Fabiana Bianca Hayashi Umezaki

COMPARAÇÃO ENTRE PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA COM BAIXO COMPROMETIMENTO FUNCIONAL E CONTROLES SAUDÁVEIS: análise de imagem por tensor de difusão

Dissertação apresentada à Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

São Paulo
2026

Fabiana Bianca Hayashi Umezaki

COMPARAÇÃO ENTRE PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA COM BAIXO COMPROMETIMENTO FUNCIONAL E CONTROLES SAUDÁVEIS: análise de imagem por tensor de difusão

Dissertação apresentada à Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Harumi Kozasa

São Paulo

2026

Umezaki, Fabiana Bianca Hayashi
Comparação entre pacientes com esclerose múltipla com baixo comprometimento funcional e controles saudáveis : análise de imagem por tensor de difusão / Fabiana Bianca Hayashi Umezaki. -- São Paulo, 2026.
xvi, 84 f.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein. Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Título em inglês: *Comparison between multiple sclerosis patients with low functional impairment and healthy controls: diffusion tensor imaging analysis.*

1. Esclerose múltipla. 2. Imagem por tensor de difusão. 3. Substância branca. 4. Imagem por ressonância magnética.

Elaborada pelo Sistema Einstein Integrado de Bibliotecas

FACULDADE ISRAELITA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE ALBERT EINSTEIN

Coordenador do curso de pós-graduação: Prof. Dr. Luciano César Pontes de Azevedo

Fabiana Bianca Hayashi Umezaki

COMPARAÇÃO ENTRE PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA COM BAIXO COMPROMETIMENTO FUNCIONAL E CONTROLES SAUDÁVEIS: análise de imagem por tensor de difusão

Presidente da banca: Profa. Dra. Elisa Harumi Kozasa

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:
Prof. Dr. Lionel Fernel Gamarra Contreras
Profa. Dra. Joselisa Péres Queiroz de Paiva
Prof. Dr. João Ricardo Sato

Membros suplentes:
Profa. Dra. Ana Paula Port Lourenço
Dr. Danilo Donizete de Faria

Aprovada em: 23/01/2026.

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família, que é o meu chão e meu céu, o início e o destino de cada passo que dou.

Aos meus pais, Paulo e Zilda, que me ensinaram que a verdadeira medida de uma vida está na felicidade e no amor que colocamos em tudo o que fazemos. À minha irmã, Gabriela, que com suas risadas me lembra que a leveza é a essência da alma. E ao Gabriel, que é minha força na dúvida, meu impulso na queda, minha calmaria na tempestade e minha alegria nas conquistas.

Esta conquista é de vocês tanto quanto minha.

Agradecimentos

Ninguém trilha um caminho sozinho. A cada pessoa que cruza nossa jornada, somos convidados a enxergar o mundo por novos ângulos. Cada encontro nos ensina algo, e é no compartilhar de saberes, de gestos e de histórias que nos tornamos quem somos.

A construção do conhecimento, assim como a vida, é feita de encontros. E cada pessoa que caminhou ao meu lado, em algum momento, foi um degrau que me impulsionou a seguir, crescer e evoluir. Por isso, este trabalho é também resultado da generosidade e da presença de cada uma delas.

Primeiramente, agradeço à minha família, meu maior alicerce. Aos meus pais, Paulo e Zilda, que são, sem exagero, os melhores pais que eu poderia desejar. Não existem palavras que expressem plenamente o amor e o orgulho que sinto por ser filha de vocês. Vocês sempre me apoiaram incondicionalmente, mesmo quando minhas decisões pareciam impulsivas ou distantes do caminho mais seguro. Em cada escolha, em cada mudança de rumo, vocês nunca hesitaram em dizer que o que realmente importa é ser feliz e fazer tudo com amor. Levo esse ensinamento comigo, todos os dias. Obrigada por me mostrarem, com o exemplo, o que é amor, coragem e generosidade. À minha irmã, Gabriela, por ser minha parceira de vida e por todos os momentos que só nós duas entendemos. Obrigada por me lembrar, sempre, que a risada é o melhor remédio para ser feliz. Cada conversa, cada piada interna, cada gargalhada dividida contigo tornou esse caminho mais leve e mais bonito.

Ao meu companheiro, Gabriel, por ser presença constante em cada passo dessa jornada. Por me acalmar na loucura e vibrar na conquista. Por sempre acreditar em mim, mesmo quando eu mesma duvidava. Obrigada por torcer e caminhar ao meu lado, celebrando cada degrau conquistado.

À Dra. Elisa Harumi Kozasa, minha orientadora, pela confiança e generosidade em ter me aceitado como orientanda. Por sempre trazer pontos de melhoria que me fizeram crescer, tanto como pessoa, quanto como cientista, e por ser uma orientadora presente, que apoia e incentiva com sabedoria e cuidado. Ser orientada por você é um privilégio. Pela experiência, claro, mas principalmente pela maneira como conduz a vida e o trabalho com leveza, presença e sabedoria. Sua postura inspira quem caminha ao seu lado.

Ao Me. Artur José Marques Paulo, por toda a paciência e generosidade ao compartilhar seu conhecimento. Desde o início, foi quem me guiou nos primeiros passos. Esteve sempre disponível, me acompanhando com paciência e tornando possível cada etapa desta jornada técnica. Sem o seu apoio, nada disso teria sido viável. Sou imensamente grata por todo o aprendizado e pela segurança que encontrei em cada orientação ao longo do caminho.

Ao Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, em nome do Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo, diretor-superintendente, e pelo Dr. Luciano César Pontes de Azevedo, Coordenador da Pós-Graduação Stricto Sensu, pelo apoio à pesquisa científica e suporte fundamental ao desenvolvimento deste estudo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil. Processo nº 2016/13104-7. Contou ainda com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, processo nº 88887.950790/2024-00. À Bayer, pelo fornecimento do gadolínio utilizado nas ressonâncias magnéticas dos pacientes com esclerose múltipla, e à AME (Amigos Múltiplos da Esclerose) e à ABEM (Associação Brasileira de Esclerose Múltipla), pela colaboração na divulgação do recrutamento dos participantes.

Agradeço aos neurologistas Dra. Patrícia Aguiar, Dr. Tiago Sowmy e Dr. Rodrigo Thomaz, e aos neurorradiologistas Dr. Edson Amaro Jr. e Dra. Renata Bertanha pela participação na concepção do projeto e apoio no recrutamento dos pacientes.

À equipe administrativa da Pós-Graduação Acadêmica Stricto Sensu – Michele Alves Evangelista, Sandra Almeida Miranda e Camila Djanira Silva Campos, pelo trabalho incansável que torna a pós-graduação possível. Vocês fazem tudo acontecer, com eficiência, acolhimento e um sorriso no rosto.

Por fim, sou grata a todos os pacientes e voluntários que participaram deste estudo. Sem a confiança de vocês, este trabalho não teria sido possível.

“E aqueles que foram vistos dançando foram julgados insanos por aqueles que não podiam ouvir a música.”

(Friedrich Nietzsche)

Sumário

Dedicatória v
Agradecimentos vi
Lista de figuras xi
Lista de tabelas xii
Lista de abreviaturas xiii
Resumo xvi
1 INTRODUÇÃO 1
1.2 Objetivos 6
2 REVISÃO DA LITERATURA 7
2.1 Esclerose múltipla 7
2.1.1 *Expanded Disability Status Scale* 9
2.1.2 Paradoxo clínico-radiológico 10
2.2 Ressonância magnética 11
2.2.1 Imagem ponderada por difusão 11
2.2.2 Imagem por tensor de difusão 12
2.3 Estudos de difusão em esclerose múltipla 20
2.4 *VolBrain*: *DeepLesionBrain* 23
3 MÉTODOS 26
3.1 Aspectos éticos 26
3.2 Participantes 26
3.3 Desenho experimental 27
3.3.1 Protocolo de aquisição de imagens 30
3.3.2 Segmentação automática das lesões 30
3.3.3 Processamento das sequências de imagem por tensor de difusão 32
3.3.4 Análise por região de interesse 36
3.3.5 Tractografia 36
3.4 Análise estatística 39
3.4.1 Análise estatística baseada em tratos 39
3.4.2 Análises de região de interesse e de correlação 42
3.4.3 Tractografia 43
4 RESULTADOS 45

4.1 Características demográficas e clínicas dos participantes 45
4.2 Máscara de lesão 46
4.2.1 Caracterização espacial das lesões 47
4.3 Pré-processamento: extração de cérebro.....47
4.4 *Tract-based spatial statistics*.....47
4.4.1 Ilustração do *pipeline*.....47
4.4.2 Resultados da análise espacial de tratos 49
4.4.3 Análise complementar: distribuição dos valores 57
4.5 Análise por região de interesse e correlação.....57
4.6 Tractografia.....58
4.6.1 ANOVA 59
4.6.2 *Post hoc*: abordagem dentro de grupo 60
4.6.3 *Post hoc*: grupo dentro da abordagem 61
5 DISCUSSÃO 62
5.1 Métricas do tensor por difusão 62
5.2 Coroa radiata.....63
5.3 Radiação talâmica posterior 65
5.4 Corpo caloso e tapetum.....66
5.5 Análise de correlação entre incapacidade clínica e métricas de difusão 67
5.6 Tractografia.....68
5.7 Adaptações no *script* e manejo de lesões 71
5.8 Limitações 73
6 CONCLUSÕES 74
7 REFERÊNCIAS 75
Abstract
Apêndices

Lista de figuras

Figura 1. Representação esquemática do DTI 13
Figura 2. Representação esquemática do tensor de difusão e das principais métricas derivadas do DTI 14
Figura 3. Comparação entre tractografia streamline determinística e probabilística 17
Figura 4. Desenho do estudo.....29
Figura 5. Exemplo das máscaras utilizadas no pipeline de TBSS com exclusão de lesões em um sujeito 48
Figura 6. Mapa estatístico das regiões com redução significativa de anisotropia fracionada em pacientes com esclerose em comparação aos controles saudáveis sem mascaramento de lesão 51
Figura 7. Mapa estatístico das regiões com redução significativa de FA em pacientes com EM em comparação aos controles saudáveis com mascaramento de lesão.....53
Figura 8. Mapa estatístico da região com aumento significativo de RD em pacientes com EM em comparação aos controles saudáveis sem mascaramento de lesão 54
Figura 9. Mapa estatístico da região com aumento significativo de RD em pacientes com EM em comparação aos controles saudáveis sem mascaramento de lesão 56
Figura 10. Regiões de interesse projetadas no espaço MNI 57
Figura 11. Reconstrução probabilística do trato corticoespinhal em um controle representativo da amostra nas três abordagens de tractografia.....59

Lista de tabelas

Tabela 1. Revisão dos estudos de imagem por tensor de difusão em pacientes com esclerose múltipla 4
Tabela 2. Descrição da amostra após pareamento entre grupos 46
Tabela 3. Regiões com redução significativa de anisotropia fracionada em pacientes com esclerose múltipla na abordagem *voxelwise* sem mascaramento de lesão 50
Tabela 4. Regiões com redução significativa de anisotropia fracionada em pacientes com esclerose múltipla na abordagem *voxelwise* com mascaramento de lesão 52
Tabela 5. Regiões com aumento significativa de difusividade radial em pacientes com esclerose múltipla na abordagem *voxelwise* sem mascaramento de lesão 54
Tabela 6. Regiões com aumento significativa de difusividade radial em pacientes com esclerose múltipla na abordagem *voxelwise* com mascaramento de lesão 55
Tabela 7. Valores-p da ANOVA (modelo misto) para efeitos de grupo, abordagem e grupo versus abordagem para cada métrica de difusão no trato córtico espinal 60
Tabela 8. Comparações entre abordagens (A1, A2 e A3) dentro de cada grupo (EM e Controles) para o trato corticoespinhal 60
Tabela 9. Comparação entre grupos (Controle *versus* EM) em cada abordagem de tractografia (A1, A2 e A3) para o trato corticoespinhal 61

Lista de abreviaturas

ABEM	Associação Brasileira de Esclerose Múltipla
ACR	Coroa radiata anterior (*Anterior corona radiata*)
AD	Difusividade axial (*Axial diffusivity*)
AME	Associação de Amigos dos Portadores de Esclerose Múltipla
AP	Anteroposterior
BEDPOSTX	*Bayesian estimation of diffusion parameters obtained using samplingtTechniques*
BET	Ferramenta de extração cerebral *(Brain extraction tool)*
BVEC	Tabela de direções dos vetores de gradiente (*Gradient vector direction table*)
CIS	Síndrome clinicamente isolada *(Clinically isolated syndrome)*
COG	Centro de gravidade
CSD	*Constrained spherical deconvolution*
DICOM	*Digital imaging and communications in medicine*
DMN	Rede neural de modo padrão (*Default mode network*)
DTI	Imagem por tensor de difusão (*Diffusion tensor imaging*)
DWI	Imagem ponderada em difusão (*Diffusion-weighted imaging*)
EDSS	Escala Expandida do Estado de Incapacidade (*Expanded Disability Status Scale*)
EM	Esclerose múltipla
emmeans	*Estimated marginal means*
EM-PP	Esclerose múltipla primariamente progressiva
EM-RR	Esclerose múltipla remitente-recorrente
EM-SP	Esclerose múltipla secundária progressiva
EPI	*Echo-planar imaging*
FA	Anisotropia fracionada (*Fractional anisotropy*)
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FDR	*False discovery rate*
FDT	*FMRIB's diffusion toolbox*
FLAIR	Sequência de ressonância magnética com supressão de líquor (*Fluit-Attenuated Inversion Recovery*)

FLIRT	Ferramenta de registro linear de imagens do FMRIB (*FMRIB linear image registration tool*)
fMRI	Ressonância magnética funcional (*Functional magnetic ressonance imaging*)
FNIRT	Ferramenta de registro não linear de imagens do FMRIB (*FMRIB's nonlinear image registration tool*)
FOV	Campo de visão (*Field of view*)
FSL	Biblioteca de software do FMRIB (*FMRIB software library*)
FSS	Escala de severidade da fadiga (*Fatigue severity scale*)
FWE	*Family-Wise Error Rate*
GRAPPA	Método de aceleração por aquisição paralela (*GeneRalized autocalibrating partial parallel acquisition*)
GRE	Eco reforçado por gradiente (*Gradient recalled echo*)
HARDI	*High angular resolution diffusion imaging*
ISBI Challenge	*Longitudinal MS Lesion Segmentation Challenge*
LMM	Modelos lineares mistos (*Linear mixed models*)
MAX	Coordenadas máximas
MD	Difusividade média (*Mean diffusivity*)
MFIS	Escala modificada do impacto da fadiga (*Modified fatigue impact scale*)
MNI	*Template* cerebral desenvolvido pela *Montreal Neurological Institute*
MSIF	Federação Internacional de Esclerose Múltipla (*Multiple Sclerosis International Federation*)
MSSEG'16	*Multiple Sclerosis Lesion Segmentation Challenge 2016*
MT	*Magnetization transfer*
NAWM	Substância branca de aparência normal (*Normal-appearence white matter*)
NfL	Neurofilamento de cadeia leve
NIfTI	*Neuroimaging informatics technology initiative*
NODDI	Imagem de dispersão e densidade de orientação de neuritos (*Neurite orientation dispersion and density imaging*)
PA	Posteroanterior
PCR	Coroa radiata posterior (*Posterior corona radiata*)
PIRA	Progressão independente da atividade inflamatória (*Progression independent of relapsing activity*)

PROBTRACKX2	*Probabilistic tracking with crossing fibres*
RD	Difusividade radial (*Radial diffusivity*)
RM	Ressonância magnética
RNFL	Camada de fibras nervosas da retina (*Retinal nerve fiber layer*)
ROI	Região de interesse
SMT	*Spherical mean technique*
SNC	Sistema nervoso central
T1	Tempo de relaxação longitudinal
T2	Tempo de relaxação transversal
TA	Tempo de aquisição
TBSS	Estatística espacial baseada em tratos (*Tract-based spatial statistics*)
TCE	Trato corticoespinhal
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Tempo de eco
TFCE	*Threshold-Free Cluster Enhancement*
TI	Tempo de inversão
PET	Tomografia por emissão de pósitrons (*Positron emission tomography*)
TR	Tempo de repetição
XTRACT	*Cross-species tractography*

Resumo

Introdução: A esclerose múltipla é uma doença neurológica crônica e imunomediada do sistema nervoso central, caracterizada por desmielinização, inflamação e dano axonal. Sustentada por episódios inflamatórios agudos que contribuem para formas insidiosas de neurodegeneração, responsáveis pela progressão silenciosa ao longo da vida. A ressonância magnética convencional detecta apenas parte das alterações estruturais, enquanto a imagem por tensor de difusão permite investigar mudanças microestruturais mais sutis. **Objetivos:** Comparar métricas de imagem por tensor de difusão entre pacientes com esclerose múltipla com capacidade de deambular sem apoios e controles saudáveis. **Métodos:** Estudo transversal com 20 pacientes com esclerose múltipla e 20 controles pareados por idade, sexo e escolaridade. Lesões foram segmentadas automaticamente. As análises incluíram análise exploratória de cérebro inteiro por meio da Estatística Espacial Baseada em Tratos com e sem mascaramento de lesão, estatísticas de correlação em regiões de interesse e tractografia probabilística em três condições: reconstrução padrão, exclusão de lesões reais e mascaramento virtual de lesões. **Resultados:** A primeira análise revelou redução de anisotropia fracionada e aumento de difusividade radial nos pacientes principalmente na coroa radiata anterior, radiação talâmica posterior, genu do corpo caloso e tapetum. Sem diferenças robustas nas demais métricas. Na segunda análise, não houve diferenças significativas entre a escala expandida de incapacidade e as métricas de difusão. Na tractografia probabilística do trato corticoespinhal, houve efeito de abordagem e interação entre os grupos. **Conclusão:** Os achados demonstram que, mesmo em indivíduos com baixa incapacidade clínica, é possível identificar alterações microestruturais na substância branca por meio de imagem por tensor de difusão, mesmo em regiões de substância branca de aparência normal. A análise de tractografia mostra que a presença de lesões pode influenciar a reconstrução dos tratos, destacando a importância metodológica das estratégias de mascaramento nas análises.

