Vrenken H, Pouwels PJ, Ropele S, Knol DL, Geurts JJ, Polman CH, et al. Magnetization transfer ratio measurement in multiple sclerosis normal-appearing brain tissue: limited differences with controls but relationships with clinical and MR measures of disease. *Mult Scler*. 2007;13(6):708-16. Epub 2007/07/07.
107. Hayton T, Furby J, Smith KJ, Altmann DR, Brenner R, Chataway J, et al. Grey matter magnetization transfer ratio independently correlates with neurological deficit in secondary progressive multiple sclerosis. *Journal of neurology*. 2009;256(3):427-35. Epub 2009/03/10.

108. Ge Y, Grossman RI, Udupa JK, Babb JS, Kolson DL, McGowan JC. Magnetization transfer ratio histogram analysis of gray matter in relapsing-remitting multiple sclerosis. *AJNR American journal of neuroradiology*. 2001;22(3):470-5. Epub 2001/03/10.
109. Fisniku LK, Altmann DR, Cercignani M, Tozer DJ, Chard DT, Jackson JS, et al. Magnetization transfer ratio abnormalities reflect clinically relevant grey matter damage in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2009;15(6):668-77. Epub 2009/05/14.
110. Frahm J, Bruhn H, Gyngell ML, Merboldt KD, Hanicke W, Sauter R. Localized high-resolution proton NMR spectroscopy using stimulated echoes: initial applications to human brain in vivo. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*. 1989;9(1):79-93. Epub 1989/01/01.
111. Bruhn H, Frahm J, Gyngell ML, Merboldt KD, Hanicke W, Sauter R. Cerebral metabolism in man after acute stroke: new observations using localized proton NMR spectroscopy. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*. 1989;9(1):126-31. Epub 1989/01/01.
112. Kjaer M. The value of a multimodal evoked potential approach in the diagnosis of multiple sclerosis. *Advances in neurology*. 1982;32:507-12. Epub 1982/01/01.

113. Gadea M, Martinez-Bisbal MC, Marti-Bonmati L, Espert R, Casanova B, Coret F, et al. Spectroscopic axonal damage of the right locus coeruleus relates to selective attention impairment in early stage relapsing-remitting multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 2004;127(Pt 1):89-98. Epub 2003/09/25.
114. De Stefano N, Narayanan S, Mortilla M, Guidi L, Bartolozzi ML, Federico A, et al. Imaging axonal damage in multiple sclerosis by means of MR spectroscopy. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*. 2000;21(4 Suppl 2):S883-7. Epub 2001/02/24.
115. Le Bihan D, Mangin JF, Poupon C, Clark CA, Pappata S, Molko N, et al. Diffusion tensor imaging: concepts and applications. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI*. 2001;13(4):534-46. Epub 2001/03/29.
116. Bauer WR, Nadler W. Stationary flow, first passage times, and macroscopic Fick's first diffusion law: application to flow enhancement by particle trapping. *The Journal of chemical physics*. 2005;122(24):244904. Epub 2005/07/23.
117. Brown R. A brief account of microscopical observations made in the months of june, july and august, 1827, on the particles contained in the pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies. *Philosophical Magazine*. 1828;4:161-3.

118. Özarslan EB, P.J. Introduction to diffusion MRI. In: Johansen-Berg HB, T.E.J., editor. Diffusion MRI. Oxford, UK: Elsevier Inc.; 2009. p. 3-10.
119. Pipe J. Pulse sequences for diffusion-weighted MRI. In: Johansen-Berg HB, T.E.J., editor. Diffusion MRI. Oxford, UK: Elsevier Inc.; 2009. p. 11-36.
120. Jones DK. Gaussian modeling of the diffusion signal. In: Johansen-Berg HB, T.E.J., editor. Diffusion MRI. Oxford, UK: Elsevier Inc.; 2009. p. 37-54.
121. Basser PJ, Mattiello J, LeBihan D. Estimation of the effective self-diffusion tensor from the NMR spin echo. Journal of magnetic resonance Series B. 1994;103(3):247-54. Epub 1994/03/01.
122. Lythgoe MF, Busza AL, Calamante F, Sotak CH, King MD, Bingham AC, et al. Effects of diffusion anisotropy on lesion delineation in a rat model of cerebral ischemia. Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine. 1997;38(4):662-8. Epub 1997/11/05.
123. Basser PJ, Mattiello J, LeBihan D. MR diffusion tensor spectroscopy and imaging. Biophysical journal. 1994;66(1):259-67. Epub 1994/01/01.

-
124. Umarova RM, Saur D, Schnell S, Kaller CP, Vry MS, Glauche V, et al. Structural connectivity for visuospatial attention: significance of ventral pathways. *Cereb Cortex*. 2010;20(1):121-9. Epub 2009/05/02.
125. Agre P, Nielsen S, Ottersen OP. Towards a molecular understanding of water homeostasis in the brain. *Neuroscience*. 2004;129(4):849-50. Epub 2004/11/25.
126. Basser PJ, Jones DK. Diffusion-tensor MRI: theory, experimental design and data analysis - a technical review. *NMR in biomedicine*. 2002;15(7-8):456-67. Epub 2002/12/19.
127. Goldberg-Zimring D, Mewes AU, Maddah M, Warfield SK. Diffusion tensor magnetic resonance imaging in multiple sclerosis. *Journal of neuroimaging : official journal of the American Society of Neuroimaging*. 2005;15(4 Suppl):68S-81S. Epub 2005/12/31.
128. Guilfoyle DN, Helpert JA, Lim KO. Diffusion tensor imaging in fixed brain tissue at 7.0 T. *NMR in biomedicine*. 2003;16(2):77-81. Epub 2003/05/06.
129. Beaulieu C, Allen PS. Determinants of anisotropic water diffusion in nerves. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*. 1994;31(4):394-400. Epub 1994/04/01.

-
130. Beaulieu C. The biological basis of diffusion anisotropy. In: Johansen-Berg HB, T.E.J., editor. Diffusion MRI. Oxford, UK: Elsevier Inc.; 2009. p. 105-26.
131. Song SK, Sun SW, Ramsbottom MJ, Chang C, Russell J, Cross AH. Demyelination revealed through MRI as increased radial (but unchanged axial) diffusion of water. *NeuroImage*. 2002;17(3):1429-36. Epub 2002/11/05.
132. Stanisz GJ, Midha R, Munro CA, Henkelman RM. MR properties of rat sciatic nerve following trauma. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*. 2001;45(3):415-20. Epub 2001/03/10.
133. Kinoshita Y, Ohnishi A, Kohshi K, Yokota A. Apparent diffusion coefficient on rat brain and nerves intoxicated with methylmercury. *Environmental research*. 1999;80(4):348-54. Epub 1999/05/20.
134. Sun SW, Liang HF, Cross AH, Song SK. Evolving Wallerian degeneration after transient retinal ischemia in mice characterized by diffusion tensor imaging. *NeuroImage*. 2008;40(1):1-10. Epub 2008/01/12.
135. Concha L, Gross DW, Wheatley BM, Beaulieu C. Diffusion tensor imaging of time-dependent axonal and myelin degradation after corpus callosotomy in epilepsy patients. *NeuroImage*. 2006;32(3):1090-9. Epub 2006/06/13.

-
136. Mac Donald CL, Dikranian K, Bayly P, Holtzman D, Brody D. Diffusion tensor imaging reliably detects experimental traumatic axonal injury and indicates approximate time of injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(44):11869-76. Epub 2007/11/06.
137. Mac Donald CL, Dikranian K, Song SK, Bayly PV, Holtzman DM, Brody DL. Detection of traumatic axonal injury with diffusion tensor imaging in a mouse model of traumatic brain injury. *Experimental neurology*. 2007;205(1):116-31. Epub 2007/03/21.
138. Onu M, Roceanu A, Sboto-Frankenstien U, Bendic R, Tarta E, Preoteasa F, et al. Diffusion abnormality maps in demyelinating disease: correlations with clinical scores. *European journal of radiology*. 2012;81(3):e386-91. Epub 2012/01/20.
139. Senda J, Watanabe H, Tsuboi T, Hara K, Watanabe H, Nakamura R, et al. MRI mean diffusivity detects widespread brain degeneration in multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences*. 2012;319(1-2):105-10. Epub 2012/05/26.
140. Yu HJ, Christodoulou C, Bhise V, Greenblatt D, Patel Y, Serafin D, et al. Multiple white matter tract abnormalities underlie cognitive impairment in RRMS. *NeuroImage*. 2012;59(4):3713-22. Epub 2011/11/09.

141. Roosendaal SD, Geurts JJ, Vrenken H, Hulst HE, Cover KS, Castelijns JA, et al. Regional DTI differences in multiple sclerosis patients. *NeuroImage*. 2009;44(4):1397-403. Epub 2008/11/26.
142. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33(11):1444-52. Epub 1983/11/01.
143. Kurtzke JF. On the evaluation of disability in multiple sclerosis. *Neurology*. 1961;11:686-94. Epub 1961/08/01.
144. Fischl B, Salat DH, Busa E, Albert M, Dieterich M, Haselgrove C, et al. Whole brain segmentation: automated labeling of neuroanatomical structures in the human brain. *Neuron*. 2002;33(3):341-55. Epub 2002/02/08.
145. Fischl B, Salat DH, van der Kouwe AJ, Makris N, Segonne F, Quinn BT, et al. Sequence-independent segmentation of magnetic resonance images. *NeuroImage*. 2004;23 Suppl 1:S69-84. Epub 2004/10/27.
146. Fischl B, Dale AM. Measuring the thickness of the human cerebral cortex from magnetic resonance images. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(20):11050-5. Epub 2000/09/14.

-
147. Fischl B, van der Kouwe A, Destrieux C, Halgren E, Segonne F, Salat DH, et al. Automatically parcellating the human cerebral cortex. *Cereb Cortex*. 2004;14(1):11-22. Epub 2003/12/05.
148. Talairach J, Tournoux P. Co-planar stereotaxic atlas of the human brain : 3-dimensional proportional system : an approach to cerebral imaging. Stuttgart ; New York: Georg Thieme; 1988. 122 p. p.
149. Fischl B, Sereno MI, Dale AM. Cortical surface-based analysis. II: Inflation, flattening, and a surface-based coordinate system. *NeuroImage*. 1999;9(2):195-207. Epub 1999/02/05.
150. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Bruck W, Rauschka H, Bergmann M, et al. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 2005;128(Pt 11):2705-12. Epub 2005/10/19.
151. Mesaros S, Rocca MA, Riccitelli G, Pagani E, Rovaris M, Caputo D, et al. Corpus callosum damage and cognitive dysfunction in benign MS. *Human brain mapping*. 2009;30(8):2656-66. Epub 2008/12/11.
152. Evangelou N, Konz D, Esiri MM, Smith S, Palace J, Matthews PM. Size-selective neuronal changes in the anterior optic pathways suggest a differential susceptibility to injury in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 2001;124(Pt 9):1813-20. Epub 2001/08/28.

-
153. Wheeler-Kingshott CA, Cercignani M. About "axial" and "radial" diffusivities. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*. 2009;61(5):1255-60. Epub 2009/03/03.
154. Lin F, Yu C, Liu Y, Li K, Lei H. Diffusion tensor group tractography of the corpus callosum in clinically isolated syndrome. *AJNR American journal of neuroradiology*. 2011;32(1):92-8. Epub 2010/10/23.
155. Sigal T, Shmuel M, Mark D, Gil H, Anat A. Diffusion Tensor Imaging of Corpus Callosum Integrity in Multiple Sclerosis: Correlation with Disease Variables. *Journal of neuroimaging : official journal of the American Society of Neuroimaging*. 2010. Epub 2010/12/03.
156. Evangelou N, Konz D, Esiri MM, Smith S, Palace J, Matthews PM. Regional axonal loss in the corpus callosum correlates with cerebral white matter lesion volume and distribution in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 2000;123 (Pt 9):1845-9. Epub 2000/08/26.
157. Ozturk A, Smith SA, Gordon-Lipkin EM, Harrison DM, Shiee N, Pham DL, et al. MRI of the corpus callosum in multiple sclerosis: association with disability. *Mult Scler*. 2010;16(2):166-77. Epub 2010/02/10.

-
158. Ingle GT, Stevenson VL, Miller DH, Thompson AJ. Primary progressive multiple sclerosis: a 5-year clinical and MR study. *Brain : a journal of neurology*. 2003;126(Pt 11):2528-36. Epub 2003/08/07.
159. Miller DH, Barkhof F, Frank JA, Parker GJ, Thompson AJ. Measurement of atrophy in multiple sclerosis: pathological basis, methodological aspects and clinical relevance. *Brain : a journal of neurology*. 2002;125(Pt 8):1676-95. Epub 2002/07/24.
160. Chard DT, Griffin CM, McLean MA, Kapeller P, Kapoor R, Thompson AJ, et al. Brain metabolite changes in cortical grey and normal-appearing white matter in clinically early relapsing-remitting multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 2002;125(Pt 10):2342-52. Epub 2002/09/24.
161. Ceccarelli A, Rocca MA, Falini A, Tortorella P, Pagani E, Rodegher M, et al. Normal-appearing white and grey matter damage in MS. A volumetric and diffusion tensor MRI study at 3.0 Tesla. *Journal of neurology*. 2007;254(4):513-8. Epub 2007/04/03.
162. Jahn O, Tenzer S, Werner HB. Myelin proteomics: molecular anatomy of an insulating sheath. *Molecular neurobiology*. 2009;40(1):55-72. Epub 2009/05/20.