Descritores: Esclerose múltipla; Imagem de tensor de difusão; Substância branca; Imagem por ressonância magnética

1 INTRODUÇÃO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença neurológica crônica e imunomediada do sistema nervoso central (SNC), caracterizada por desmielinização, inflamação e dano axonal, sendo este último reconhecido como um dos principais determinantes da incapacidade neurológica permanente.[1,2] Atualmente, a doença é compreendida como um processo complexo, no qual mecanismos inflamatórios e neurodegenerativos coexistem desde fases precoces e contribuem para a progressão clínica ao longo do tempo.[3] Além de sua relevância biológica, a EM representa importante causa de incapacidade neurológica não traumática em adultos jovens, com impacto expressivo em termos individuais e sociais.[4,5]

A evolução clínica da EM é heterogênea, mas entre suas manifestações de maior repercussão funcional destacam-se os déficits motores, o comprometimento da marcha e do equilíbrio.[3,6-9] Essas alterações não decorrem apenas de surtos clínicos agudos, mas também de processos progressivos de perda axonal e disfunção de redes neurais, com impacto direto sobre a autonomia, o risco de quedas e a qualidade de vida.[7-9] Nesse contexto, torna-se particularmente relevante investigar a EM em fases iniciais, quando alterações estruturais e funcionais potencialmente associadas à progressão da doença podem ainda ser mais discretas e menos evidentes clinicamente.

Entre as principais ferramentas utilizadas para avaliar a gravidade e a progressão funcional da EM, destaca-se a *Expanded Disability Status Scale* (EDSS) – traduzida para o português como Escala Expandida do Estado de Incapacidade –, amplamente empregada tanto na prática clínica quanto em pesquisa.[10,11] Embora apresente limitações, especialmente pelo peso crescente atribuído à marcha a partir dos escores mais altos, a escala é particularmente informativa nos níveis mais baixos, nos quais ainda reflete alterações em múltiplos sistemas funcionais.[12] Essa discussão é relevante porque o conceito de “EM inicial” não é uniforme na literatura — podendo se basear em critérios clínicos, histopatológicos e até moleculares.[13-15] Em estudos de neuroimagem, esse estágio costuma ser definido pelo tempo desde o início dos sintomas ou do diagnóstico; no entanto, esse critério temporal não necessariamente reflete a gravidade biológica da doença, uma vez que indivíduos com duração semelhante podem apresentar níveis bastante distintos de incapacidade.[13-16] Nesse sentido, a adoção de

um critério funcional pode representar uma alternativa metodologicamente mais homogênea para investigar alterações microestruturais em fases de menor comprometimento clínico.

Nesse cenário, a ressonância magnética (RM) ocupa papel central na avaliação da EM, contribuindo de forma decisiva para o diagnóstico e para o monitoramento da doença.[1,3,7] No entanto, mesmo em fases iniciais, observa-se o chamado paradoxo clínico-radiológico, no qual a carga de lesões visíveis nas sequências convencionais de RM, como T2 e FLAIR, não se traduz necessariamente em maior gravidade clínica.[17] Assim, embora as sequências ponderadas em T2 permitam a detecção de lesões hiperintensas, que refletem desmielinização focal e perda axonal em extensão variável,[18-20] esse achado reforçam que as alterações detectáveis pela RM convencional representam apenas parte do processo fisiopatológico da EM e que componentes relevantes do dano tecidual podem ocorrer para além das lesões focais visíveis.[21,22]

Nesse contexto, a imagem por tensor de difusão (DTI - *diffusion tensor imaging*) surge como uma ferramenta particularmente relevante por permitir a investigação indireta da microestrutura da substância branca. Diferentemente das sequências anatômicas convencionais, essa abordagem é sensível a alterações mais sutis na organização tecidual, inclusive em regiões de substância branca de aparência normal (NAWM – *normal-appearence white matter*) — regiões que aparentam estar normais nos exames convencionais de imagem como T2 e FLAIR, mas que já possuem alterações microestruturais—, que podem contribuir para a dissociação entre achados radiológicos e manifestação clínica.[17,23]

Embora estudos prévios tenham investigado alterações microestruturais por DTI em fases iniciais da EM, esses estudos utilizam o tempo desde o início dos sintomas ou do diagnóstico como principal critério de inclusão, o que pode resultar em amostras clinicamente heterogêneas, com ampla variação de incapacidade.[21,24-26] Como ainda são escassos os estudos que adotam baixa incapacidade clínica como critério de inclusão *a priori*, foram considerados, como aproximação do problema investigado neste trabalho, estudos em EM precoce baseada em tempo de doença. Esses trabalhos, bem como seus principais aspectos técnicos — incluindo amostra, aquisição, processamento estatístico e manejo de lesões — estão sistematizados na tabela 1. De modo geral, observa-se que, mesmo quando as amostras apresentam baixa incapacidade média, essa característica frequentemente decorre da

composição da coorte, e não de uma definição funcional previamente estabelecida, podendo resultar em grupos clinicamente heterogêneos, com ampla variação de EDSS, o que poderia mascarar alterações microestruturais sutis. Além disso, persiste falta de padronização quanto ao manejo das lesões nas análises de difusão, com estratégias que variam desde sua simples quantificação até exclusões parciais, nem sempre individualizadas.[21,24-26] Em conjunto, esses aspectos evidenciam uma lacuna metodológica importante: a necessidade de estudos que combinem seleção clínica previamente definida por funcionalidade e o controle individual do impacto das lesões sobre as métricas de difusão.

Com o intuito de abordar essa lacuna, o presente estudo tem como foco comparar as métricas do DTI em tratos supostamente envolvidos na patogênese da EM, entre indivíduos com essa condição e controles saudáveis com idade, sexo e escolaridade comparáveis aos dos pacientes, com (i) análise exploratória e robusta de cérebro inteiro usando a análise espacial baseada em tratos (TBSS - *tract-based spatial statistics*); e (ii) análises de região de interesse baseadas em atlas de tratos escolhidos com base em resultados de estudos anteriores. Nossa hipótese é que, por meio do DTI, será possível identificar alterações microestruturais na substância branca em pacientes com EM com comprometimento clínico leve, quando comparados a controles saudáveis.

Tabela 1. Revisão dos estudos de imagem por tensor de difusão em pacientes com esclerose múltipla

Estudo	N (EM/ Controle)	Características demográficas	Aquisição	Processamento e estatística	Manejo de lesões	Resultados (pacientes)
Schneider et al., 2019[24]	BL: 106 (CIS=51; RRMS=55) / 49 FU1: 83; FU2: 43; Desenho: FU (BL, 1º ano, 2º ano).	Idade: 37 ± 11 / 42 ± 14, Sexo (F, P/C): 68/32; Fenótipo da doença: CIS e RRMS; Duração da doença (meses desde início do sintoma): total 12 ± 10 (CIS 10 ± 10, RRMS 14 ± 11); EDSS: BL 1,5 mediana [0,0-5,0) (CIS: 1,5 [0,0-4,0); RRMS: 1,5 [0,0=6,5); FU2: 2,0 mediana (1,0-5,0); Carga lesional (FLAIR, mL): BL 2,1 mediana (IQR 0,9-5,3).	Scanner: 3T (Philips Achieva); DTI EPI *single-shot* 2D (50 slices); 2,5 mm; FOV 320x320; resolução 2,5 x 2,5 mm²; TR/TE 7000/90; flip 90º; 32 direções; b-value máx. 900 (s/mm²). Outras sequências: 3D FLAIR 1 mm e T1 3D 1 mm.	Software principal: FSL (TBSS v1.2) com correções padrão; Modelo: DTI com FSL-DTI; Método de análise: TBSS *voxelwise* (FA/AD/MD/RD) e média global no esqueleto via *fslstats*. Estatística: *randomise* (5.000 permutações) + TFCE, p < 0,01; Longitudinal: *randomise* para *repeated measures* com comparações pareadas (BL *versus* FU1; FU1 *versus* FU2); Correlação EDSS (Spearman, Bonferroni para 30 regiões, p < 0,002)	Lesões segmentadas em FLAIR para volume e mapas de distribuição via LST (SPM12 + CAT12/DARTEL); criaram mapas médios de lesão em MNI e avaliaram sobreposição com o esqueleto/alterações; Lesões não foram excluídas do TBSS; estimam o efeito pela pequena sobreposição e discutem como limitação.	BL: redução FA difusa (supra + infratentorial); aumento AD (CC e tratos piramidais), mas não em FU1/FU2 (possível por menor poder). Longitudinal: Sem mudança significativa BL→FU1; FU1→FU2: diminuição FA e aumento RD (CC, CR, IC e EC). Aumento do RD de forma progressiva, em FU1 mais restrito ao CC e CR, em FU2 mais difuso. Correlação com EDSS: FA (BL) em pedúnculos cerebrais/cerebelo se associa a EDSS no ano 2. Lesões *versus* "difuso": sobreposição lesão–esqueleto/alterações pequena (CC, PTR, CR, SS).
Asaf et al., 2015[25]	90/25; Desenho: retrospectivo, transversal	Idade (P/C): 37,6 ± 1,0 / 35,1 ± 2,2; Sexo (F, P/C): 66/14; Fenótipo da doença: RRMS; Duração doença (meses desde início dos sintomas): todos 4,2 ± 0,2; curta (<1 ano) 0,5 ± 0,1; moderada (1-6 anos) 4,5 ± 0,1; longa (6-10 anos) 8,7 ± 0,3; EDSS: total 2,0 ± 0,1 [0,0-6,5); curta 1,6 ± 0,3 [0,0-5,5); moderada 1,9 ± 0,2 [0,0-6,5); longa 2,7 ± 0,4 (1,0-6,5)	Scanner: 3T (GE Signa), bobina 8 canais; *single-shot EPI*; 31 direções; *b-value* = 1000 (s/mm²) e 2 b0; TR/RE 14000/76 ms; FOV 256x256, matriz 128x128; fatias 2,6 mm.	Software principal: FSL seguindo correções padrão; Modelo: DTI (tensor apenas com FA); Método de análise: TBSS *voxelwise* e extração ROI por atlas (ICBM-DTI-81 (48 labels) + JHU ILF). Estatística: *Voxelwise* com *randomise* (5.000 permutações) + TFCE, p < 0,05; correlações clínicas por Spearman.	Não reportaram criação/uso de máscara de lesão.	*Whole-brain* FA: diminuição FA para curta *versus* controles (p < 0,001); diminuição FA para moderada *versus* longa (p < 0,01); curta *versus* moderada sem diferença (p = 0,95) com platô de até ~5 anos; TBSS *voxelwise*: redução difusa de FA curta *versus* controle em 40 tratos (pico ILF E); queda adicional em 30 tratos em longa *versus* moderada (pico corpo do CC). Outros tratos com *voxels* significativos: CC, CR, IC, EC, pedúnculos cerebrais etc.). Clínica: FA correlacionou com duração da doença, mas EDSS não correlacionou.
Oh et al., 2013[21]	124 pacientes, sem controles; Desenho:	Idade (média ± DP): 45,2 ± 11,1; Sexo (F): 79; Fenótipo da doença: RRMS, SPMS, PPMS; Alocaram pacientes por EDSS baixo (<6,0) e alto (≥6,0); EDSS (mediana, *range*): total 3,5 (2,0-6,0), EDSS baixo 2,5 (2,0-3,5), EDSS alto 6,5 (6,0-6,5); Duração doença: total 10,9 ± 9,3; EDSS baixo 8,4 ± 9,0; EDSS alto: 19,4 ± 10.	Scanner: 3T Philips Intera; *coil superfície* 2-elementos; *spin-echo multislice* + *single-shot EPI* (*parallel factor* 2); TR/TE 4727/63 ms; 16 direções; *b-value*: 500 s/mm² e um b0; fatia 3 mm; *in-plane* 1,5 x 1,5 mm². *Magnetization transfer:* 3D GRE T2* com *MT prepulse* + *multishot EPI readout*; Parâmetros: EPI *factor* 3; *parallel fator* 2; TR/TE 121/12,5 ms; fatias axiais contíguas (3 mm), C2-C6; resolução *in-plane* 0,6 x 0,6 mm². Outras aquisições: STIR sagital.	DTI: registro de cada volume DWI ao b0 com FLIRT (rigid, 6 dof) com JIST. Mapas gerdos: FA, MD, λ⊥ (lt), λ‖ (lk). MTR: Registro MT_{on} → MT_{off} com FLIRT (rigid, 6 dof); cálculo: (MT_{on} – MT_{off})/MT_{off}. Estatística: Software Stata v11; teste *t* para comparação entre subgrupos; abordagem exploratória, sem correção para múltiplas comparações; correlações entre índices: Pearson; Modelagem principal: regressão linear multivariável; *Logistic regression* com seleção *stepwise*, desfecho para EDSS alto e baixo (p<0,10).	Contagem de lesões cervicais em C2–C6, feita em axial MT e STIR sagital por avaliador experiente cego para status clínico. BPF a partir de DTI cerebral descrito em trabalhos prévios, para usar como covariável.	EDSS baixo *versus* alto dentro do mesmo nível de lesão: Baixa lesão (≤2 lesões), (EDSS baixo/alto): CSA (mm²): 80,1/67,4 (p<0,001); FA: 0,61/0,57 (p=0,03); MD: 1,25/1,41 (p=0,003); λ⊥: 0,74/0,90 (p=0,003); λ‖: 2,19/2,34 (p=0,02); MTR: 0,31/0,27 (p=0,003). Alta lesão (≥3 lesões), (EDSS baixo/alto): CSA: 78,2/73,5 (p=0,03); FA: 0,63/0,59 (p=0,02); MD: 1,22/1,31 (p=0,02); λ⊥: 0,70/0,81 (p=0,01); λ‖: 2,19/2,24 (p=0,35); MTR: 0,30/0,28 (p=0,17). Após ajuste por idade/sexo: no grupo baixa lesão tudo continua diferente, exceto λ‖; no grupo alta lesão FA, MD e λ⊥ permanecem diferentes. No modelo *stepwise*: ficou MTR + CSA para baixa lesão e FA na alta lesão.

continua...

...continuação

Bao et al., 2022[26]	17/21 Desenho: transversal	Idade (P/C): 42,3 ± 13,2 / 46,7 ± 8,9; Sexo (F, P/C): 11/17; Fenótipo da doença: RRMS.	Scanner: 3T Philips, bobina 16 canais; single-*shot echo EPI* com SENSE; TR/TE 8000/101 ms; 30 direções; *b-value* = 0 e 1000 s/mm². Outras aquisições: FLAIR: TR/TE/IR 6000/140/2000 ms; espessura 7,5 mm; FOV 250 x 250; matriz 256 x 256. T1: 3D IR-T1TFE; *voxel* isotrópico 0,94 mm; TI 1123 ms; *flip angle* 6; SENSE.	Pré-processamento padrão FSL; Modelo: DTI *voxelwise* com DTIFIT no espaço nativo; Extração por atlas (JHU): T1→MNI (não-linear); atlas JHU levado ao espaço do sujeito e DWI via transformações inversas; extração médias das métricas nas ROIs “limpas”. Estatística: teste-*t* independente (paciente *versus* controle) nas ROIs; significância p<0,01 (e p<0,001); correção múltiplas comparações FDR (BH);	Lesões manualmente rotuladas no T1 por 2 radiologistas (10 anos de experiência). Exclusão de lesão via mapa probabilístico do grupo (thr 0,3) subtraído das ROIs do atlas. Detalhamento: Registradas para espaço padrão e combinadas em mapa probabilístico (soma e divide pelo nº de pacientes). Mapa de volta p/ espaço nativo, com *threshold* 0,3 p/ binarizar máscara de exclusão. ROI_final = ROI_JHU − máscara_de_lesão (exclusão de tratos finais <20 *voxels*: PCR e tapetum D).	Analisaram 19 tratos NAWM do JHU, agrupados como frontal, parietal e occipital. Diminuição FA em todo CC; ACR bilateral PTR D; aumento MD ACR e SCR bilateralmente; aumento AD PTR e EC bilateralmente e tapetum E; aumento RD ACR e SCR bilateralmente, genu do CC e PTR direito.