163. Rodriguez M. A function of myelin is to protect axons from subsequent injury: implications for deficits in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 2003;126(Pt 4):751-2. Epub 2003/03/05.
164. Schaeren-Wiemers N, Bonnet A, Erb M, Erne B, Bartsch U, Kern F, et al. The raft-associated protein MAL is required for maintenance of proper axon--glia interactions in the central nervous system. *The Journal of cell biology*. 2004;166(5):731-42. Epub 2004/09/01.
165. Yu HJ, Christodoulou C, Bhise V, Greenblatt D, Patel Y, Serafin D, et al. Multiple white matter tract abnormalities underlie cognitive impairment in RRMS. *NeuroImage*. 2011. Epub 2011/11/09.
166. Confavreux C, Vukusic S. Natural history of multiple sclerosis: a unifying concept. *Brain : a journal of neurology*. 2006;129(Pt 3):606-16. Epub 2006/01/18.
167. Landman BA, Farrell JA, Smith SA, Reich DS, Calabresi PA, van Zijl PC. Complex geometric models of diffusion and relaxation in healthy and damaged white matter. *NMR in biomedicine*. 2010;23(2):152-62. Epub 2009/09/10.
168. De Stefano N, Battaglini M, Smith SM. Measuring brain atrophy in multiple sclerosis. *Journal of neuroimaging : official journal of the American Society of Neuroimaging*. 2007;17 Suppl 1:10S-5S. Epub 2007/04/12.

-
169. De Stefano N, Giorgio A, Battaglini M, Rovaris M, Sormani MP, Barkhof F, et al. Assessing brain atrophy rates in a large population of untreated multiple sclerosis subtypes. *Neurology*. 2010;74(23):1868-76. Epub 2010/06/10.
170. Dalton CM, Chard DT, Davies GR, Miszkiel KA, Altmann DR, Fernando K, et al. Early development of multiple sclerosis is associated with progressive grey matter atrophy in patients presenting with clinically isolated syndromes. *Brain : a journal of neurology*. 2004;127(Pt 5):1101-7. Epub 2004/03/05.
171. Dalton CM, Miszkiel KA, O'Connor PW, Plant GT, Rice GP, Miller DH. Ventricular enlargement in MS: one-year change at various stages of disease. *Neurology*. 2006;66(5):693-8. Epub 2006/03/15.
172. Pagani E, Rocca MA, Gallo A, Rovaris M, Martinelli V, Comi G, et al. Regional brain atrophy evolves differently in patients with multiple sclerosis according to clinical phenotype. *AJNR American journal of neuroradiology*. 2005;26(2):341-6. Epub 2005/02/15.
173. Battaglini M, Giorgio A, Stromillo ML, Bartolozzi ML, Guidi L, Federico A, et al. Voxel-wise assessment of progression of regional brain atrophy in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences*. 2009;282(1-2):55-60. Epub 2009/03/17.

174. Chen JT, Narayanan S, Collins DL, Smith SM, Matthews PM, Arnold DL. Relating neocortical pathology to disability progression in multiple sclerosis using MRI. *NeuroImage*. 2004;23(3):1168-75. Epub 2004/11/06.
175. Kutzelnigg A, Lassmann H. Cortical demyelination in multiple sclerosis: a substrate for cognitive deficits? *Journal of the neurological sciences*. 2006;245(1-2):123-6. Epub 2006/05/03.
176. Lanz M, Hahn HK, Hildebrandt H. Brain atrophy and cognitive impairment in multiple sclerosis: a review. *Journal of neurology*. 2007;254 Suppl 2:II43-8. Epub 2007/05/16.
177. Scalfari A, Neuhaus A, Degenhardt A, Rice GP, Muraro PA, Daumer M, et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 10: relapses and long-term disability. *Brain : a journal of neurology*. 2010;133(Pt 7):1914-29. Epub 2010/06/11.
178. Calabrese M, Agosta F, Rinaldi F, Mattisi I, Grossi P, Favaretto A, et al. Cortical lesions and atrophy associated with cognitive impairment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Archives of neurology*. 2009;66(9):1144-50. Epub 2009/09/16.
179. Rimkus CdM, Junqueira TdF, Lyra KP, Jackowski MP, Machado MAR, Miotto EC, et al. Corpus Callosum Microstructural Changes Correlate with Cognitive Dysfunction in Early Stages of Relapsing-Remitting Multiple

Sclerosis: Axial and Radial Diffusivities Approach. Multiple Sclerosis International. 2011;2011:1-7.

180. Sammler D, Kotz SA, Eckstein K, Ott DV, Friederici AD. Prosody meets syntax: the role of the corpus callosum. Brain : a journal of neurology. 2010;133(9):2643-55. Epub 2010/08/31.

181. Binkofski F, Fink GR, Geyer S, Buccino G, Gruber O, Shah NJ, et al. Neural activity in human primary motor cortex areas 4a and 4p is modulated differentially by attention to action. Journal of neurophysiology. 2002;88(1):514-9. Epub 2002/07/02.

182. Bastiani M, Shah NJ, Goebel R, Roebroek A. Human cortical connectome reconstruction from diffusion weighted MRI: the effect of tractography algorithm. NeuroImage. 2012;62(3):1732-49. Epub 2012/06/16.