ACR: *anterior corona radiata*; AD: difusividade axial; BH: Benjamini–Hochberg; BL: *baseline*; BPF: *brain parenchymal fraction*; C: controle; CAT12: *computational anatomy toolbox*; CC: corpo caloso; CIS: *clinically isolated syndrome*; CR: corona radiata; CSA: *cross-sectional area*; D: direito; DARTEL: *Diffeomorphic Anatomical Registration Through Exponentiated Lie Algebra*; DP: desvio padrão; DTI: imagem por tensor de difusão; DWI: *diffusion weighted image*; E: esquerdo; EC: capsula externa; EDSS: Escala Expandida de Incapacidade; EM: esclerose múltipla; EPI: *Echo-okannar Imaging*; F: feminino; FA: anisotropia fracionada; FDR: *false discovery rate*; FLAIR: *Fluid-Attenuated Inversion Recovery*; FOV: *field of view*; FSL: *FMRIB Software Library*; FU: *follow-up*; FU1: *first year follow-up*; FU2: *second year follow-up;* GIF: *Geodesic Information Flows*; IC: capsula interna; ICBM-DTI-81: atlas de substância branca do *International Consortium for Brain Mapping*; IQR: *interquartile range*; IR: *invertion time*; JHU: *Johns Hopkins University*; JIST: *Java Image Science Toolkit*; LCR: líquido cefalorraquiaidno; LST: *lesion segmentation toolbox*; MD: difusividade média; MNI: *Montreal Neurological Institute template*; MSFC: *Multiple Sclerosis Functional Composite;* MSMT-CSD: multi-shell multi-tissue constrained spherical deconvolution; MT: *magnetization transfer*; *MTR: magnetization transfer ratio;* NAWM: *normal-appearing whitte matter*; NAGM: *normal-appearing grey matter*; P: paciente; PCR: *posterior corona radiata*; PD: *axial proton density*; PTR: *posterior thalamic radiation*; PPMS: esclerose múltipla primária progressiva; RD: difusividade radial; ROI: região de interesse; RRMS: esclerose múltipla remitente recorrente; SCR: *superior corona radiata*; SENE: *sensitivity encoding*; SPMS: esclerose múltipla secundária progressiva; SPM12: *Statistical Parametric Mapping version 12*; STIR: *Short Tau Inversion Recovery*; SS: *sagittal stratum*; thr: *threshold*; TBSS: *tract-based spatial statistics*; TE: tempo de eco; TFCE: *threshold-free cluster enhancement*; TR: tempo de repetição; T1: imagem ponderada em T1; T1TFE: sequência ponderada em T1 com *Turbo Field Echo*; T2: imagem ponderada em T2; VR: *volume ratio*.

1.2 Objetivos

1.Testar a hipótese de que existem diferenças na microestrutura de tratos na substância branca, avaliados indiretamente por análises de imagem por tensor de difusão, comparando os pacientes com esclerose múltipla, com capacidade para deambular sem apoios, a voluntários saudáveis, por meio da análise de cérebro inteiro através da técnica *Tract-based spatial statistics* com e sem mascaramento de lesão;

2. Avaliar métricas microestruturais em regiões de interesse, incluindo tratos reconstruídos por tractografia probabilística;

3. Investigar a associação entre o comprometimento da doença, avaliado pela *Expanded Disability Status Scale*, e as métricas microestruturais da substância branca obtidas por imagem por tensor de difusão.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Esclerose múltipla

A EM é uma doença neurológica crônica e imunomediada do SNC caracterizada por desmielinização, inflamação e dano axonal.[1] Este último reconhecido como o principal determinante da incapacidade neurológica permanente.[2] Nas últimas décadas, avanços expressivos em imunologia, neurobiologia e genética transformaram a compreensão da doença, que hoje é vista como um processo complexo envolvendo interação entre linfócitos T, células B e glia residente, em especial microglia e astrócitos reativos. Esses mecanismos sustentam episódios inflamatórios agudos e contribuem também para formas insidiosas de neurodegeneração, responsáveis pela progressão silenciosa ao longo da vida.[3]

A EM permanece como uma das principais causas de incapacidade neurológica não traumática em adultos jovens entre 18 e 40 anos, com perfil epidemiológico marcado pela predominância em mulheres (razão 2–3:1).[4,5] Segundo o *Atlas of MS*, publicado pela *Multiple Sclerosis International Federation* (MSIF), estima-se que cerca de 2,8 milhões de pessoas vivam com a doença em todo o mundo, com prevalência média global de 36 casos por 100.000 habitantes; no Brasil, a prevalência é estimada em aproximadamente 19 casos por 100.000 habitantes.[27,28] Embora alguns indivíduos apresentarem pouca deficiência durante sua vida, cerca de 60% dos pacientes evoluem para algum grau de limitação da marcha após 20 anos de doença, refletindo o impacto acumulado da inflamação e da perda axonal no longo prazo.[2]

A evolução clínica da EM é heterogênea e resulta de processos inflamatórios e neurodegenerativos que coexistem desde as fases iniciais da doença. A forma remitente-recorrente (EM-RR) continua sendo o fenótipo inicial mais comum, caracterizado por episódios agudos sobrepostos a uma progressão silenciosa que já pode ocorrer mesmo na ausência de surtos, fenômeno atualmente reconhecido como progressão independente de atividade de surto (PIRA - *progression independent of relapsing activity*).[3,6] Embora a inflamação aguda seja predominante no início, mecanismos crônicos mediados por microglia e glia reativa tornam-se crescentemente relevantes ao longo do curso clínico, contribuindo para perda axonal e atrofia difusa.[7]

Com o tempo, muitos indivíduos apresentam transição para a forma secundária progressiva (EM-SP), marcada por declínio neurológico contínuo, geralmente associado à inflamação e neurodegeneração compartmentalizada no SNC, mesmo com redução de novas lesões inflamatórias pelas terapias modificadoras da doença. Já a forma primariamente progressiva (EM-PP) manifesta-se desde o início com deterioração gradual, refletindo maior predominância de mecanismos neurodegenerativos precoces.[1,7,29]

Entre as manifestações clínicas de maior impacto funcional, destacam-se os déficits motores, o comprometimento da marcha e do equilíbrio, que decorrem não apenas de surtos clínicos, mas também da perda axonal progressiva e da disfunção de redes neurais corticoespinhais. Esses déficits repercutem diretamente na autonomia, aumentam o risco de quedas e reduzem a participação social e a qualidade de vida.[7-9] Nesse contexto, a investigação de vias motoras específicas pode oferecer marcadores mais sensíveis para detectar alterações subclínicas. O trato corticoespinhal (TCE), principal via descendente envolvida no controle motor voluntário, tem sido apontado como uma região particularmente informativa na EM,[30] com estudos descrevendo associações entre métricas de difusão ao longo do TCE e indicadores clínico-funcionais, força muscular e medidas de desempenho motor,[31,32] além de relações com alterações de excitabilidade cortical e parâmetros de marcha, inclusive em indivíduos clinicamente estáveis.[33,34]

Avanços recentes em neuroimagem, imunologia e biologia dos biomarcadores vêm transformando a abordagem diagnóstica da EM. A RM permanece como o método central para demonstrar disseminação no tempo e no espaço, e novas sequências e marcadores estruturais — como a avaliação da atrofia de regiões profundas, do sinal de veia central e do padrão de lesões de borda em expansão — têm contribuído para maior precisão diagnóstica e prognóstica.[1,3,7] Paralelamente, o uso de biomarcadores séricos e do líquor, como as bandas oligoclonais e os níveis de neurofilamento de cadeia leve (NfL), tem se consolidado como elemento complementar na estratificação de risco e no monitoramento da atividade neurodegenerativa.[3,7] Esses avanços motivaram revisões sucessivas dos critérios diagnósticos ao longo das últimas décadas, culminando na recente atualização dos critérios de McDonald em 2024.[35]

A nova revisão mantém a RM como principal ferramenta para demonstrar disseminação no tempo e no espaço — o pilar do diagnóstico — e incorpora ajustes importantes à luz de novos conhecimentos.[35,36] Entre eles, destaca-se a

inclusão do nervo óptico como quinta localização anatômica válida para demonstrar disseminação no espaço, baseada em evidências de que essa via apresenta envolvimento clínico e subclínico frequente nas formas iniciais da doença.[35]

2.1.1 *Expanded Disability Status Scale*

Entre as principais ferramentas para avaliação da gravidade e progressão da EM, destaca-se a EDSS, proposta por Kurtzke em 1983[10], sendo amplamente utilizada como desfecho em ensaios clínicos e para monitoramento da progressão funcional dos pacientes.[11] A EDSS é um escore ordinal e não linear, que varia de 0 (exame neurológico normal) a 10 (óbito relacionado à EM), derivado da avaliação de sistemas funcionais neurológicos (como piramidal, cerebelar, tronco encefálico, sensitivo, visual, esfincteriano e funções cerebrais) e, progressivamente, da capacidade de deambulação.[37]

Embora apresente limitações — especialmente pelo crescente peso atribuído à marcha a partir do escore 4,0 e sua não linearidade em níveis mais altos — a escala é particularmente informativa nos níveis mais baixos, pois reflete alterações em múltiplos sistemas neurológicos.[12] Por não ser linear, incrementos iguais não representam o mesmo “salto clínico” em diferentes faixas do escore. Essa mudança de “peso” ao longo da escala é particularmente relevante na interpretação de escores baixos: até 3,5, a EDSS tende a refletir predominantemente a combinação de déficits em sistemas funcionais em indivíduos ainda plenamente deambuladores; por exemplo, o escore 3,5 descreve um paciente totalmente ambulatório, porém com incapacidade moderada em pelo menos um sistema funcional, frequentemente acompanhada de alterações leves em outros sistemas. Em contraste, o escore 4,0 já representa um marco em que a pontuação passa a incorporar limitação mensurável de marcha, como a capacidade de caminhar aproximadamente 500 metros sem auxílio e sem repouso, reforçando o caráter ambulação-centrado da escala a partir desse ponto.[38] Assim, além de quantificar incapacidade, a EDSS permite ancorar a análise em um critério funcional relativamente padronizado. Essa ancoragem é útil porque, na literatura, o conceito de “EM inicial” não é uniforme e pode variar conforme o critério adotado.

Embora o termo “EM inicial” seja amplamente utilizado na literatura, sua definição varia entre os estudos — podendo se basear em critérios clínicos (como

“EM-RR antes da progressão”) ou em critérios histopatológicos e moleculares.[13-15] Essa falta de uniformidade conceitual dificulta a comparação entre estudos e a interpretação de resultados.

Tradicionalmente, pesquisas em neuroimagem definem EM inicial pelo tempo desde o início dos sintomas ou do diagnóstico. No entanto, esse critério temporal não necessariamente reflete a gravidade biológica da doença, uma vez que processos patológicos como dano axonal, desmielinização e neuroinflamação podem variar substancialmente entre indivíduos com a mesma duração de doença.[13-16] Como consequência, amostras definidas apenas por tempo podem incluir pacientes com ampla variação de incapacidade, e estudos já relataram escores de EDSS chegando a 6,5 mesmo em casos com curta duração da doença.[24,25] Embora alguns trabalhos tenham alcançado maior uniformidade clínica, tal uniformidade parece decorrer de características próprias das populações analisadas, e não de critérios metodológicos previamente estabelecidos.[39-41]

Diante dessa inconsistência conceitual este projeto propõe investigar uma alternativa baseada não no tempo de doença, mas no estado funcional do paciente. Destacando-se que esta escolha não tem o propósito de substituir definições tradicionais de EM inicial, mas de avaliar se uma amostra mais homogênea do ponto de vista funcional poderia revelar padrões de alteração microestrutural que permaneceriam ocultos em análises baseadas apenas no tempo de doença.

2.1.2 Paradoxo clínico-radiológico

Como mencionado, a RM tem desempenhado um papel fundamental na caracterização da EM, contribuindo não apenas para o diagnóstico, mas também para o monitoramento da progressão da doença e compreensão de seus mecanismos subjacentes.[1,3,7] Contudo, mesmo em fases iniciais, ocorre um fenômeno conhecido como paradoxo clínico-radiológico, no qual a carga de lesões visíveis à RM convencional (por exemplo, T2 e FLAIR) não se traduz necessariamente em maior gravidade clínica.[17] Uma revisão sistemática com meta-análise conduzida por Mollison *et al.*[22] identificou correlação apenas moderada entre volume de lesões em substância branca e desempenho cognitivo na EM, sugerindo que a carga lesional visível não explica integralmente a variabilidade clínica. Esse fenômeno também pode ser observado para

além do encéfalo, Oh *et al.*[21] estratificaram pacientes por contagem de lesões medulares e nível de incapacidade e mostraram que medidas quantitativas — incluindo métricas de difusão — discriminam melhor subgrupos com cargas lesionais semelhantes, reforçando a limitação da RM convencional em explicar, isoladamente, a variabilidade clínica. Esses achados reforçam um aspecto já descrito na literatura: as lesões visíveis nas sequências convencionais de RM representam apenas parte do processo fisiopatológico da EM, e alterações relevantes podem ocorrer em áreas aparentemente normais.[42] Em conjunto, esses achados sustentam a motivação do presente estudo: investigar alterações microestruturais em pacientes estratificados por baixa incapacidade funcional, através de técnicas mais sensíveis à microestrutura da substância branca.

2.2 Ressonância magnética

A RM baseia-se principalmente na detecção do sinal dos núcleos de hidrogênio presentes na água dos tecidos. Como o encéfalo é rico em água, o sinal obtido na RM reflete o comportamento desses prótons em diferentes ambientes teciduais. Quando o indivíduo é colocado em um campo magnético forte, parte desses núcleos tende a se alinhar ao campo, gerando uma magnetização líquida detectável. Em seguida, um pulso de radiofrequência altera temporariamente esse estado e, quando o pulso é interrompido, os prótons retornam gradualmente ao equilíbrio, produzindo o sinal captado pelo equipamento. As diferenças entre os tecidos quanto à densidade de prótons e às propriedades de relaxação são responsáveis pelo contraste das imagens anatômicas mais convencionais de RM, como as sequências ponderadas em T1 e T2.[43-45]

2.2.1 Imagem ponderada por difusão

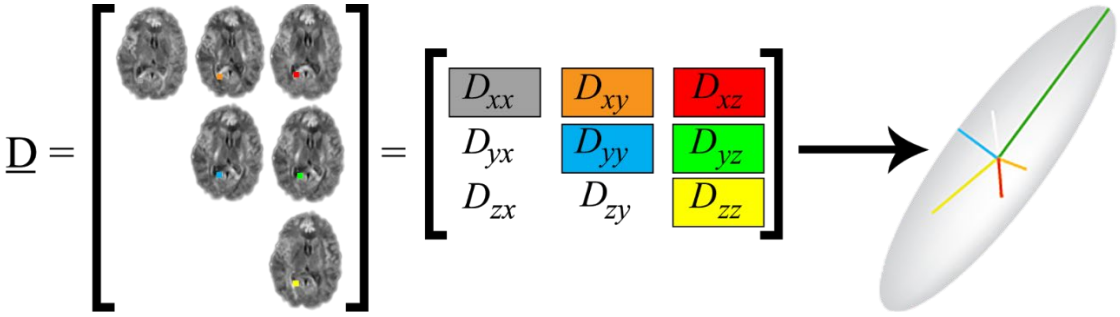
Embora as sequências ponderadas em T1 e T2 sejam fundamentais para a avaliação morfológica do encéfalo, elas fornecem principalmente contraste anatômico, com boa diferenciação entre substância cinzenta, substância branca e líquor. A imagem ponderada em difusão (DWI - *diffusion-weighted imaging*) parte do mesmo princípio geral da RM, mas acrescenta gradientes que tornam o sinal sensível ao deslocamento das moléculas de água. Na DWI, pares de gradientes são aplicados de

modo a tornar o sinal sensível ao deslocamento das moléculas de água. Se as moléculas permanecem aproximadamente na mesma posição entre a aplicação desses gradientes, o efeito introduzido pelo primeiro gradiente é, em grande parte, compensado pelo segundo. No entanto, quando há deslocamento molecular nesse intervalo, essa compensação se torna incompleta, levando à perda de sincronização entre os *spins* e, consequentemente, à redução do sinal. Assim, a imagem deixa de refletir apenas diferenças de relaxação e passa a incorporar informação sobre a mobilidade da água no tecido, permitindo inferir, de forma indireta, aspectos da microestrutura cerebral. Essa sensibilidade é particularmente relevante na substância branca, onde a organização dos feixes axonais e outras barreiras teciduais influenciam o movimento da água. Em meios nos quais o deslocamento é mais livre, a atenuação do sinal tende a ser maior; em ambientes onde o movimento é restringido ou dificultado por membranas, organelas, mielina e outras barreiras microestruturais, esse comportamento se modifica. Dessa forma, a DWI permite inferir indiretamente características da organização tecidual que não podem ser observadas apenas pelas sequências anatômicas convencionais. Quando essa avaliação da difusão é realizada em múltiplas direções, torna-se possível caracterizar a direção preferencial desse movimento, o que constitui a base do DTI.[46-50]

2.2.2 Imagem por tensor de difusão

O DTI pode ser entendida como uma extensão da DWI, na qual a difusão da água é medida em múltiplas direções. Enquanto a DWI convencional permite avaliar a atenuação do sinal relacionada à mobilidade da água, o DTI procura descrever também como essa difusão varia conforme a direção analisada. Para isso, os dados obtidos são ajustados a um tensor de difusão, representado matematicamente por uma matriz simétrica 3×3 (Figura 1). Como essa matriz é simétrica, ela possui seis elementos independentes, que descrevem a difusão tridimensional da água dentro de cada *voxel*. A partir da diagonalização dessa matriz, isto é, da decomposição desse tensor obtêm-se três autovalores e três autovetores: os autovalores expressam a magnitude da difusão ao longo de três eixos ortogonais, enquanto os autovetores indicam a orientação desses eixos no espaço. De forma gráfica, essa informação pode ser representada por um elipsoide de difusão, cuja forma e orientação refletem o padrão local de difusão da água. Em regiões onde a difusão ocorre de maneira semelhante em todas as direções, o

elipsoide tende a ser mais esférico; já em regiões com difusão direcionalmente preferencial, como muitos feixes de substância branca, ele assume uma forma mais alongada, caracterizando uma difusão mais anisotrópica. A partir dessa modelagem, podem ser derivadas métricas quantitativas que descrevem diferentes aspectos do padrão de difusão tecidual.[47-52]



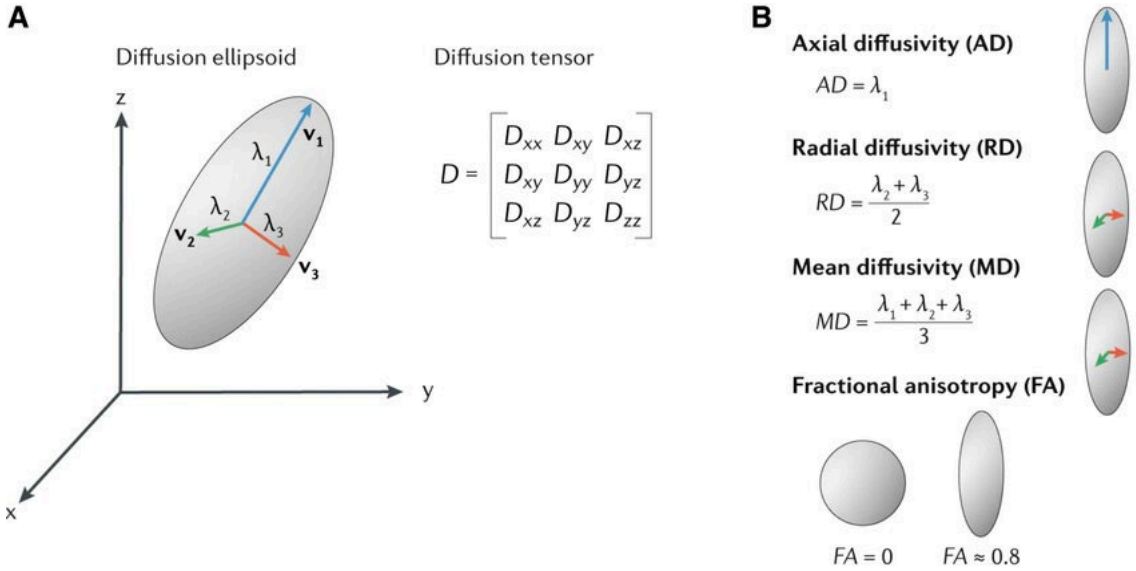
Medidas de difusão adquiridas em múltiplas direções permitem estimar, em cada *voxel*, um tensor de difusão expresso por uma matriz simétrica 3×3 com seis elementos independentes. A diagonalização dessa matriz fornece três autovalores e três autovetores, que podem ser representados graficamente por um elipsoide de difusão.
Fonte: Tromp D. The diffusion tensor, and its relation to FA, MD, AD and RD. In: Diffusion-Imaging [discussion forum]. [s.l]: Diffusion-Imaging; 2015 Oct 8. [cited 2025 Dec 15]. [1 screen].[53]
Figura 1. Representação esquemática do DTI

2.2.2.1 Métricas de imagem por tensor de difusão

A decomposição do tensor de difusão fornece três autovalores (λ_1, λ_2e λ_3), que representam a magnitude da difusão ao longo dos três eixos principais do elipsoide de difusão. A partir desses autovalores, podem ser calculadas diversas métricas quantitativas utilizadas para caracterizar o padrão de difusão no tecido (Figura 2).

A difusividade axial (AD - *axial diffusivity*) corresponde ao maior autovalor do tensor (λ_1) e descreve a difusão ao longo do eixo principal do elipsoide. Já a difusividade radial (RD - *radial diffusivity*) corresponde à média dos dois autovalores menores (λ_2 e λ_3), representando a difusão perpendicular ao eixo principal. A difusividade média (MD - *mean diffusivity*) é definida como a média dos três autovalores e fornece uma estimativa geral da magnitude da difusão dentro do *voxel*. Outra métrica amplamente utilizada é a anisotropia fracionada (FA - *fractional anisotropy*), que descreve o grau de anisotropia da difusão. Seus valores variam entre 0 e 1, sendo próximos de zero quando a difusão ocorre de forma semelhante em todas as direções

(difusão isotrópica) e mais elevados quando existe forte dependência direcional do movimento da água (difusão anisotrópica), como frequentemente observado na substância branca do cérebro. Essas métricas permitem quantificar diferentes aspectos do padrão de difusão e são amplamente utilizadas para investigar alterações microestruturais em tecidos cerebrais, como alterações que podem ocorrer tanto nas lesões visíveis nas sequencias ponderadas em T2, quando nas áreas da NAWM.[17,48,50,51]



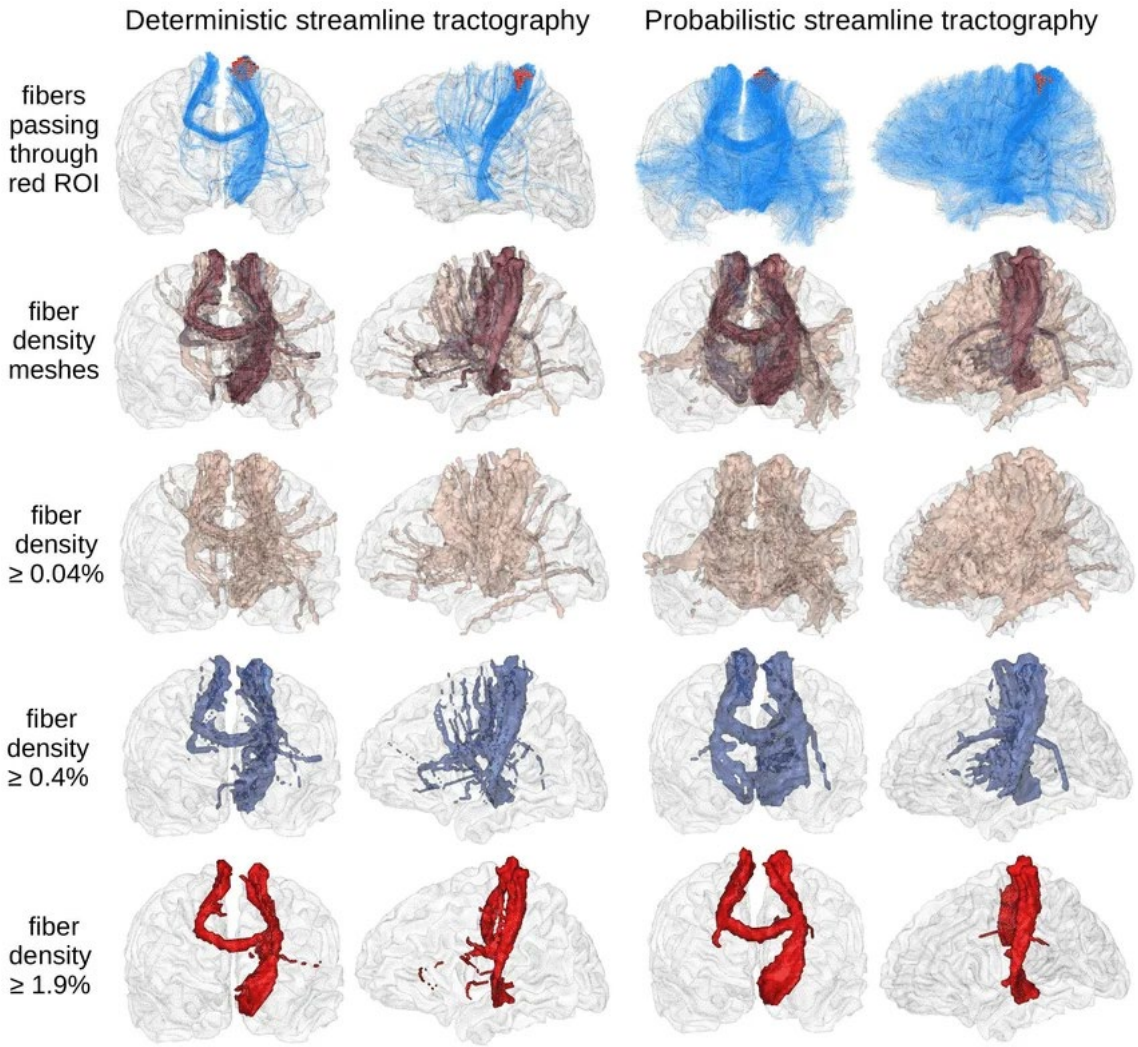
A decomposição do tensor fornece três autovalores ($\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$), que descrevem a difusão ao longo dos eixos principais do elipsoide. A partir desses valores podem ser calculadas métricas como AD, RD, MD e FA, amplamente utilizadas para caracterizar o padrão de difusão no tecido. AD: difusividade axial, FA: anisotropia fracionada, MD: difusividade média, RD: difusividade radial.
Fonte: Moneo J, Kramer JLK, Nightingale TE, Berger MJ. Can magnetic resonance imaging reveal lower motor neuron damage after traumatic spinal cord injury? A scoping review. Neurotrauma Rep. 2021;2(1):541-47. FIG. 2. Concepts of diffusion tensor imaging (DTI). (A) DTI maps the amount of diffusion in three directions (eigenvalues λ1, λ2, and λ3) to a diffusion tensor. When applied to imaging of neurons, changes in directionality and extent of diffusion can indicate disruptions to the natural highly polarized diffusion parallel to the length of the axon and suggest changes in integrity or functional status. (B) From the eigenvalues of DTI, the following parameters are derived: Axial diffusivity is the dominant diffusion direction, typically parallel to the length of the axons; radial diffusivity is diffusion perpendicular to the axial diffusivity. Fractional anisotropy is the degree to which diffusion is restricted to a single direction, as a value between 0 and 1. Mean diffusivity quantifies the overall amount of diffusion occurring between all three planes. Reprinted from Nature Reviews Neurology, Vol. 15/12, Gergely David, Siawoosh Mohammadi, Allan R. Martin, Julien Cohen-Adad, Nikolaus Weiskopf, Alan Thompson, and Patrick Freund, Traumatic and nontraumatic spinal cord injury: pathological insights from neuroimaging, pages 718–731, copyright (2019), with permission from Springer Nature.544 p.[54]
Figura 2. Representação esquemática do tensor de difusão e das principais métricas derivadas do DTI

2.2.2.2 Tractografia

A tractografia é uma técnica derivada do DTI que permite estimar a trajetória de feixes de substância branca a partir da orientação da difusão da água no tecido. Como descrito anteriormente, a decomposição do tensor fornece autovetores que indicam a direção principal da difusão em cada *voxel*. Em regiões de substância branca, essa direção tende a coincidir com a orientação predominante das fibras axonais, uma vez que a difusão da água ocorre mais facilmente ao longo do eixo das fibras do que perpendicularmente a elas. Com base nessa informação direcional, algoritmos de tractografia podem conectar *voxels* vizinhos com orientações semelhantes, reconstruindo trajetórias tridimensionais que representam estimativas dos feixes de substância branca. Esse processo pode ser realizado por diferentes métodos computacionais, geralmente classificados em abordagens determinísticas ou probabilísticas, dependendo da forma como a direção da difusão é seguida ao longo do cérebro.[48,51,55]

Na tractografia determinística, a reconstrução da trajetória é feita a partir da direção local considerada mais provável em cada *voxel*, gerando um único percurso a partir de cada ponto de partida. Já a tractografia probabilística busca incorporar a incerteza inerente à estimativa da orientação das fibras, reconhecendo que essa orientação não é conhecida com precisão absoluta e que erros locais tendem a se acumular ao longo do trajeto. Por isso, em vez de seguir sempre uma única direção, esse método utiliza uma distribuição de orientações possíveis em cada *voxel* e, a cada passo, amostra uma direção a partir dessa distribuição. A repetição desse processo por muitas iterações gera múltiplas trajetórias possíveis, que podem ser combinadas em mapas de distribuição espacial ou mapas de probabilidade do trato. Esse tipo de abordagem é particularmente útil em regiões de arquitetura complexa, baixa anisotropia ou maior incerteza local, nas quais a tractografia determinística pode interromper prematuramente o rastreamento ou deixar de identificar trajetórias plausíveis.[49,50,56-58] Essa diferença pode ser visualizada na figura 3, que compara exemplos de tractografia *streamline* determinística e probabilística. Observa-se que a abordagem determinística tende a produzir trajetórias mais restritas, ao seguir a direção local mais provável, enquanto a probabilística gera uma distribuição mais ampla de trajetórias compatíveis com os dados, evidenciando diferentes níveis de densidade das fibras reconstruídas.[59]

Entretanto, os resultados da tractografia probabilística devem ser interpretados com cautela. Os valores obtidos não correspondem diretamente à probabilidade anatômica real de uma conexão existir, nem ao número verdadeiro de axônios entre duas regiões. Em vez disso, eles refletem o grau com que determinados trajetos são compatíveis com os dados e com o modelo utilizado, sendo influenciados por fatores como estratégia de semeadura, tamanho e posição das regiões de interesse, distância percorrida, resolução espacial, presença de ramificações ou dispersão de fibras, além de outros fatores metodológicos. Além disso, embora a tractografia probabilística seja mais sensível para detectar trajetórias possíveis, ela também pode aumentar a ocorrência de conexões espúrias e de falsos positivos, especialmente quando empregada sem restrições anatômicas adequadas. Assim, seus resultados devem ser entendidos como estimativas da conectividade estrutural compatíveis com o modelo de difusão adotado, e não como uma reconstrução direta e definitiva da anatomia da substância branca.[48,51,56,58]



A primeira linha mostra as fibras reconstruídas que passam por uma região de interesse em vermelho. As linhas seguintes apresentam visualizações baseadas na densidade de fibras, permitindo observar que a tractografia probabilística produz uma distribuição espacial mais ampla de trajetórias compatíveis com os dados, enquanto a tractografia determinística resulta em reconstruções mais restritas.