8 Apêndice

Hindawi Publishing Corporation
Multiple Sclerosis International
Volume 2011, Article ID 304875, 7 pages
doi:10.1155/2011/304875

Clinical Study

Corpus Callosum Microstructural Changes Correlate with Cognitive Dysfunction in Early Stages of Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: Axial and Radial Diffusivities Approach

Carolina de Medeiros Rimkus,¹ Thiago de Faria Junqueira,² Katarina Paz Lyra,¹
Marcel P. Jackowski,³ Melissa A. R. Machado,⁴ Eliane C. Miotto,⁴ Dagoberto Callegaro,²
Maria Concepción García Otaduy,¹ and Claudia da Costa Leite¹

¹ Department of Radiology, Laboratory of Medical Investigation (LIM-44), School of Medicine, University of São Paulo (FM-USP), 05403-000 São Paulo, SP, Brazil

² Department of Neurology, Clinical Hospital, School of Medicine, University of São Paulo (FM-USP), 05403-000 São Paulo, SP, Brazil

³ Department of Computational Sciences, Institute of Mathematics and Statistics, University of São Paulo (IME-USP), 05403-000 São Paulo, SP, Brazil

⁴ Department of Neurology, Division of Neuropsychology, Clinical Hospital, School of Medicine University of São Paulo (FM-USP), 05403-000 São Paulo, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to Carolina de Medeiros Rimkus, carolina.rimkus@usp.br

Received 15 November 2010; Revised 11 April 2011; Accepted 28 April 2011

Academic Editor: Angelo Ghezzi

Copyright © 2011 Carolina de Medeiros Rimkus et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The corpus callosum is the largest fiber bundle in the central nervous system and it takes part in several cognitive pathways. It can be affected by multiple sclerosis (MS) early in the disease. DTI is capable of inferring the microstructural organization of the white matter. The vectorial analysis of the DTI offers the more specific indices of axial diffusivity (AD) and radial diffusivity (RD), which have shown to be useful to discriminate myelin damage from axon loss, respectively. This study presents DTI results (mean diffusivity (MD), fractional anisotropy (FA), RD, and AD) of 23 relapsing-remitting MS patients and its correlation with cognitive performance. There were 47.8% of cognitive impaired patients (MS CI). We found signs of demyelination, reflected by increased RD, and incipient axon loss, reflected by AD increase, which was slightly higher in the MS CI. The cognitive changes correlated with the DTI parameters, suggesting that loss of complexity in CC connections can impair neural conduction. Thus, cognitive impairment can be related to callosal disconnection, and DTI can be a promising tool to evaluate those changes.

1. Introduction

Cognitive impairment is one of the major factors affecting the social functioning and quality of life of multiple sclerosis (MS) patients, being described in 45–65% of the clinical cases [1, 2]. The scales most commonly used for clinical classification of MS-related disability, such as the expanded disability status scale (EDSS) [3], are focused on locomotor dysfunction. Probably because of the multifocal characteristic of MS lesions, these traditional disability scales correlate poorly with cognitive disease-related changes in MS [4, 5]. In the last decade, it has been proposed to include the application of multimodality neuropsychological tests

(NPT) in the assessment of clinical stage of MS, which resulted in a more comprehensive scale, the multiple sclerosis functional composite (MSFC) [6, 7].

Great efforts are being done in medical and biomedical studies aiming to design a map of cognitive functions [8–10]. However, given the complexity of cognitive pathways and cortical and subcortical connectivity, it is difficult to identify a single isolated domain for each cognitive skill.

The corpus callosum (CC) is the major fiber bundle in the central nervous system (CNS) and plays a critical role in the interhemispheric communication, taking part in most of the cognitive pathways [5, 11, 12]. Its fibers connect the cortical and subcortical regions of the brain hemispheres

interconnecting the auditory, sensory-motor, and memory information [13]. The CC is one of the sites most frequently affected by demyelinating lesions in MS, and the onset of those lesions happens very early in the disease [14, 15]. Additionally, CC atrophy is very common in MS [16, 17], and histopathologic studies have detected signs of axon loss and decreased fibers density in the CC of subjects with relapsing-remitting (RR) and secondary progressive (SP) MS [18]. There are also evidences that regional axonal loss in the CC is related to white matter lesions projected in the cerebral hemispheres [19, 20]. For all these reasons, it is conceivable that cognitive impairment in MS can be partially related to commissural disconnection [21].

Conventional MR imaging is useful to demonstrate MS macroscopic white matter (WM) lesions, but more recent research failed to prove direct relationship of clinical progression of the disability and brain atrophy with cumulative lesion volume [22]. In consideration with those findings, other factors such as Wallerian degeneration, axon dysfunction, and microscopic degeneration are gaining importance in the evaluation of the disease process, and several MRI techniques are being developed to access them [18, 23, 24].

Diffusion MRI techniques are based on the evaluation of random motion of water molecules and can provide insights about the tissue organization. DTI has evolved from those techniques, improving the evaluation of tissue microstructure and allowing the reconstruction of white matter tracts [25–27]. The main scalar parameters, obtained by DTI, fractional anisotropy (FA), and mean diffusivity (MD), are known to characterize alterations in myelin sheath and cell membrane integrity, but they are not specific for demyelination or axon loss. The coordinates of the tensor matrix can be diagonalized to extract the three Eigenvalues, λ_1 , λ_2 , and λ_3 , derived from the main eigenvectors of diffusion elements [26]. The combination of those eigenvalues defines two other and more specific parameters, the axial diffusivity (AD), parallel with the axon fibers, and the radial diffusivity (RD), perpendicular to axon fibers. The increases in those values are believed to represent axon loss and demyelination, respectively [25, 28].

The purpose of this study is to determine by DTI whether the microstructure of the CC is already altered in MS patients with short disease duration, and to establish if these DTI parameters are correlated with observed cognitive disability.

2. Materials and Methods

2.1. Subjects. Twenty-three clinically defined MS patients (15 females) with relapsing-remitting course from an outpatient clinic were selected for the study. The mean age of the patient group was 31.95 ± 9.2 years (range 18–48 years), with a mean disease duration of 2.4 ± 1.4 years (range 0.4–4.74 years) and expanded disability status scale (EDSS) of 1.37 ± 1.2 (range 0–4.5).

Out of twenty-two, twelve patients received immunomodulatory therapy for at least six months (4 patients on glatiramer acetate, 3 on interferon beta-1a, and 5 on interferon beta-1b), without presenting significant side effects. All

patients were out of clinical relapse and were steroid-free for at least three months prior to MRI examination.

A control group of twelve healthy volunteers (HC) (9 females) with age and educational level matched to our patients was also studied. The mean age of the HC was 27.75 ± 5.4 years (range 20–37 years), without significant difference with the MS patients ($P = 0.12$). There was no significant difference in the educational level between MS patients (14.23 ± 3.3 years of school education) and healthy subjects (14.87 ± 3.4 years of school education) ($P = 0.87$).

Subjects with significant depression measured by the Beck Depression Inventory (score 14 or higher) were excluded from the study.

The study protocol was approved by the local ethical committee (CAPPESQ 0450/09). All subjects agreed to participate in the study by signing a written informed consent.