Fonte: Alvez PB. [Inference of a human brain fiber bundle atlas from high angular resolution diffusion imaging] [thesis]: Paris: Université Paris Sud-Paris XI; 2011. 239 p. French. Figure 3.27: Streamline tractography examples for deterministic and probabilistic approaches, using the fODF estimated from a sharpening spherical deconvolution of the dODF from QBI [Descoteaux et al. (2009b)]. Tractography was calculated for the whole brain, using a T1 propagation mask with voxel size of 0.9375 × 0.9375 × 1mm, and 27 seeds per voxel. The tracking algorithm is the proposed by Perrin et al. (2005a), which uses regularized particle trajectories and is implemented in BrainVISA/Connectomist-2.01 software. The tracking algorithm used a calculation step size of 0.46875 and a maximum curvature angle of 30◦. Minimum and maximum allowed trajectories length were 20 and 200mm, respectively. The first row shows the resulting fibers (in blue), passing through the red ROI, localized in the left post-central gyrus. For a better visualization and comparison of both methods, tractography results are also illustrated using fiber density meshes. Three semitransparent fiber density meshes are used, to indicate regions were fiber density is superior to 0.04% (in orange), 0.4% (in blue), and 1.9% (in red). 65 p. [59]

Figura 3. Comparação entre tractografia *streamline* determinística e probabilística

2.2.2.3 Controle de qualidade e processamento de imagens por tensor de difusão

As imagens de DTI são, em geral, mais suscetíveis a artefatos e distorções do que as imagens estruturais convencionais de alta resolução. Isso ocorre porque a difusão costuma ser adquirida com sequências rápidas do tipo *echo-planar imaging* (EPI), que oferecem alta sensibilidade ao movimento e a inhomogeneidades do campo magnético, porém à custa de menor resolução espacial, menor relação sinal-ruído e maior propensão a distorções geométricas. Por esse motivo, o controle de qualidade e o pré-processamento não devem ser entendidos como etapas meramente operacionais, mas como procedimentos metodológicos centrais para a obtenção de métricas confiáveis, uma vez que artefatos residuais podem enviesar a estimativa do tensor, comprometer o alinhamento entre imagens e aumentar o risco de resultados espúrios.[60-62]

Entre as principais fontes de degradação dos dados de difusão destacam-se o movimento da cabeça, as correntes parasitas induzidas pelos gradientes de difusão (*eddy currents*) e as distorções por suscetibilidade magnética. O movimento entre volumes pode alterar o contraste das imagens DWI e introduzir variações sistemáticas que não são totalmente removidas por simples realinhamento, sendo inclusive capaz de produzir diferenças artificiais entre grupos em estudos comparativos. Já as *eddy currents*, geradas pela rápida comutação dos gradientes, provocam deformações espaciais e erros na correspondência entre os diferentes volumes adquiridos. As distorções por suscetibilidade, por sua vez, decorrem principalmente de variações locais do campo magnético em interfaces ar-tecido e levam a deslocamentos geométricos e perda de fidelidade anatômica, dificultando o registro com imagens estruturais e a comparação *voxel* a *voxel* entre indivíduos.[60,63]

Diante desses desafios, os *pipelines* de processamento em difusão costumam incluir uma sequência de etapas voltadas tanto à inspeção da qualidade bruta dos dados quanto à correção dos principais artefatos. Em linhas gerais, isso envolve inspeção visual inicial, verificação dos arquivos de gradiente, extração cerebral, correção de distorções por suscetibilidade — seja por *field mapping* ou por aquisição de imagens com polaridades opostas de codificação de fase — e correção conjunta de *eddy currents* e movimento. No ambiente do *FMRIB Software Library* (FSL)[64]—um dos principais softwares utilizados para análise de imagens cerebrais de RM—, por exemplo, a

ferramenta ‘*topup’* estima o campo de distorção a partir de pares de imagens *b0* com codificação de fase reversa, enquanto a ferramenta ‘*eddy’* realiza correção integrada de distorções por *eddy currents* e movimento, podendo ainda lidar com *dropout* de sinal e com a interação entre suscetibilidade e movimento.[64-66] Além disso, quando há correção de movimento, a orientação dos gradientes deve ser atualizada, pois a não reorientação da matriz de difusão pode introduzir erros adicionais na estimativa dos parâmetros e na reconstrução dos tratos.[62,67-69]

2.2.2.4 Impactos das lesões no processamento das imagens de difusão

Em doenças que acometem primariamente a substância branca, como a EM, a presença de lesões focais acrescenta uma camada adicional de complexidade à análise por difusão. Isso ocorre porque as lesões não apenas modificam a intensidade e o contraste das imagens, mas também refletem alterações microestruturais capazes de alterar as métricas derivadas do tensor, como redução da anisotropia fracionada e aumento das difusividades.[70] Do ponto de vista metodológico, esse cenário é particularmente relevante para as etapas de registro espacial. Em cérebros com lesões focais, algoritmos automáticos de normalização podem tentar reduzir a discrepância entre a imagem do sujeito e o *template* deformando indevidamente a anatomia ao redor da lesão, o que pode comprometer a acurácia do alinhamento. Por esse motivo, estratégias como o *cost function masking* foram propostas justamente para evitar que a área lesionada influencie o cálculo da transformação espacial, tendo demonstrado maior acurácia do que abordagens sem mascaramento em cérebros com lesões focais. Embora essas discussões tenham surgido inicialmente em contextos mais gerais de neuroimagem, seu racional é diretamente aplicável a doenças desmielinizantes, nas quais a presença de lesões pode enviesar a etapa de registro e, consequentemente, as análises subsequentes.[71,72]

Em estudos de difusão, quando não há uma hipótese anatômica restrita a regiões específicas, torna-se útil empregar abordagens exploratórias de cérebro inteiro. Uma das técnicas mais amplamente utilizadas para esse fim é a TBSS,[67] implementada no FSL,[64] que permite realizar comparações *voxelwise* das métricas de difusão após projetá-las sobre um esqueleto médio da substância branca.[73,74] Esse esqueleto representa, de forma simplificada, o centro dos principais feixes

compartilhados entre os sujeitos, com o objetivo de reduzir a influência de variações anatômicas interindividuais. Assim, no caso do TBSS, essa preocupação com o manejo das lesões é ainda mais importante porque a projeção dos valores sobre o esqueleto depende da identificação de máximos locais de anisotropia;[75] portanto, quando há lesões que reduzem a FA, o efeito dessas alterações sobre a imagem esqueletizada torna-se difícil de prever. Em outras palavras, a presença de lesões pode influenciar não apenas o valor da métrica em si, mas também a forma como esse valor é projetado e comparado entre sujeitos. Por inferência metodológica, isso significa que resultados descritos como alterações na NAWM nem sempre são diretamente comparáveis entre estudos quando o tratamento das lesões difere entre os *pipelines* analíticos.[64,67,71,75-77]

Essa questão também se estende às análises baseadas em tratos. Na tractografia, lesões de substância branca podem alterar a reconstrução da orientação das fibras e modificar a geometria final dos feixes estimados. Ao mesmo tempo, evidências mostram que, embora as lesões impactem a reconstrução local da orientação, isso não necessariamente impede a reconstrução anatômica de tratos em pacientes com EM. Ainda assim, a presença de lesões pode influenciar quais porções do trato são amostradas e, portanto, afetar a extração de métricas tracto-específicas.[70,78] Desse modo, em doenças da substância branca, o manejo das lesões deixa de ser um detalhe técnico secundário e passa a representar um ponto metodológico central para a interpretação dos achados por difusão.

2.3 Estudos de difusão em esclerose múltipla

De forma mais ampla, a literatura mostra que a RM convencional é fundamental para o diagnóstico e o monitoramento da EM, e que sua principal limitação não é a detecção das lesões focais em si, mas sua sensibilidade limitada para captar dano difuso em tecidos de aparência normal. Nesse contexto, a revisão de Inglese e Bester[70] destaca que a DWI, especialmente o DTI, tem se consolidado como uma ferramenta relevante justamente por revelar alterações microestruturais em lesões, na NAWM e também na substância cinzenta de aparência normal, contribuindo para investigar parte do dano “oculto” que escapa às sequências convencionais.

Estudos de revisão indicam que essas anormalidades podem ser observadas já em fases iniciais da doença, inclusive em pacientes com síndrome

clinicamente isolada (CIS – *clinically isolated syndrome*), e tendem a se tornar mais pronunciadas com o aumento da duração da doença e do comprometimento neurológico.[52] De forma convergente, a revisão sistemática de Caranova *et al.*[79] centrada em EM-RR, mostrou um padrão relativamente convergente de redução de FA e aumento de difusividades em lesões e também em NAWM, reforçando que o comprometimento microestrutural na EM não se restringe às placas focais visíveis. Ao mesmo tempo, o estudo de correlação patologia-imagem de Moll *et al.*[80] ajuda a qualificar essa interpretação ao demonstrar que as alterações de DTI em NAWM não refletem um único substrato biológico: em regiões próximas às lesões, podem estar relacionadas a patologia axonal e ativação microglial, enquanto em regiões mais distantes a ativação microglial parece desempenhar papel particularmente importante. Em conjunto, esses trabalhos sustentam a difusão como ferramenta sensível para investigar dano cerebral difuso na EM, mas também indicam que suas métricas devem ser interpretadas com cautela, uma vez que podem refletir processos microestruturais distintos e parcialmente sobrepostos.

À luz desse panorama mais amplo, observa-se que ainda são escassos os estudos que adotam baixa incapacidade clínica como critério de inclusão *a priori*. Por isso, para aproximar o foco desta revisão do problema específico deste trabalho, a seguir são discutidos estudos de DTI em EM que, embora tenham definido “fase inicial” sobretudo pelo tempo desde sintomas ou diagnóstico, incluíram amostras com baixa incapacidade média e permitem discutir, de forma mais direta, como a literatura tem abordado a relação entre alterações microestruturais, lesões e incapacidade. Os aspectos técnicos de amostra, aquisição, processamento/estatística e manejo de lesões estão sistematizados na tabela 1.

Schneider et al.[24] investigaram alterações microestruturais da substância branca em CIS e EM precoce no momento do diagnóstico e ao longo de 2 anos, usando TBSS. Apesar de a coorte apresentar baixa incapacidade em média (EDSS basal mediana 1,5), o estudo não selecionou a amostra *a priori* por EDSS baixo (o intervalo basal vai de 0 a 6,5), usando EDSS principalmente para correlações e evolução clínica. Além disso, embora tenham quantificado lesões (LST-LGA), elas não foram excluídas desde o início das análises TBSS; os próprios autores reconhecem que isso impede separar, com clareza, o efeito das lesões das alterações difusas em substância branca.

Asaf et al.[25] avaliaram se alterações microestruturais na substância branca poderiam indicar uma “janela terapêutica” nos primeiros anos da EM. Em um desenho retrospectivo e transversal, compararam 90 pacientes com RRMS e 25 controles, estratificando os pacientes por duração da doença: curta (<1 ano), moderada (1–5,9 anos) e longa (6–10 anos). Apesar de a amostra ter, em média, baixa incapacidade (EDSS total 2,0), o estudo não selecionou *a priori* indivíduos com EDSS baixo — o EDSS variou de 0 a 6,5, indicando heterogeneidade clínica. Os próprios autores reconhecem como limitação e recomendam a seleção de pacientes mais homogêneos para identificar danos mais locais na substância branca, além do uso de métricas adicionais, como MD e RD, para complementar os resultados.

Oh et al.[21] partiram do paradoxo clínico-radiológico na EM, particularmente evidente na medula espinal (C3–C4), e testaram se medidas quantitativas de DTI e MT (do inglês, *magnetization transfer*) conseguiriam distinguir pacientes com cargas lesionais semelhantes, mas com níveis diferentes de incapacidade. Para isso, os pacientes foram divididos em quatro subgrupos combinando contagem de lesões (≤2 *versus* ≥3; corte escolhido por ser a mediana) e incapacidade (EDSS <6 *versus* ≥6). No geral, observaram que, mesmo com contagens de lesões similares, os subgrupos com maior incapacidade apresentaram métricas mais “anormais”, sugerindo que alterações microestruturais além do que é capturado pela contagem de lesões contribuem para a incapacidade. Entretanto, como a análise foi restrita à medula espinal, permanece em aberto se essa discriminação por incapacidade se sustenta quando avaliamos a microestrutura do encéfalo.

Bao et al.[26] investigaram alterações microestruturais em NAWM em pacientes com RRMS usando uma estratégia *atlas-based*, comparando 17 pacientes e 21 controles. Apesar de não terem explorado associações com incapacidade clínica, como o EDSS, o estudo é relevante por empregar uma abordagem *atlas-based* com manejo de lesões. Os autores geraram um mapa probabilístico de lesão a partir de segmentações manuais, registradas para o espaço padrão e combinadas entre sujeitos; em seguida, binarizaram a máscara com limiar de 0,3 e a subtraíram das regiões de interesse (ROIs) do atlas para restringir a análise à NAWM. Apesar desse cuidado, reconhecem como limitação que, por depender de limiar, nem todas as regiões lesionais são necessariamente excluídas da máscara final, podendo contribuir para as métricas extraídas. Mantém-se, assim, a lacuna relacionada à ausência de padronização no

manejo das lesões em estudos de difusão na EM, especialmente no que diz respeito à exclusão individualizada das lesões para cada participante.

Em conjunto, esses estudos mostram que há sinais consistentes de alteração microestrutural detectável por DTI em fases iniciais da EM e em amostras com baixa incapacidade média. Entretanto, como a definição de “inicial” costuma ser baseada em tempo de doença e o EDSS raramente é utilizado como critério de inclusão, permanece limitada a evidência especificamente centrada em pacientes funcionalmente homogêneos. Paralelamente, a diversidade de estratégias de manejo de lesões reforça que diferentes escolhas analíticas podem influenciar a forma como alterações em NAWM são estimadas. Nesse contexto, torna-se pertinente avaliar DTI em amostras com baixa incapacidade definida *a priori*, considerando de maneira explícita o papel das lesões na interpretação dos achados.

2.4 *VolBrain*: *DeepLesionBrain*

Considerando que um dos objetivos deste estudo envolve o manejo das lesões no contexto da EM, tornou-se necessário incorporar ao *pipeline* uma etapa de segmentação das lesões de substância branca. Entre as diferentes abordagens disponíveis, optou-se pela técnica *DeepLesionBrain*, disponibilizada na plataforma *volBrain*, que utiliza modelos de *deep learning* treinados especificamente para a detecção e segmentação de lesões em imagens de ressonância magnética ponderadas em T1 e FLAIR. Além de realizar a segmentação automática das lesões, a plataforma disponibiliza seus serviços de forma gratuita, o que favorece sua utilização em contextos de pesquisa.

Uma vez que a escolha da ferramenta de segmentação pode influenciar diretamente a qualidade das análises subsequentes, apresenta-se a seguir uma breve contextualização da técnica *DeepLesionBrain*, incluindo aspectos relacionados à sua validação, características metodológicas e principais saídas geradas.

2.4.1 *DeepLesionBrain*: validação e características

Segundo descrito pelos desenvolvedores,[81] a validação da técnica foi realizada utilizando três bases de dados independentes de pacientes com EM: *Longitudinal MS Lesion Segmentation Challenge* (*ISBI Challenge*), *Multiple Sclerosis Lesion Segmentation Challenge 2016* (MSSEG'16) e um *dataset* interno (*in-house*), adquiridos com diferentes protocolos de aquisição e características populacionais. Foi realizado o uso de testes cruzados entre bases (*cross-dataset validation*), nos quais o modelo é treinado em um conjunto de dados e testado em outro completamente distinto, sem qualquer reajuste ou re-treinamento. Esse tipo de abordagem permite avaliar de forma mais rigorosa a robustez e a capacidade de generalização da técnica frente ao chamado *domain shift*, fenômeno comum em aplicações clínicas.

O desempenho foi avaliado por métricas quantitativas padronizadas, incluindo *dice coefficient, true positive rate, positive predictive value* e um *hybrid score*, além de testes estatísticos (Wilcoxon) para comparação entre métodos. Nessas análises, o *DeepLesionBrain* apresentou desempenho significativamente superior ou equivalente aos métodos de referência, especialmente nos cenários fora do domínio de treinamento, além de maior consistência de segmentação entre diferentes conjuntos de dados.

Embora não tenha como objetivo principal substituir diretamente a avaliação manual, o *DeepLesionBrain* foi comparado a segmentações de consenso realizadas por especialistas, utilizadas como padrão-ouro (*ground truth*). Os resultados demonstraram que a técnica alcança níveis de acurácia comparáveis aos observados em desafios internacionais, nos quais métodos automáticos baseados em *deep learning* já demonstraram desempenho semelhante ou superior ao de avaliadores humanos em condições controladas.

Além disso, o *DeepLesionBrain* mostrou maior consistência e reprodutibilidade do que abordagens manuais, uma vez que elimina a variabilidade inter e intraobservador, reconhecida como uma limitação importante da segmentação manual de lesões em EM. Dessa forma, a técnica se apresenta como uma alternativa robusta para aplicações clínicas e de pesquisa, especialmente em estudos multicêntricos.

2.4.2 *DeepLesionBrain*: especificidade para esclerose múltipla

Conforme relatado por Kamraoui et al.,[81] o *DeepLesionBrain* foi desenvolvido e validado especificamente para a segmentação de lesões da EM, utilizando características morfológicas e de intensidade típicas dessas lesões em imagens ponderadas em T1 e FLAIR. Portanto, sua aplicação direta é direcionada a pacientes com EM.

Entretanto, o próprio arcabouço metodológico da técnica — baseado em redes convolucionais espacialmente distribuídas, aprendizado hierárquico de características globais e locais e estratégias avançadas de aumento de dados (*Image Quality Data Augmentation*) — não é intrinsecamente específico da EM. Os autores destacam que abordagens semelhantes já demonstraram boa generalização em outras populações e doenças neurológicas, como envelhecimento e doença de Alzheimer, sugerindo que o método pode ser potencialmente adaptável a outras patologias com lesões focais, desde que treinado e validado adequadamente.

2.4.3 *DeepLesionBrain*: saídas geradas

A saída primária é uma máscara tridimensional binária de segmentação de lesões de substância branca, no qual cada *voxel* é classificado como lesão ou não lesão, com classificação anatômica das lesões (por exemplo, periventricular, profunda, juxtacortical e infratentorial). Além disso, o método produz relatórios quantitativos em formatos CSV e PDF contendo volumes totais de lesões, volumes por classe anatômica e localizações no espaço padronizado, *template* desenvolvido pelo *Montreal Neurological Institute* (MNI), bem como medidas volumétricas de lesões em relação ao volume intracraniano total. O espaço padrão MNI ou MNI152 corresponde a um modelo anatômico médio derivado de 152 cérebros humanos adultos saudáveis, com resolução espacial de 1×1×1 mm.[82,83]

O *pipeline* também inclui segmentações complementares de estruturas cerebrais e tecidos (como volumes de substância cinzenta, substância branca e líquor), fornecidas pela integração com o módulo *AssemblyNet*, e mapas de probabilidade de desconexão de tratos de substância branca baseados em um atlas de conectividade.

3 MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

O presente estudo faz parte do projeto guarda-chuva intitulado “Efeitos da prática do yoga em pacientes com esclerose múltipla: uma abordagem multidimensional”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein (SGPP 2776-16), com parecer consubstanciado registrado sob número CAAE 57428416.2.0000.0071 na Plataforma Brasil.