2.2. Magnetic Resonance and Diffusion Tensor Imaging. Brain MRI exams were performed in a 3.0 T magnetic resonance scanner (Intera Achieva, PHILIPS Healthcare, Best, The Netherlands) with an 8-channel head coil. Sixty to sixty-seven contiguous 2 mm axial slices were acquired covering the whole brain, using a diffusion-weighted spin-echo (SE) single shot echo planar imaging (EPI) sequence, with a b -value of 0 and 1000 s/mm², 32 diffusion encoding directions, field of view (FOV) = 256×256 mm, and a matrix size of 128×128 .

Obtained DTI data were spatially coregistered with the scanner software and post processed with BioImage Suite 3.0 (<http://www.bioimagesuite.org>). Fractional anisotropy (FA), mean diffusivity (MD), and eigenvalue maps were generated for each subject. Two radiologists, C. M. Rimkus and K. P. Lyra, by consensus, manually delineated the medial section of the corpus callosum (CC) in the individual FA map defining the volume of interest (VOI) (Figure 1). The whole volume of the CC was included in the VOI mask, without lesion exclusion. Low anisotropy threshold of 0.2 was used to exclude voxels from adjacent structures or ventricles.

The axial diffusivity (AD) was represented by the main eigenvalue, parallel to the CC fibers, and the radial diffusivity (RD) was calculated from the mean of the two other eigenvalues, perpendicular to the CC fibers.

A fast spin echo (FSE) proton density-(PD-) weighted image (echo time (TE) = 20 ms; repetition time (TR) = 1775 ms; 28 contiguous 4.5 mm slices; matrix size = 320×320 ; FOV = 183×230 mm²) was used for lesion load analysis. An experienced neuroradiologist, C. M. Rimkus, performed the whole brain and CC manual segmentation of hyperintense lesions.

2.3. Neuropsychological Evaluation. The neuropsychological tests (NPTs) were administered by a skilled psychologist, M.A. R. Machado, in a single 2 h comprehensive evaluation where major domains of cognitive function were tested. Many of the tests used were from the Wechsler adult intelligence scale (WAIS-III) [29]. Briefly, the battery included tests of attention and information processing (Stroop, trail making test (TMT), symbol digit modalities test (SDMT) [30]), executive functions (Wisconsin card sorting

TABLE 1: Results of DTI scalar maps (FA and MD) and vectorial diffusivity (AD and RD) in MS patients and healthy controls.

	MS patients	MS CP	MS CI	HC
MD (10^{-3} mm ² /s)	0.8611 $\pm$ 0.05	0.8492 $\pm$ 0.04	0.8741 $\pm$ 0.05	0.791 $\pm$ 0.04
FA	0.6879 $\pm$ 0.03	0.6899 $\pm$ 0.03	0.6858 $\pm$ 0.03	0.7206 $\pm$ 0.03
AD (10^{-3} mm ² /s)	1.6788 $\pm$ 0.06	1.6591 $\pm$ 0.06	1.7003 $\pm$ 0.05	1.6102 $\pm$ 0.08
RD (10^{-3} mm ² /s)	0.4487 $\pm$ 0.04	0.4451 $\pm$ 0.04	0.4528 $\pm$ 0.04	0.3818 $\pm$ 0.03
Whole brain lesion load	10.16 mL $\pm$ 9.8	9.54 mL $\pm$ 6.5	10.9 mL $\pm$ 12.8	—
CC lesion load	0.65 mL $\pm$ 0.7	0.77 mL $\pm$ 0.6	0.51 mL $\pm$ 0.7	—

TABLE 2: Pearson's correlation test evaluating possible correlations between DTI parameters and demographic characteristics of the sample.

	Age	Educational level	Duration of the disease	EDSS
MD	$r = -0.05$	$r = -0.19$	$r = 0.37$	$r = 0.45^*$
FA	$r = 0.22$	$r = 0.25$	$r = -0.02$	$r = -0.31$
AD	$r = 0.05$	$r = -0.09$	$r = 0.29$	$r = 0.38$
RD	$r = -0.09$	$r = -0.25$	$r = 0.26$	$r = 0.45^*$

* Significant correlation ($P = 0.03$).

test (WCST) [31], verbal fluency with phonemic association tests (FAS), and category association [32]), memory functions including short-term and working memory (Digit Span Forward and Backward and Letter-Number Sequencing from WAIS-III), long-term memory (Logical Memory, Hopkins verbal learning tests (HVL) [33], Rey-Osterrieth complex figure (ROCF) delayed recall [34] and brief visual spatial memory test (BVM) [35]), visuospatial functions (Block Design Test from WAIS III and ROCF copy), and verbal skills (Boston test and WAIS-III Vocabulary [29]). The intellectual function was also estimated by WAIS III-revised full-scale intelligence quotient (WAIS III-R FSIQ).

The individual score for each test was normalized based on the mean score and standard deviation of healthy adult population, obtaining the z -score [36]. The results below the 5th percentile were defined as abnormal.

Patients with three or more abnormal tests were classified as cognitive impaired.

No subject in the HC group was considered cognitive impaired, mild impairment was observed in four subjects for one task and in another one for two tasks.

The Beck depression inventory was also applied to exclude subjects with significant depression levels, which could interfere in the NPT.

2.4. Statistical Analysis. Descriptive statistics of demographic data such as age, sex, gender, and scholar level were analyzed to discriminate the distribution, frequency, and percentage of each of those variables in the sample and to characterize differences between the groups. Possible bias determined by the sample's demographic characteristics in the DTI parameters was tested by the Pearson's correlation test. This correlation test was also used to explore the correlation between DTI parameters and NPT and between them and MS patients' whole brain and CC lesion loads.

(a)

(b)

FIGURE 1: Sagittal view of an individual FA map with the demarcation of the CC (a). In detail is the obtained CC mask (b).

The MS patients were divided in cognitive impaired (MS CI) and cognitive preserved (MS CP). Mann-Whitney nonparametric t -test was used to evaluate significant differences in DTI parameters between MS patients and HC and between MS CI and MS CP. A P value <0.05 was considered significant.

The cognitive tasks were grouped by functional domain, and the relative frequency of abnormal tests in each domain in the MS patients' group was demonstrated.

3. Results

3.1. Diffusion Tensor Imaging. In Table 1, DTI results obtained from the CC of MS patients, HC, MS CP, and MS CI groups and the respective lesion loads are shown. Compared to HC, MS patients presented in the CC significantly higher mean MD ($P < 0.0001$) and lower mean FA ($P = 0.002$). The RD ($P < 0.0001$) and AD ($P = 0.009$) were also significantly increased in MS patients. Both MS CP and MS CI presented significant differences in all DTI parameters compared to HC. The AD was slightly higher in MS CI compared to MS CP ($P = 0.048$).

TABLE 3: Frequency of subjects with abnormal tests in the main cognitive domains in the MS patient subgroups.

	MS patients	MS CP	MS CI
Short-term and working memory	8.7%	0.0%	18.2%
Long-term memory	60.9%	33.3%	90.9%
Executive functions	21.7%	8.3%	36.4%
Attention and information processing speed	60.9%	25.0%	100.0%
Verbal skills	0.0%	0.0%	0.0%
Visual spatial processing and construction	4.3%	0.0%	9.1%

TABLE 4: Pearson's correlation test between the main cognitive tasks and DTI parameters (considering z scores of all MS patients).

		MD	FA	AD	RD
HVLIT-Immediate recall	r	0.09	0.25	0.12	-0.04
	P -value	0.7	0.2	0.6	0.9
HVLIT-Delayed recall	r	0.33	-0.32	0.04	0.45
	P -value	0.1	0.1	0.8	0.03*
ROCF-Delayed recall	r	-0.10	0.15	-0.05	-0.014
	P -value	0.6	0.5	0.8	0.5
Logical memory I	r	-0.07	0.16	0.05	-0.21
	P -value	0.7	0.6	0.8	0.3
Logical memory II	r	-0.02	0.41	0.2	-0.21
	P -value	0.9	0.05**	0.3	0.3
Symbol Digit (SDMT)	r	-0.37	0.46	-0.17	-0.37
	P -value	0.07**	0.02*	0.4	0.07**
TMT	r	-0.31	-0.01	-0.37	-0.18
	P -value	0.1	0.9	0.08**	0.4
Stroop	r	-0.33	0.36	-0.12	-0.39
	P -value	0.1	0.08**	0.6	0.06**
FAS	r	-0.29	0.2	-0.17	-0.24
	P -value	0.2	0.3	0.4	0.3
Category association	r	-0.09	-0.04	-0.24	0.03
	P -value	0.7	0.9	0.3	0.9
Wisconsin	r	0.03	-0.15	-0.18	0.14
	P -value	0.9	0.5	0.3	0.5

* Significant correlation between cognitive test and DTI parameter.

** Cognitive tests that presented a tendency of correlation with the respective DTI parameter.

All patients, except one, presented lesions in the CC (range 0 to 35 lesions, mean 10.2 ± 7.7). There was no significant difference between MS CP and MS CI lesion loads (Figures 2 and 3).

Pearson's test showed no correlation of DTI results and whole brain or CC lesion loads. There was also no correlation with disease duration, educational, or age level. A correlation of MD and RD with EDss ($P = 0.03$) was found (Table 2).

3.2. Neuropsychological Characteristics. Twelve patients (52.2%) were classified as MS CP and eleven (47.8%) as MS CI. Table 3 summarizes the frequency of subjects with abnormal tests in each of the principal functional domains. In the most affected domains, the performance of the cognitive impaired patients was worse both qualitatively and quantitatively. MS CI had 1 to 3 tests below the 5th percentile of z scores in the sustained attention and information processing speed (IPS) domain (mean 1.7 ± 0.8) while MS CP had up to 1 test abnormal (mean 0.25 ± 0.45). In

long-term memory tests, MS CI had up to 5 abnormal tests (mean 2.5 ± 1.5) while MS CP had up to 2 (mean 0.4 ± 0.7). In executive functions, MS CI had up to 2 abnormal tests (mean 0.5 ± 0.7) and in the MS CP, only one subject had 1 abnormal test (mean 0.1 ± 0.3).

Table 4 summarizes the correlation between the principal affected cognitive tasks and the DTI parameters.

The intellectual performances (WAISS III-R FSIQ) of the MS patients and HC were within the normal rates of the population.

There was no correlation between the NPT performances and the lesion loads.

4. Discussion

Cognitive decline can affect MS patients very early in the disease. In a group of MS patients with less than five years of disease, 47.8% were found to be cognitive impaired. The patients in this study presented deficits in sustained attention

and IPS, long-term memory, and executive functions. The MS CI group showed also mild impairment in the short-term and working memory, visual-spatial, and construction tests.

The cognitive dysfunction was concomitant with DTI changes in the CC. MS group of patients showed decreased FA and increased MD compared to the matched HC, which can be interpreted as loss of complexity in the white matter tracts in the initial pathological process. The analysis of the principal eigenvalue (AD), parallel to axon fibers, and the average of the second and third eigenvalues (RD), perpendicular to fiber tracts, showed significant increase in RD and AD in MS patients.

It is believed that the increased RD reflects the demyelination degree while increased AD represents signs of axon loss [25, 28]. Although MS is classified as a myelin-related disease, several studies have reported loss of axons both in MS plaques as well as in the normal-appearing white matter (NAWM). Axon loss can be less prominent than demyelination, but its importance is recognized in the pathogenesis of symptoms [37, 38].

The observation of slightly increased AD in the MS CI patients reinforces the role of axon loss in the cognitive dysfunction. We neither have found significant differences in RD between MS CP and MS CI nor the DTI parameters have correlated with whole brain or CC lesion loads. Despite the fact that our relatively small sample can underestimate RD or lesion load differences, it is conceivable to hypothesize that other factors than demyelination itself or gliotic lesions can lead to cellular death and axon degeneration. Traditionally, the loss of axons in MS was associated with fiber transection due to inflammation and demyelination in the plaques, possibly conducting to Wallerian degeneration [38, 39], but more recent studies point that it might be an underlying diffuse axonopathy that contributes to the process of neurodegeneration [18, 20, 38].

The pattern of cognitive impairment is similar to the findings of previous studies [5, 40, 41]. Although there are some variations in the NPT results due to differences in the tests applied, the sample sizes, and patients' characteristics, the main abnormalities were found to be in sustained attention and IPS, executive functions, and memory domains. The functions more frequently related to CC microscopic lesion are in the attention and IPS and executive domains, suggesting anterior commissural damage with compromise of frontal and prefrontal pathways [20].

In this study, the stronger correlation was present between SDMT (attention and IPS) with FA ($P = 0.02$) and HVLt-delayed recall with RD ($P = 0.03$). The sustained attention and IPS domain presented other tests with a tendency to correlate with the DTI parameters: SDMT with MD and RD, TMT with AD, and Stroop test with FA and RD. The transverse characteristic of this study only provides a static picture of a dynamic process. It is not possible to predict the previous cognitive performance and the precise neuropsychological decline of the patients, and some of them might have greater functional reserve, diminishing the power of those correlations- in this sample. Additionally, slight differences in the AD within the MS patients were present, which suggests different degrees of axon loss. These findings

FIGURE 2: Female patient with high lesion load and no significant cognitive deficit. The PD axial image at the level of the body of the lateral ventricles and CC (a) shows lesions at the periventricular and subcortical white matter. The detail of mid-sagittal FLAIR (b) shows the abundance of macroscopic lesion in the CC and callosal-septal interface.

can reflect incipient heterogeneity of the sample, softening the direct correlations between DTI and NPT.