O projeto foi previamente submetido e aprovado por Comitê de Ética em Pesquisa e todos os participantes incluídos no estudo original assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), garantindo o direito à privacidade e confidencialidade dos dados.

O subprojeto utilizou dados previamente coletados no estudo guarda-chuva, sem a necessidade de novos procedimentos com os participantes. Todas as informações foram armazenadas em ambiente seguro, com acesso restrito e protegidas conforme as normas de segurança de dados do hospital.

3.2 Participantes

A pesquisa foi conduzida no Hospital Israelita Albert Einstein, com a participação de pacientes diagnosticados com EM, recrutados no Centro de Esclerose Múltipla do Programa Integrado de Neurologia do hospital, bem como de outros centros de referência, incluindo a Associação Brasileira de Esclerose Múltipla (ABEM) e a Associação de Amigos dos Portadores de Esclerose Múltipla (AME), no período de novembro de 2016 a novembro de 2020. O estudo seguiu os critérios diagnósticos de McDonald vigentes à época da coleta, reconhecidos como padrão internacional para o diagnóstico da doença.[84,85]

Como critérios de inclusão, foram selecionados participantes com idade entre 18 e 60 anos. Para o Grupo EM, foram selecionados pacientes com as formas EM-RR e progressivas, em uso de terapia imunomoduladora ou imunossupressora, com tratamento estável por um período mínimo de seis meses. Além

disso, os participantes deveriam apresentar exames de RM do neuro-eixo (incluindo crânio, coluna cervical e dorsal) demonstrando ausência de atividade inflamatória, sem evidências de atividade clínica ou radiológica.

Os critérios de exclusão abrangeram indivíduos que não apresentavam capacidade cognitiva suficiente para compreender e assinar o TCLE e indivíduos com claustrofobia.

Ademais, o Grupo Controle foi composto por indivíduos sem histórico de doenças neurológicas ou psiquiátricas.

Os grupos foram pareados na proporção um a um quanto à sexo biológico, idade e escolaridade, com o objetivo de minimizar potenciais fatores de confusão e tornar as diferentes abordagens de reconstrução do trato mais comparáveis entre si.

Foram recrutados 34 pacientes com EM e 24 Controles saudáveis, que completaram as etapas do protocolo experimental.

3.3 Desenho experimental

Este estudo é de natureza transversal e retrospectiva e comparou pacientes com EM, com capacidade de deambular sem apoios, a Controles saudáveis. A incapacidade funcional dos pacientes foi avaliada segundo a escala do EDSS.

A análise do presente subprojeto limitou-se ao Grupo EM, com escore de EDSS entre 0 e 3,5. A faixa de EDSS foi definida com objetivo de compor uma amostra mais homogênea do ponto de vista funcional, restrita a indivíduos que deambulam sem apoio, antes do ponto em que a deambulação passa a determinar o escore (≥4,0)

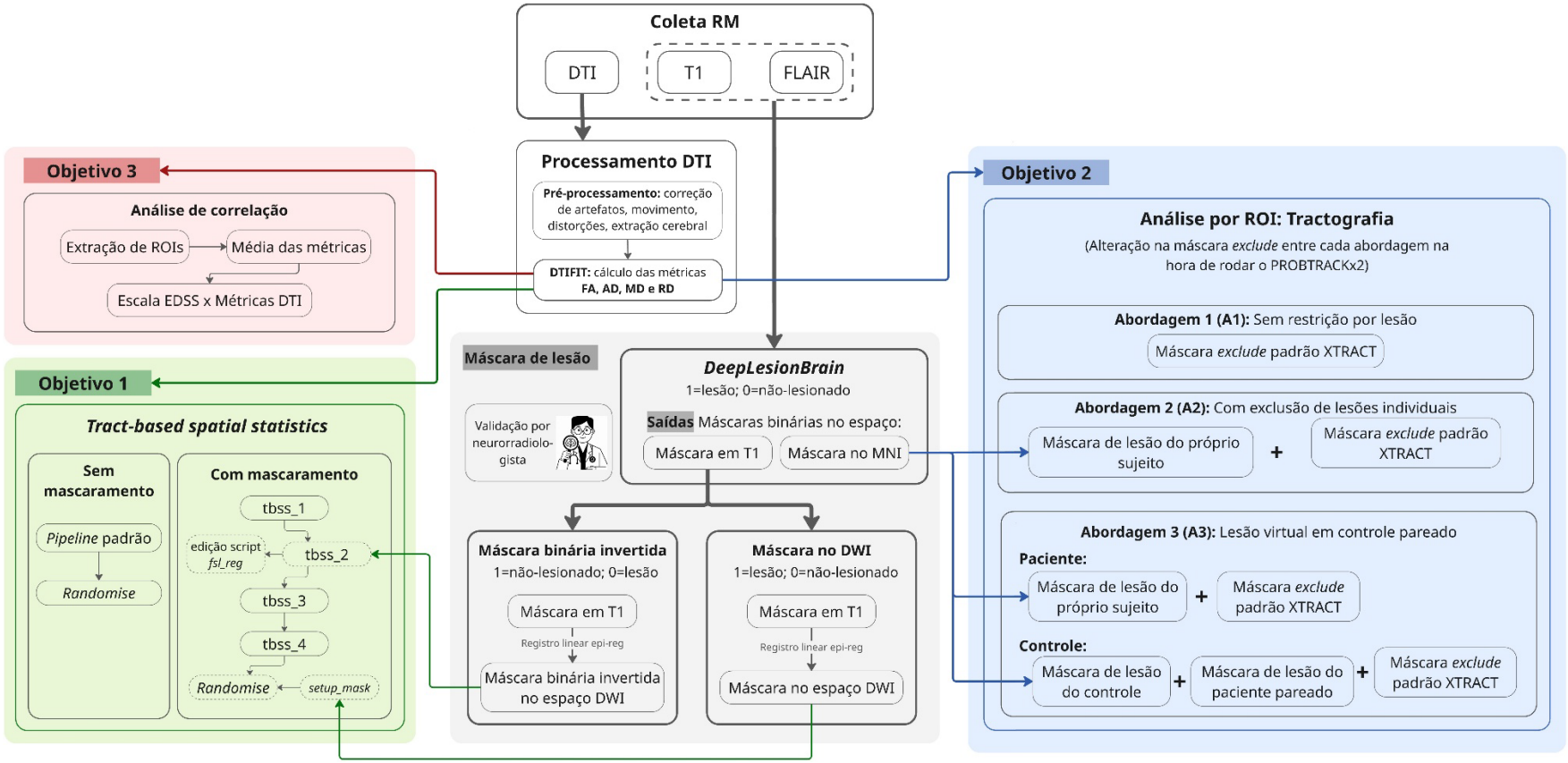
A figura 4 resume o desenho metodológico do estudo e a integração entre as etapas de processamento das imagens, segmentação das lesões e métodos de análise empregados. O fluxograma foi organizado por cores com o objetivo de facilitar sua leitura e compreensão: os elementos em tons de preto e branco representam etapas e processamentos gerais comuns a todo o estudo, enquanto os blocos em verde, azul e vermelho correspondem, respectivamente, aos procedimentos relacionados aos objetivos 1, 2 e 3. A disposição espacial dos elementos foi definida visando uma melhor organização visual do esquema, de modo a facilitar a leitura e a identificação das etapas relacionadas a cada objetivo.

Inicialmente, foram adquiridas imagens de DTI e estruturais ponderadas em T1 e FLAIR. As imagens de DTI passaram por etapas de pré-processamento, incluindo correção de artefatos, movimento e distorções geométricas, seguidas do ajuste do tensor e do cálculo das métricas de difusão, que constituíram a base para as análises subsequentes, sendo utilizadas em todos os objetivos do estudo. Em paralelo, as imagens estruturais T1 e FLAIR foram utilizadas para a segmentação automática das lesões de substância branca. Todas as segmentações foram posteriormente validadas por um neurorradiologista. As máscaras binárias de lesão geradas no espaço T1 foram registradas linearmente para o espaço de difusão de cada sujeito. A partir dessas máscaras, também foi construída uma versão binária invertida, ambas máscaras foram utilizadas no TBSS.

Seguindo para os objetivos específicos, no topo à esquerda do fluxograma, em vermelho, está representada a análise de correlação, correspondente ao Objetivo 3. Para essa etapa, foram extraídas ROIs previamente definidas, a partir das quais foram obtidos os valores médios das métricas de difusão. Em seguida, realizou-se a análise de correlação entre as métricas do DTI e os escores clínicos de incapacidade, avaliados pela escala EDSS.

Na porção inferior esquerda do esquema, em verde, encontra-se o Objetivo 1, que consistiu na análise exploratória de cérebro inteiro por meio do TBSS, realizada sem e com mascaramento de lesão. Na análise sem mascaramento, foi empregado o *pipeline* padrão do TBSS, seguido da análise estatística com a ferramenta randomise. Já na análise com mascaramento, foi incorporada a máscara binária de lesão invertida, além da adaptação do script de registro para permitir o uso da máscara de lesão tanto nas etapas de registro linear quanto não linear. Na etapa estatística, foi utilizada a máscara padrão no espaço de difusão de cada sujeito por meio da ferramenta *setup_mask*.

Por fim, à direita do fluxograma, em azul, está representada a análise de tractografia, relacionada ao Objetivo 2. Foram aplicadas três abordagens distintas para a reconstrução do trato de interesse, diferindo entre si pela máscara *exclude* utilizada no PROBTRACKX2. Na Abordagem 1, a reconstrução foi realizada sem restrição por lesão; na Abordagem 2, foram excluídas as áreas lesionadas individuais; e, na Abordagem 3, foi realizada a reconstrução do trato com mascaramento virtual de lesões em controles pareados.



O esquema resume as etapas de aquisição e processamento das imagens e segmentação das lesões, bem como as estratégias de análise empregadas. Os elementos em tons de preto e branco representam etapas gerais do processamento, enquanto os blocos coloridos indicam os procedimentos específicos de cada objetivo: verde (Objetivo 1 – análise de cérebro inteiro por estatística espacial baseada em tratos, TBSS), azul (Objetivo 2 – análise por tractografia probabilística em três abordagens) e vermelho (Objetivo 3 – análise de correlação). As métricas de difusão (FA, AD, MD e RD) foram utilizadas em todas as análises. As máscaras binárias de lesão, obtidas a partir das imagens T1 e FLAIR e registradas para o espaço de difusão, incluindo uma versão binária invertida, foram empregadas nas análises por TBSS. AD: difusividade axial; DTI: imagem por tensor de difusão; FA: anisotropia fracionada; FLAIR: *Fluid Attenuated Inversion Recovery*; MD: difusividade média; MNI: *template* padrão de imagem; ROI: região de interesse; RD: difusividade radial; RM: ressonância magnética; T1: imagem estrutural; TBSS: *Tract-Based Spatial Statistcs*.
Figura 4. Desenho do estudo

3.3.1 Protocolo de aquisição de imagens

Todos os exames de RM foram realizados em um scanner de 3,0 T (Siemens® – PRISMA) com gradientes de 80 mT/m, razão de incremento 200 mT/m/s e bobina de recepção dedicada de 64 canais, localizado no Departamento de Medicina Diagnóstica e Preventiva – Setor de Imagem do Hospital Israelita Albert Einstein.

A sequência estrutural anatômica (T1) foi adquirida utilizando uma sequência GRE 3D, com FOV, campo de visão (*field of view*) de 256 mm e espessura de corte de 1 mm (TR/TE, tempo de repetição/tempo de eco: 2500/3,47 ms; TA, tempo de aquisição: 5:48 min).

As imagens de difusão foram obtidas em modo livre (*free mode*, bipolar), com cortes axiais de 2 mm de espessura e FOV de 128 mm, utilizando aquisição multibanda com fator 3, com direção de codificação de fase anteroposterior. O protocolo incluiu 69 cortes, adquiridos em 3:11 min (TR/TE: 3140/59 ms). Adicionalmente, foram adquiridas 60 direções não colineares com valor b de 1000 s/mm², além de nove volumes b0 (três volumes iniciais e seis intercalados ao longo da aquisição). A força máxima do gradiente utilizada foi de 45 mT/m.

Imagens FLAIR tridimensionais foram adquiridas no plano sagital, com *voxels* isotrópicos de 0,4×0,4×1,0 mm (TR/TE/TI (tempo de inversão) = 4500/386/1800 ms), FOV: 230 mm e matriz de 256×256, resultando em 192 cortes de 1 mm de espessura. A aquisição empregou aceleração paralela *GeneRalized autocalibrating partial parallel Acquisition* (GRAPPA) com fator 3, totalizando um TA de 5:21 min.

3.3.2 Segmentação automática das lesões

As lesões de substância branca foram segmentadas automaticamente utilizando o módulo *DeepLesionBrain*, disponível na plataforma *volBrain* (https://www.volbrain.net/) — um sistema gratuito de análise de neuroimagem baseado em *machine learning* que processa imagens de RM de forma totalmente automática.[86]

O *DeepLesionBrain* é um *pipeline baseado* em *deep learning* desenvolvido especificamente para a segmentação de lesões da EM a partir de imagens ponderadas em FLAIR e T1. A ferramenta recebe os volumes anonimizados em formato *neuroimaging informatics technology initiative* (NIfTI) e produz e produz múltiplas saídas relacionadas à detecção, quantificação e caracterização das lesões, bem como segmentações anatômicas complementares e relatórios quantitativos.[81,87-89] No presente estudo, foram utilizadas exclusivamente as máscaras binárias de segmentação das lesões, tanto no espaço original do sujeito quanto no espaço padronizado MNI, conforme a necessidade de cada etapa analítica.

Após o processamento automático, todas as segmentações foram inspecionadas visualmente por um neurorradiologista (R.B.) especializado há 10 anos na doença, utilizando o software 3D Slicer (https://www.slicer.org/), versão 5.10.0.[90] Para essa etapa, as máscaras de lesão no espaço T1 foram carregadas simultaneamente com as respectivas imagens FLAIR, permitindo a identificação de eventuais falhas de classificação. Após a etapa de inspeção e correção as máscaras foram novamente binarizadas.

3.3.2.1 Mapa de probabilidade espacial das lesões

Com o objetivo de caracterizar visualmente a distribuição espacial das lesões na amostra, foi gerado um mapa de probabilidade no espaço padrão MNI. Para isso, as máscaras binárias individuais de lesão, previamente registradas para o espaço padrão, foram combinadas *voxel* a *voxel*, resultando em um mapa representando a frequência de ocorrência de lesão em cada região cerebral.

Ressalta-se que esse procedimento teve finalidade exclusivamente descritiva e ilustrativa, não sendo utilizado para análises inferenciais. A proposta foi oferecer uma visualização global da carga e topografia das lesões na amostra, facilitando a interpretação anatômica da extensão lesional e sua possível relação com as análises subsequentes, como a tractografia.

O mapa foi sobreposto ao *template* anatômico padrão MNI para visualização, utilizando escala de cores graduada para representar a frequência relativa de ocorrência de lesão na amostra. As fatias axiais foram organizadas em mosaico,

contemplando predominantemente regiões supratentoriais de maior relevância anatômica. Mapas separados foram gerados para o Grupo EM e para o Grupo Controle.

3.3.3 Processamento das sequências de imagem por tensor de difusão

Considerando que a qualidade das imagens de difusão é, em geral, inferior à das imagens estruturais de alta resolução, foi adotado um protocolo rigoroso de controle de qualidade e pré-processamento, com o objetivo de minimizar artefatos, corrigir distorções geométricas e aumentar a confiabilidade das análises de DTI.

O processamento dos dados seguiu, sempre que aplicável, o *pipeline* tradicional recomendado pelo FSL para imagens de difusão, abrangendo etapas de pré-processamento, geração de mapas de difusão e análises baseadas em tratos. Todas as etapas foram realizadas com o software FSL versão 6.0.7.18 (http://www.fmrib.ox.ac.uk/fsl/).[64]

Considerando as particularidades do delineamento do estudo, foram implementadas adaptações específicas, principalmente nas etapas relacionadas ao TBSS, com mascaramento de lesão, e na análise estatística com o randomise. Esses procedimentos são detalhados nas subseções a seguir.

3.3.3.1 Pré-processamento

O pré-processamento e a análise dos dados de DTI foram realizados utilizando as ferramentas do software FSL. As imagens *digital imaging and communications in medicine* (DICOM) foram inicialmente convertidas para o formato *NIfTI* por meio da ferramenta *dcm2nii*, embutido no software MRIcroGL. Após a conversão, todas as imagens foram inspecionadas visualmente para a detecção de artefatos e irregularidades.

A ferramenta de extração cerebral (BET - *brain extraction tool*)[91] foi utilizada para criar uma máscara binária a partir do primeiro volume b0, permitindo a extração da calota craniana. O limiar de intensidade fracionada (-f) e o gradiente vertical (-g) foram definidos manualmente (f = 0,3; g = 0,05), com o objetivo de otimizar a separação entre tecido cerebral e não cerebral nas imagens de difusão. Os resultados

da extração cerebral foram submetidos a controle de qualidade visual individual, com inspeção manual de todos os sujeitos. Essa máscara foi então aplicada a todas as imagens da sequência de difusão.