Neither the duration of the disease nor the age level of the patients correlated with the DTI parameters. Only subjects with short duration of the disease composed the sample; so, it was expected that this variable would not interfere in the image parameters. Previous studies showed that the peak of highest FA and lower MD in the CC happens between the ages of 21–44 years [42], and the main age-related DTI changes are described after 7th and 8th decades of life [43]. So, in our population with age range from 18 to 48 years, the DTI findings are more likely to be related with the MS disease than with the patients' ages.

However, MD and RD showed correlation with EDSS, suggesting possible relationship between callosal demyelination and sensory-motor dysfunction. The primary motor function takes part in the cortical spinal tract, but the inter-hemispheric communication of this pathway depends on midbody CC fibers [20, 38]. Hypothetically, the callosal

FIGURE 3: Female patient with low lesion load and significant cognitive deficit. The PD axial image illustrates the presence of few lesions in the supratentorial white matter, despite the cognitive deficit.

disconnection can partially impair this neural conduction and influence the EDSS.

5. Conclusions

Cognitive impairment can be observed early in MS disease process, but it affects the MS population in different ways. The MS patients present signs of demyelination and loss of complexity of the CC, but patients with cognitive dysfunction might present earlier and more prominent axon loss, which could be related to incipient differences in the clinical and histological profile.

The cognitive decline is not directly associated to the macroscopic lesion load. Thus, advanced neuroimage studies are demanded to access microscopic abnormalities in the principal fiber tracts and functional pathways. The vectorial characteristic of the diffusion tensors makes it possible to explore signs of demyelination and axon loss, making of it a promising and noninvasive tool to evaluate MS pathological changes.

Acknowledgments

The authors thank FAPESP (2005/56464-9)—PROGRAMA CINAPCE—for financial support. They also thank Miriam Harumi Tsunemi and Gilson Vieira for helping with the statistical analysis of this study.

References

- [1] S. M. Rao, G. J. Leo, L. Ellington, T. Nauertz, L. Bernardin, and F. Unverzagt, "Cognitive dysfunction in multiple sclerosis. II. Impact on employment and social functioning," *Neurology*, vol. 41, no. 5, pp. 692–696, 1991.
- [2] M. P. Amato, V. Zipoli, B. Goretti et al., "Benign multiple sclerosis: cognitive, psychological and social aspects in a clinical cohort," *Journal of Neurology*, vol. 253, no. 8, pp. 1054–1059, 2006.
- [3] J. F. Kurtzke, "Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS)," *Neurology*, vol. 33, no. 11, pp. 1442–1452, 1983.
- [4] M. P. Amato and E. Portaccio, "Clinical outcome measures in multiple sclerosis," *Journal of the Neurological Sciences*, vol. 259, no. 1–2, pp. 118–122, 2007.
- [5] S. Mesaros, M. A. Rocca, G. Riccitelli et al., "Corpus callosum damage and cognitive dysfunction in benign MS," *Human Brain Mapping*, vol. 30, no. 8, pp. 2656–2666, 2009.
- [6] R. Rudick, J. Antel, C. Confavreux et al., "Recommendations from the national multiple sclerosis society clinical outcomes assessment task force," *Annals of Neurology*, vol. 42, no. 3, pp. 379–382, 1997.
- [7] M. Hoogs, S. Morrow, and R. H. B. Benedict, "Utility of routine neuropsychological assessment for early identification of cognitive impairment in MS," *International MS Journal*, vol. 17, no. 1, pp. 6–11, 2010.
- [8] P. A. Arnett, S. M. Rao, L. Bernardin, J. Grafman, F. Z. Yetkin, and L. Lobeck, "Relationship between frontal lobe lesions and Wisconsin card sorting test performance in patients with multiple sclerosis," *Neurology*, vol. 44, no. 3, pp. 420–425, 1994.
- [9] J. Foong, L. Rozewicz, G. Quaghebeur et al., "Executive function in multiple sclerosis. The role of frontal lobe pathology," *Brain*, vol. 120, no. 1, pp. 15–26, 1997.
- [10] R. A. Sperling, C. R. G. Guttmann, M. J. Hohol et al., "Regional magnetic resonance imaging lesion burden and cognitive function in multiple sclerosis: a longitudinal study," *Archives of Neurology*, vol. 58, no. 1, pp. 115–121, 2001.
- [11] S. D. Moffat, E. Hampson, and D. H. Lee, "Morphology of the planum temporale and corpus callosum in left handers with evidence of left and right hemisphere speech representation," *Brain*, vol. 121, no. 12, pp. 2369–2379, 1998.
- [12] F. Aboitiz, A. B. Scheibel, R. S. Fisher, and E. Zaidel, "Fiber composition of the human corpus callosum," *Brain Research*, vol. 598, no. 2, pp. 143–153, 1992.
- [13] M. Hines, L. Chiu, L. A. McAdams, P. M. Bentler, and J. Lipcamon, "Cognition and the corpus callosum: verbal fluency, visuospatial ability, and language lateralization related to midsagittal surface areas of callosal subregions," *Behavioral Neuroscience*, vol. 106, no. 1, pp. 3–14, 1992.
- [14] A. D. Gean-Marton, L. G. Vezina, K. I. Marton et al., "Abnormal corpus callosum: a sensitive and specific indicator of multiple sclerosis," *Radiology*, vol. 180, no. 1, pp. 215–221, 1991.
- [15] J. H. Simon, S. L. Holtas, R. B. Schiffer et al., "Corpus callosum and subcallosal-periventricular lesions in multiple sclerosis: detection with MR," *Radiology*, vol. 160, no. 2, pp. 363–367, 1986.
- [16] F. Barkhof, M. Elton, J. Lindeboom et al., "Functional correlates of callosal atrophy in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. A preliminary MRI study," *Journal of Neurology*, vol. 245, no. 3, pp. 153–158, 1998.
- [17] M. Juha, S. Leszek, F. Sten et al., "Progression of non-age-related callosal brain atrophy in multiple sclerosis: a 9-year longitudinal MRI study representing four decades of disease development," *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, vol. 78, no. 4, pp. 375–380, 2007.
- [18] N. Evangelou, D. Konz, M. M. Esiri, S. Smith, J. Palace, and P. M. Matthews, "Quantitative pathological evidence for axonal loss in normal appearing white matter in multiple sclerosis," *Annals of Neurology*, vol. 47, no. 3, pp. 391–395, 2000.

- [19] M. C. de Lacoste, J. B. Kirkpatrick, and E. D. Ross, "Topography of the human corpus callosum," *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, vol. 44, no. 6, pp. 578–591, 1985.
- [20] N. Evangelou, D. Konz, M. M. Esiri, S. Smith, J. Palace, and P. M. Matthews, "Regional axonal loss in the corpus callosum correlates with cerebral white matter lesion volume and distribution in multiple sclerosis," *Brain*, vol. 123, no. 9, pp. 1845–1849, 2000.
- [21] J. W. Pan, L. B. Krupp, L. E. Elkins, and P. K. Coyle, "Cognitive dysfunction lateralizes with NAA in multiple sclerosis," *Applied Neuropsychology*, vol. 8, no. 3, pp. 155–166, 2001.
- [22] M. Rovaris, G. Iannucci, M. Falautano et al., "Cognitive dysfunction in patients with mildly disabling relapsing-remitting multiple sclerosis: an exploratory study with diffusion tensor MR imaging," *Journal of the Neurological Sciences*, vol. 195, no. 2, pp. 103–109, 2002.
- [23] D. Cox, D. Pelletier, C. Genain et al., "The unique impact of changes in normal appearing brain tissue on cognitive dysfunction in secondary progressive multiple sclerosis patients," *Multiple Sclerosis*, vol. 10, no. 6, pp. 626–629, 2004.
- [24] G. J. M. Parker, K. E. Stephan, G. J. Barker et al., "Initial demonstration of in vivo tracing of axonal projections in the macaque brain and comparison with the human brain using diffusion tensor imaging and fast marching tractography," *NeuroImage*, vol. 15, no. 4, pp. 797–809, 2002.
- [25] C. A. M. Wheeler-Kingshott and M. Cercignani, "About 'axial' and 'radial' diffusivities," *Magnetic Resonance in Medicine*, vol. 61, no. 5, pp. 1255–1260, 2009.
- [26] J. L. Y. Cheong, D. K. Thompson, H. X. Wang et al., "Abnormal white matter signal on MR imaging is related to abnormal tissue microstructure," *American Journal of Neuroradiology*, vol. 30, no. 3, pp. 623–628, 2009.
- [27] M. D. Budde, J. H. Kim, H. F. Liang, J. H. Russell, A. H. Cross, and S. K. Song, "Axonal injury detected by in vivo diffusion tensor imaging correlates with neurological disability in a mouse model of multiple sclerosis," *NMR in Biomedicine*, vol. 21, no. 6, pp. 589–597, 2008.
- [28] S. K. Song, S. W. Sun, M. J. Ramsbottom, C. Chang, J. Russell, and A. H. Cross, "Dysmyelination revealed through MRI as increased radial (but unchanged axial) diffusion of water," *NeuroImage*, vol. 17, no. 3, pp. 1429–1436, 2002.
- [29] J. D. Matarazzo, *Wechsler's Measurements and Appraisal of Adult Intelligence*, Williams and Wilkins, Oxford, UK, 5th edition, 1972.
- [30] A. Smith, "The symbol-digit modalities test: a neuropsychologic test of learning and other cerebral disorders," in *Learning Disorders*, J. Helmuth, Ed., pp. 83–91, Special Child Publications, Seattle, Wash, USA, 1968.
- [31] R. H. Heaton, *Wisconsin Card Sorting Test (Manual)*, Psychological Assessment Resources, Odessa, Fla, USA, 1981.
- [32] J. Raven, J. C. Raven, and J. H. Court, "Advanced progressive matrices," in *Raven Manual*, Oxford Psychologists Press, Oxford, UK, 4th edition, 1998.
- [33] G. Kuslansky, M. Katz, J. Verghese et al., "Detecting dementia with the Hopkins verbal learning test and the mini-mental state examination," *Archives of Clinical Neuropsychology*, vol. 19, no. 1, pp. 89–104, 2004.
- [34] P. Caffarra, G. Vezzadini, F. Dieci, F. Zonato, and A. Venneri, "Rey-Osterrieth complex figure: normative values in an Italian population sample," *Neurological Sciences*, vol. 22, no. 6, pp. 443–447, 2002.
- [35] R. H. B. Benedict, L. Groninger, D. Schretlen, M. Dobraski, and B. Shpritz, "Revision of the brief visuospatial memory test: studies of normal performance, reliability, and validity," *Psychological Assessment*, vol. 8, no. 2, pp. 145–153, 1996.
- [36] E. Strauss, E. M. S. Sherman, and O. Spreen, *A Compendium of Neuropsychological Tests: Administration, Norms and Commentary*, Oxford University Press, New York, NY, USA, 3rd edition, 2006.
- [37] J. G. Greenfield and L. S. King, "Observations on the histopathology of the cerebral lesions in disseminated sclerosis," *Brain*, vol. 59, no. 4, pp. 445–458, 1936.
- [38] G. C. DeLuca, K. Williams, N. Evangelou, G. C. Ebers, and M. M. Esiri, "The contribution of demyelination to axonal loss in multiple sclerosis," *Brain*, vol. 129, no. 6, pp. 1507–1516, 2006.
- [39] B. D. Trapp, J. Peterson, R. M. Ransohoff, R. Rudick, S. Mörk, and L. Bö, "Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis," *The New England Journal of Medicine*, vol. 338, no. 5, pp. 278–285, 1998.
- [40] R. A. Dineen, J. Vilisaar, J. Hlinka et al., "Disconnection as a mechanism for cognitive dysfunction in multiple sclerosis," *Brain*, vol. 132, no. 1, pp. 239–249, 2009.
- [41] S. D. Roosendaal, J. J. G. Geurts, H. Vrenken et al., "Regional DTI differences in multiple sclerosis patients," *NeuroImage*, vol. 44, no. 4, pp. 1397–1403, 2009.
- [42] C. Lebel, S. Caverhill-Godkewitsch, and C. Beaulieu, "Age-related regional variations of the corpus callosum identified by diffusion tensor tractography," *NeuroImage*, vol. 52, no. 1, pp. 20–31, 2010.
- [43] E. V. Sullivan, T. Rohlfing, and A. Pfefferbaum, "Longitudinal study of callosal microstructure in the normal adult aging brain using quantitative DTI fiber tracking," *Developmental Neuropsychology*, vol. 35, no. 3, pp. 233–256, 2010.