Para a correção de distorções de campo magnético causadas por suscetibilidade magnética, foi utilizada a ferramenta *TOPUP*, que se baseia na aquisição de volumes b0 com direções de codificação de fase em polaridades opostas (anteroposterior - AP e posteroanterior - PA).[65,91] Os volumes b0 com polaridades invertidas foram combinadas por meio do comando *fslmerge*, e o campo de distorção foi estimado utilizando a configuração padrão do FSL, *b02b0.cnf*. O processamento resultou em imagens de difusão corrigidas para distorções geométricas associadas à suscetibilidade.

As distorções introduzidas pelas *eddy currents*, geradas pela rápida mudança dos gradientes de direção, bem como os artefatos de movimento da cabeça, foram corrigidos por meio da ferramenta *Eddy Current Correction*, integrada ao módulo *FMRIB's diffusion toolbox* (FDT) do FSL.[66,92,93] Essa ferramenta também alinha toda a sequência de DTI à primeira imagem b0 de referência por meio de registro rígido, corrigindo os movimentos de cabeça. Adicionalmente, o movimento da cabeça (translação e rotação) foi estimado com a ferramenta *estimate_move_by_susceptibility*, incorporada na função *Eddy*.[94] Todos indivíduos passaram por inspeção visual para detecção de artefatos residuais, como queda de sinal, distorções geométricas e avaliação da adequação da correção de movimento.

Como parte do pré-processamento, a tabela de direções dos gradientes (BVEC – *gradient vector direction table*) foi atualizada para cada participante, refletindo as correções aplicadas por movimento e distorções. Em seguida, os dados foram ajustados *voxel* a *voxel* com a ferramenta *DTIFIT,*[95] utilizando o método dos mínimos quadrados lineares ponderados (*weighted linear least-squares*). A partir desse ajuste, foram estimadas as principais métricas de difusividade, incluindo: FA, AD, RD e MD.

3.3.3.2 Análise por estatística espacial baseada em tratos

A análise *voxelwise* exploratória de todo o cérebro foi realizada utilizando o método TBSS, implementado no software FSL, seguindo o protocolo descrito por Smith et al.[67]

Como primeiro passo, os mapas de FA foram normalizados para que todos tivessem a mesma escala de intensidade entre 0 e 1, o que ajuda a reduzir ruídos e diferenças entre sujeitos. Em seguida, os mapas foram alinhados ao espaço MNI152, garantindo que os dados de todos os participantes possam ser comparados *voxel* a *voxel*. O alinhamento foi realizado por meio da técnica de registro não linear, que ajusta as imagens individuais à anatomia do modelo padrão, utilizando o *template* 'FMRIB58_FA' (https://pages.fmrib.ox.ac.uk/fsldocs-4c7e2c/other/fmrib58_fa.html) como imagem de referência. A ferramenta empregada nessa etapa foi o *tbss_2_reg*, com a *flag* -T, aciona automaticamente o *template target* padrão do FSL. A utilização do *template* padrão visou proporcionar maior robustez ao registro, além de reduzir possíveis vieses dependentes da amostra e facilitar a comparabilidade com estudos prévios.

Após o alinhamento, foi gerada uma imagem média dos mapas de FA, a partir da qual foi construído um único esqueleto médio da substância branca, representando os centros dos principais feixes de fibras do cérebro, por meio da ferramenta *tbss_3_postreg*.

Os valores de FA de cada participante foram projetados nesse esqueleto, o que permite concentrar as análises nas regiões de maior interesse anatômico, minimizando o impacto de variações individuais.[67]

Na etapa subsequente (*tbss_4_prestats*), o esqueleto foi limiarizado para excluir regiões com valores baixos de FA (≤ 0,2), mais suscetíveis a ruídos, efeitos de volume parcial e variações anatômicas, a fim de garantir que apenas os feixes principais fossem analisados. Por fim, as mesmas transformações utilizadas para alinhar os mapas de FA foram aplicadas aos mapas das demais métricas de difusão (AD, MD e RD).

3.3.3.3 Análise por estatística espacial baseada em tratos: substância branca de aparência normal

Com o objetivo de restringir a análise às regiões de NAWM e reduzir possíveis vieses de registro associados às áreas lesionadas, o *pipeline* do TBSS foi adaptado conforme orientação dos desenvolvedores do FSL, por meio do fórum oficial JISCmail/FSL (https://www.jiscmail.ac.uk/cgi-bin/webadmin?A0=fsl). Essa modificação teve como finalidade minimizar um problema conhecido do método, relacionado ao fato de o registro do TBSS basear-se no pico de FA — que pode estar reduzido nas áreas lesionadas, comprometendo o alinhamento das imagens entre os sujeitos.

Para contornar esse viés, a partir das segmentações produzidas pelo *pipeline DeepLesionBrain*, foi criada a máscara binária invertida. O arquivo original fornecido pela plataforma apresenta valores binários em que 1 = lesão e 0 = tecido não lesionado. Primeiramente, a máscara que estava no espaço do sujeito (T1) foi registrada linearmente para o espaço da FA nativa de cada participante. Em seguida, os valores foram invertidos (1 → 0; 0 → 1) por meio do comando *fslmaths*, resultando na máscara de lesão invertida, na qual 1 passou a representar apenas tecido não lesionado e 0, as áreas de lesão. Posteriormente, essa máscara foi interseccionada com a máscara cerebral gerada automaticamente pelo *tbss_1_preproc*, para que somente *voxels* cerebrais íntegros fossem mantidos para o processamento.

A máscara resultante substituiu o arquivo padrão **_FA_mask* na pasta de entrada do TBSS, de modo que todas as regiões lesionadas fossem excluídas das etapas de registro e projeção do esqueleto. Para isso, o script *fsl_reg* (chamado internamente pelo comando *tbss_2_reg*) foi editado, permitindo que tanto a ferramenta de registro linear de imagens do FMRIB (FLIRT - FMRIB *linear image registration tool*) quanto a de registro não linear (FNIRT - FMRIB's *nonlinear image registration tool*) incorporassem a máscara como parâmetro de *cost-function masking*. As modificações realizadas no código estão detalhadas no Apêndice 1.

Após essa modificação, o *pipeline* do TBSS foi executado normalmente, incluindo o alinhamento das imagens ao *template* padrão FMRIB58_FA (*tbss_2_reg* -T), a construção do esqueleto médio (*tbss_3_postreg*) e a projeção dos mapas individuais sobre o esqueleto (*tbss_4_prestats*).

3.3.4 Análise por região de interesse

No segundo estágio da análise, foram extraídas as médias das métricas de DTI em ROIs previamente descritas na literatura, selecionadas com base em sua relevância clínica na EM.

Entre as ROIs comumente afetadas na EM, explorada em análises de difusão, e associadas à função motora, inclui-se os tratos piramidais, com ênfase na capsula interna (anterior, posterior e retrolenticular), na coroa radiata (anterior, superior e posterior) e na radiação talâmica posterior (que inclui a radiação óptica).[20,26,70,96-101] Também foram incluídas estruturas comissurais, como o corpo caloso (genu, corpo e esplênio) e o tapetum, que se origina a partir de fibras do corpo e do esplênio do corpo caloso e contorna lateralmente os ventrículos laterais.[102] Além de sua continuidade anatômica com o corpo caloso, o tapetum tem sido descrito como uma das regiões frequentemente acometidas junto a alterações calosas em pacientes com EM.[20,26,70,96,99] Totalizando 11 regiões.

Para minimizar possíveis vieses, foram criadas máscaras específicas para cada ROI utilizando a ferramenta *FSLEYES* (versão 1.16.2), com base no atlas de substância branca 'JHU ICBM-DTI-81', disponível no próprio FSLEYES.[103] Posteriormente, os valores médios de FA, AD, MD e RD de cada sujeito, em seus respectivos grupos, foram extraídos a partir dos mapas de difusão previamente normalizados (isto é, registrados no espaço padrão FMRIB58_FA), com a finalidade de serem utilizadas na análise de correlação.

3.3.5 Tractografia

A tractografia baseada em DTI teve como objetivo investigar, de forma individualizada e anatômica, os tratos de substância branca potencialmente afetados na EM. Essa abordagem complementa as análises *voxelwise* realizadas pelo TBSS e as análises médias por ROI, permitindo uma avaliação mais específica da microestrutura ao longo de trajetórias definidas no espaço anatômico.

As análises foram conduzidas com rastreamento probabilístico (*probabilistic tractography*), implementado por meio de scripts desenvolvidos para este projeto utilizando as ferramentas *Bayesian Estimation of Diffusion Parameters Obtained*

using Sampling Techniques (BEDPOSTX)[58,104,105] e *Probabilistic Tracking with Crossing Fibres* (PROBTRACKX2)[58,105,106] do FSL, ambas na versão para GPU.

A escolha por um modelo probabilístico foi motivada pelo tipo de aquisição de difusão (60 direções, b = 1000 s/mm²). Embora esse número de direções seja suficiente para estimar métricas do tensor de difusão com boa confiabilidade, ele não provê resolução angular adequada para modelos determinísticos mais complexos, como *constrained spherical deconvolution* (CSD), que geralmente requerem esquemas de aquisição com maior resolução angular e, frequentemente, múltiplos valores de b, como em protocolos do tipo *high angular resolution diffusion Imaging* (HARDI).

O modelo bayesiano de difusão foi estimado individualmente pelo BEDPOSTX, que ajusta até três orientações de fibras por *voxel*, incorporando a incerteza direcional. Em seguida, o rastreamento probabilístico foi executado com o PROBTRACKX2, com 10.000 iterações por *voxel*, no espaço nativo de difusão. As máscaras de *seed* (semente), *target* (alvo), *waypoint* (intermediário) e *avoid*/*exclude* (evitar/exclusão) foram obtidas a partir do pacote *Cross-species tractography* (XTRACT),[76,107,108] garantindo padronização anatômica e reprodutibilidade. Por padrão, as máscaras são definidas no espaço padrão (MNI152). Durante o processamento, o PROBTRACKX2 converte as máscaras do espaço padrão para o espaço nativo de difusão para executar o rastreamento, e posteriormente projeta automaticamente as saídas de volta ao espaço padrão, mantendo a coerência espacial com as máscaras de entrada e possibilitando comparações intersujeitos.

Três abordagens complementares foram aplicadas, buscando isolar progressivamente o impacto das lesões sobre a conectividade estrutural.

3.3.5.1 Tractografia sem restrições por lesão

Na primeira abordagem, os tratos foram reconstruídos no espaço de difusão sem restrições adicionais, utilizando apenas as máscaras padrões do XTRACT (*seed*, *target* e *exclude*). Essa condição reflete o padrão global de conectividade estrutural, servindo como referência frente às demais abordagens com restrições progressivas.

3.3.5.2 Tractografia com exclusão de lesões individuais

Na segunda abordagem, as máscaras de lesão no espaço MNI152 — fornecidas como uma das saídas padrão *DeepLesionBrain* — foram combinadas, para cada indivíduo, com as máscaras de exclusão padrão do XTRACT. As regiões resultantes foram então empregadas como máscaras de exclusão (*exclude*) no PROBTRACKX2, de modo a restringir o rastreamento às áreas de NAWM e a minimizar a influência direta das lesões individuais na reconstrução dos tratos.

3.3.5.3 Tractografia com lesões virtuais em controles pareados

Na terceira abordagem, buscou-se isolar os efeitos puramente microestruturais das diferenças anatômicas associadas às lesões. Para isso, a máscara de lesão de cada paciente normalizada no espaço padrão (MNI152) foi registrada para o espaço de difusão do controle pareado, utilizando o *warp* composto MNI → DWI do respectivo controle (interpolação *nearest-neighbour*), gerado a partir da inversa do *warp* DWI → MNI previamente calculado. A máscara de lesão do paciente pareado foi somada à máscara de lesão do controle e à máscara de exclusão padrão do XTRACT. Assim, o controle passou a apresentar, virtualmente, a mesma região de “ausência de fibras” que o paciente correspondente, somado às suas próprias lesões. Já para os pacientes, foram utilizadas as mesmas máscaras *exclude* da abordagem anterior, isto é, máscara de exclusão padrão do XTRACT somado à máscara de lesões respectivas à cada paciente.

Essa etapa foi incluída para tentar minimizar os efeitos geométricos introduzidos pela presença de lesões, favorecendo uma interpretação mais centrada nos aspectos microestruturais.

A tractografia parte da premissa de continuidade espacial das fibras, mas as lesões podem representar interrupções apenas parciais — uma fração dos axônios ainda pode atravessar ou contornar a área lesionada.[78,109,110] Ao aplicar as mesmas restrições espaciais nos controles, esta abordagem buscou reduzir uma possível superestimação das diferenças entre grupos decorrentes apenas da exclusão de *voxels* lesionados, possibilitando uma estimativa mais específica do impacto funcional das lesões sobre a conectividade.

3.3.5.4 Pós-processamento e extração de métricas

As imagens de densidade de tratos resultantes foram normalizadas pelo número total de amostras e limiarizadas em 5% para eliminar conexões espúrias, sendo então binarizadas (*fslmaths*). Todos os tratos foram inspecionados visualmente quanto à completude anatômica e ausência de artefatos. As métricas de difusão (FA, AD, RD e MD) foram extraídas bilateralmente com o *fslstats*, a partir das máscaras binárias dos tratos, obtendo-se os valores médios de cada medida.

O TCE foi selecionado como trato de interesse por sua relevância para função motora e por evidências prévias de associação entre métricas de difusão e desfechos clínico-funcionais na EM.

Diversos estudos descrevem que o TCE apresenta alterações estruturais e funcionais mensuráveis em pessoas com EM, mesmo em estágios clínicos variados, o que torna esse trato uma região informativa para investigações que buscam detectar mudanças motoras sutis. Em trabalhos prévios, foram observadas associações entre métricas de difusão ao longo do TCE e indicadores de incapacidade física, incluindo escores de EDSS, força muscular e medidas de desempenho motor, mostrando que anormalidades estruturais do trato acompanham diferenças funcionais relevantes em pessoas com EM.[31,32] Outros autores relataram que mudanças microestruturais do TCE se relacionam a alterações de excitabilidade cortical e a medidas de estabilidade da marcha, inclusive em indivíduos clinicamente estáveis, indicando que essa via pode refletir comprometimentos que não são detectados por avaliações motoras convencionais.[33,34] Esses achados sugerem que o TCE é sensível a diferenças funcionais que podem surgir mesmo quando a capacidade de deambulação permanece preservada.

3.4 Análise estatística

3.4.1 Análise estatística baseada em tratos

Após o pré-processamento e a projeção dos dados no esqueleto médio da substância branca, as comparações estatísticas *voxelwise* foram realizadas

utilizando a ferramenta Randomise, disponível no FSL (https://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslwiki/Randomise/UserGuide).

Foram realizadas 10000 permutações aleatórias para cada contraste de interesse. Foram avaliados os contrastes pacientes>controles e controles>pacientes, com correção *threshold-free cluster enhancement* (TFCE). Este método assegura que os *clusters* detectados são robustos e independentes de um limiar pré-estabelecido, aumentando a confiança nos resultados e a sensibilidade da análise.

Além disso, foi aplicada a correção *family-wise error rate* (FWE) para múltiplas comparações, com um nível de significância global estabelecido em $p < 0,01$. Essa correção é fundamental em análises *voxelwise* de neuroimagem, nas quais o número de comparações simultâneas é extremamente elevado, reduzindo a probabilidade de obter um ou mais falsos positivos (erros tipo I).

A adoção de limiares estatísticos mais rigorosos, como $p < 0,01$, é uma prática amplamente utilizada em estudos de neuroimagem que empregam a técnica de TBSS, especialmente quando aplicadas correções para múltiplas comparações como TFCE e FWE. Essa abordagem está descrita em referências clássicas da área,[67,111-113] sendo recomendada para garantir maior robustez e confiabilidade aos achados, particularmente em análises de alta dimensionalidade, como as *voxelwise*. Dessa forma, os *clusters* considerados significativos são menos propensos a representar artefatos estatísticos e mais provavelmente refletem diferenças microestruturais verdadeiras entre os grupos analisados.

No presente estudo, a adoção desse critério foi ainda mais relevante em função do tamanho amostral reduzido e do perfil clínico dos pacientes incluídos, que apresentavam baixa pontuação na escala EDSS. A avaliação de indivíduos com baixa incapacidade clínica pode resultar em alterações microestruturais mais sutis, o que demanda uma abordagem estatística mais criteriosa para assegurar que os achados reflitam diferenças biologicamente relevantes, minimizando a possibilidade de interpretações espúrias.

As análises foram realizadas inicialmente nos mapas de FA, projetados no esqueleto médio da substância branca durante a etapa *tbss_4_prestats*. Posteriormente, as demais métricas de difusão – AD, RD e MD – foram analisadas utilizando a função *tbss_non_FA*, garantindo consistência metodológica em todas as comparações realizadas.

A documentação técnica detalhada dos métodos TBSS e *Randomise* está disponível nos guias oficiais do FSL (https://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslwiki/TBSS/UserGuide).

3.4.1.1 Substância branca de aparência normal

Em análises *voxel* a *voxel* com o *randomise*, a presença de regiões anatômicas ausentes, alteradas ou lesadas de forma heterogênea entre participantes pode introduzir vieses estatísticos, já que esses *voxels* não são diretamente comparáveis entre indivíduos. Para lidar com essa variabilidade inter-sujeitos, foi utilizada a ferramenta *setup_masks*, conforme implementada no FSL (https://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/docs/statistics/randomise.html?h=randomise).

Esse módulo recebe, para cada participante, uma máscara binária indicando *voxels* a serem excluídos ou ajustados (por exemplo, regiões de lesão ou artefatos localizados). A partir dessas máscaras, o *setup_masks* gera regressões *voxelwise* específicas por sujeito, posteriormente incorporadas ao *design matrix* como *nuisance regressors*.

O *design* resultante mantém os regressores originais (por exemplo, grupo, idade), mas inclui colunas adicionais derivadas das máscaras, de modo a reduzir a influência que *voxels* inválidos de um sujeito poderiam exercer nos testes estatísticos envolvendo os demais. Com isso, a análise tende a ficar mais restrita a *voxels* efetivamente comparáveis entre participantes, buscando minimizar efeitos espúrios decorrentes da variabilidade anatômica não uniforme.

O procedimento pressupõe que as máscaras sejam binárias, contendo valor 1 nos *voxels* a serem excluídos (como *voxels* lesados) e 0 nos demais, além de estarem no mesmo espaço da imagem usada no *randomise*. No presente projeto, as máscaras de lesão originalmente definidas no espaço T1 de cada sujeito foram alinhadas ao espaço de difusão utilizando os mesmos *warps* obtidos no *tbss_2_reg*. Dessa forma, quando o comando *randomise* é executado, o FSL modela esses *voxels* como efeitos de confusão específicos por sujeito, de modo que sua influência estatística é ignorada nas comparações entre participantes — sem misturar exclusões entre participantes.

3.4.1.2 Análise complementar: verificação da distribuição dos valores individuais nas regiões significativas

Após a identificação de regiões estatisticamente significativas na análise *voxelwise* do TBSS (com correção para múltiplas comparações via TFCE, $p < 0,01$), foi realizada uma etapa adicional com o objetivo de verificar a distribuição dos valores individuais dentro dessas regiões.

Embora o teste não paramétrico com permutações utilizado pelo randomise seja robusto à presença de valores extremos, optou-se por inspecionar os dados individualmente para assegurar que os efeitos observados não estivessem sendo desproporcionalmente influenciados por um pequeno número de participantes.

Para isso, os *voxels* que atingiram significância estatística foram convertidos em uma máscara binária correspondente à região mais extensa de efeito significativo (*cluster* com maior número de *voxels*). Essa máscara foi então aplicada ao respectivo arquivo *skeletonised* da métrica analisada, no qual cada volume representa um participante. A partir dessa região, foi extraída, para cada sujeito, a mediana da métrica de difusão.

A escolha da mediana se deve à sua menor sensibilidade a valores extremos, permitindo uma avaliação mais estável da distribuição dos dados. Os valores individuais obtidos foram utilizados exclusivamente para construção de boxplots com representação de cada participante, possibilitando inspeção visual da dispersão e identificação de possíveis outliers.

Essa verificação foi realizada apenas para métricas e contrastes que apresentaram resultados estatisticamente significativos, tanto na análise TBSS padrão quanto na análise TBSS com mascaramento de lesões (NAWM). A inferência estatística permaneceu baseada na análise *voxelwise* conduzida pelo randomise com TFCE.

3.4.2 Análises de região de interesse e de correlação

Os valores médios das métricas de difusão – FA, AD, RD e MD – extraídas de cada ROI foram medidas de ambos os hemisférios cerebrais, sendo calculada a média entre eles.

Para investigar a relação entre o grau de incapacidade clínica e as métricas derivadas do DTI, foi conduzida uma análise de correlação considerando apenas o Grupo EM. Inicialmente foi avaliada a possibilidade de utilizar regressão linear para modelar a relação entre as variáveis. Contudo, os diagnósticos dos modelos indicaram violação sistemática dos pressupostos necessários (normalidade dos resíduos, homocedasticidade e ausência de pontos influentes), o que inviabilizaria a interpretação dos coeficientes. Diante disso, foi optado pelo uso da correlação de Spearman, que não assume distribuição normal e é apropriada para escalas ordinais como o EDSS.

Para cada ROI e cada métrica do DTI, calculamos o coeficiente de correlação de Spearman (ρ) e o respectivo p-valor. Para controlar o erro decorrente de múltiplas comparações, os p-valores foram ajustados pelo método de Benjamini–Hochberg para controle da *false discovery rate* (FDR). Todas as análises estatísticas foram realizadas em R (versão 4.5.1), utilizando scripts próprios desenvolvidos especificamente para este estudo.

3.4.3 Tractografia

As análises estatísticas foram conduzidas utilizando modelos lineares mistos (LMM - *linear mixed models*), pois cada participante contribui com medidas repetidas das métricas de difusão em função das três abordagens de tractografia (A1 – tractografia sem restrições por lesão, A2 – tractografia com exclusão de lesões individuais, A3 – tractografia com lesões virtuais em controles pareados). Dessa forma, as observações provenientes do mesmo indivíduo não podem ser consideradas independentes, o que violaria o pressuposto de um modelo linear tradicional. Para acomodar essa dependência intraindivíduo, os LMM incluíram indivíduo como efeito aleatório (intercepto aleatório por participante), enquanto os demais termos foram especificados como efeitos fixos.

O objetivo foi testar os efeitos fixos de grupo (Controles *versus* EM), abordagem de tractografia (A1, A2 e A3) e da interação grupo × abordagem sobre as métricas de difusão extraídas do TCE. Idade, sexo e o logaritmo do número de *voxels* do trato reconstruído (incluído para controlar diferenças no volume do feixe reconstruído entre indivíduos e entre abordagens; a transformação logarítmica foi aplicada por se tratar de uma variável positiva com distribuição assimétrica e potencialmente

influenciada por valores extremos, reduzindo a assimetria e a influência de outliers) foram incluídos como covariáveis. Assim, para cada métrica (FA, AD, MD e RD), o modelo geral pode ser representado como:

$$métrica \sim grupo * abordagem + idade + sexo + log(voxels) + (1 \mid indivíduo).$$

A significância dos efeitos principais e da interação foi avaliada via ANOVA do modelo misto, com testes F usando correção de Satterthwaite para os graus de liberdade. Comparações *post hoc* foram realizadas com *estimated marginal means* (emmeans), com correção de múltiplas comparações utilizando FDR. Adotou-se um nível de significância de α=0,05. Todas as análises estatísticas foram realizadas em R (versão 4.5.1), utilizando *scripts* próprios desenvolvidos especificamente para este estudo.

4 RESULTADOS

4.1 Características demográficas e clínicas dos participantes

Para assegurar maior comparabilidade entre os grupos e reduzir potenciais fatores de confusão, foi realizado pareamento 1:1 entre pacientes e controles com base em sexo biológico, idade e escolaridade. O balanceamento amostral reduz heterogeneidade intergrupo e variabilidade residual no modelo estatístico, aumentando a estabilidade das estimativas no GLM e a robustez das inferências baseadas em permutação no TBSS. Além disso, a padronização da amostra garantiu coerência metodológica entre as diferentes abordagens analíticas empregadas (*voxelwise*, ROI e tractografia), permitindo comparações mais consistentes entre os resultados.

Quatro controles foram excluídos (dois por ausência de imagens estruturais (T1 ou FLAIR), um por baixa qualidade na difusão e um por ausência de dados demográficos completos), resultando em 20 controles elegíveis. No Grupo EM, três participantes foram excluídos (dois por ausência de imagens estruturais e um por ausência de EDSS). Nenhum participante foi excluído por artefatos relevantes na imagem estrutural.

Como o desenho do estudo previa pareamento individual 1:1, o Grupo Controle determinou o tamanho final da amostra analisada, que foi composta por 20 pacientes com EM e 20 controles saudáveis. As características demográficas e clínicas encontram-se detalhadas na tabela 2.

A escolaridade foi codificada em duas categorias, considerando a equivalência funcional entre níveis próximos do ponto de vista sociocognitivo. Assim, “Ensino médio completo” e “Ensino médio incompleto” foram agrupados em um único nível (Grupo 0), enquanto “Ensino superior completo” e “Pós-graduação” constituíram a segunda categoria (Grupo 1).

Tabela 2. Descrição da amostra após pareamento entre grupos

Características	Controle	EM	Valor-p
Nº de sujeitos	20	20	-
Sexo (M/F)	3/17	3/17	1,0**
Idade (média [DP], intervalo)	35,2 (7,8); 24-50	35,2 (6,3); 23-46	0,983*
Escolaridade (Grupo 0, Grupo 1)	0,20	3,17	0,231*
EDSS (mediana, intervalo)	-	1.5 (0-3,5)	-
Anos de doença (mediana, intervalo)	-	1,94 (0,24-8,06)	-

*teste *t* independente; **teste exato de Fisher; DP: desvio padrão; EDSS: *Expanded Disability Status Scale*; EM: esclerose múltipla; F: feminino; M: masculino.

4.2 Máscara de lesão

Após a validação das segmentações pelo neurorradiologista responsável, observou-se que alguns participantes do Grupo Controle apresentavam pequenas hiperintensidades da substância branca. Tais achados foram classificados como alterações microvasculares relacionadas à idade e foram considerados compatíveis com o envelhecimento cerebral normal, não representando qualquer processo patológico neurológico. Assim, embora tenham sido detectadas pelo *pipeline* automatizado de segmentação, foram aceitas como parte da variabilidade estrutural normal do Grupo Controle.

Não foram necessárias correções manuais nas segmentações do Grupo Controle. No Grupo EM, a segmentação automática apresentou boa concordância com a inspeção visual, identificando aproximadamente 80–90% das lesões. As discrepâncias ocorreram principalmente em lesões justacorticais e em lesões pequenas, próximas ao limiar de 3 mm, que tenderam a ser subsegmentadas ou não detectadas. Nas correções manuais, nenhuma lesão previamente segmentada precisou ser removida; foram realizados apenas acréscimos de lesões não incluídas automaticamente.

4.2.1 Caracterização espacial das lesões

Foi gerado um mapa de probabilidade espacial das lesões no espaço MNI para fins descritivos. Observou-se maior concentração de lesões em regiões periventriculares e na substância branca profunda, padrão compatível com a topografia clássica da EM. As imagens correspondentes aos mapas de probabilidade dos pacientes e controles são apresentadas no apêndice 2.

4.3 Pré-processamento: extração de cérebro

Durante o controle de qualidade visual individual da extração cerebral, observou-se que, em alguns casos, os parâmetros padrão do BET não resultaram em separação adequada entre tecido cerebral e não cerebral. Nesses casos, ajustes pontuais foram realizados. Em cinco participantes, o limiar de intensidade fracionada foi ajustado para f = 0,25. Em sete participantes, o gradiente vertical foi ajustado para g = 0,07, e em oito participantes para g = 0,10. Após esses ajustes, todas as extrações cerebrais foram consideradas adequadas para as etapas subsequentes do processamento.

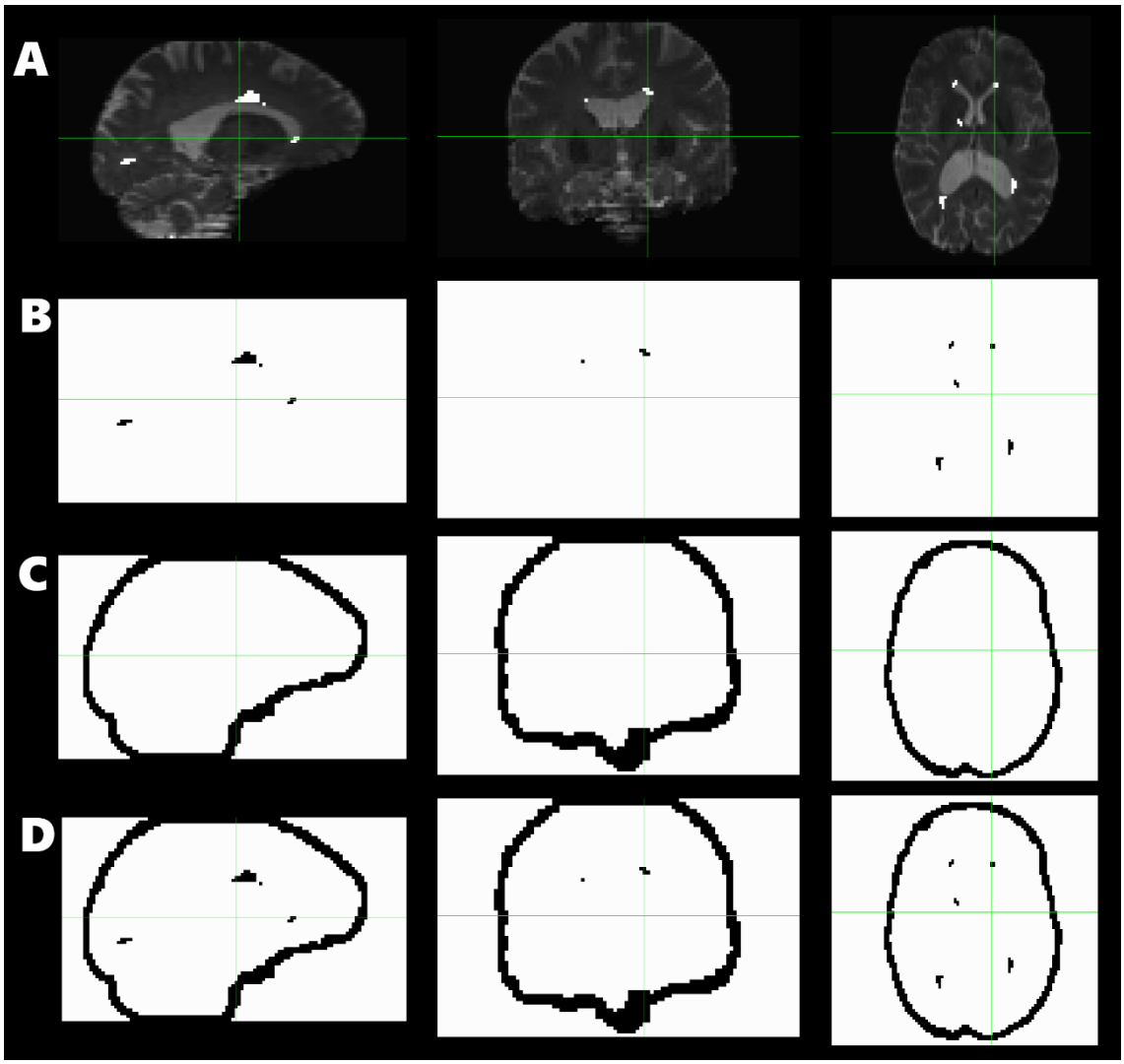
4.4 *Tract-based spatial statistics*

4.4.1 Ilustração do *pipeline*

Com o objetivo de ilustrar o procedimento de exclusão das lesões nas análises baseadas em TBSS e facilitar a compreensão do *pipeline*, a figura 5 apresenta o exemplo de um sujeito, incluindo as máscaras utilizadas em cada etapa.

Inicialmente, foi considerada a máscara binária de lesão obtida pelo *DeepLesionBrain* (Figura 5A), já registrada para o espaço de difusão do sujeito, na qual *voxels* com valor 1 representam tecido lesionado (branco) e *voxels* com valor 0 representam tecido não lesionado (preto). Em seguida, essa máscara foi invertida (Figura 5B), de modo que os valores passaram a representar exclusivamente tecido não lesionado (1 = branco) e áreas de lesão (0 = preto). A figura 5C apresenta a máscara

padrão **_FA_mask* gerada automaticamente pelo comando *tbss_1_preproc*, correspondente à máscara cerebral da FA. Por fim, a figura 5D mostra a máscara resultante da interseção lógica entre a máscara cerebral do TBSS e a máscara invertida de lesão, ambas no espaço de difusão do sujeito. Nessa máscara final, *voxels* com valor 1 (branco) correspondem a tecido cerebral não lesionado, enquanto *voxels* com valor 0 (preto) incluem tanto regiões extracerebrais quanto áreas de lesão. Essa máscara foi utilizada para substituir o arquivo padrão **_FA_mask* na pasta de entrada do TBSS, garantindo que as regiões lesionadas fossem excluídas das etapas subsequentes de registro não linear e projeção do esqueleto.



(A) Máscara de lesão obtida pelo DeepLesionBrain; (B) Máscara de lesão invertida; (C) Máscara cerebral padrão (**_FA_mask*) gerada pelo comando tbss_1_preproc; (D) Máscara final obtida pela interseção entre a máscara cerebral e a máscara de lesão invertida, utilizada para substituir a máscara original no TBSS. Todas as imagens estão no espaço de difusão do sujeito e foram visualizadas nas mesmas coordenadas.

Figura 5. Exemplo das máscaras utilizadas no *pipeline* de TBSS com exclusão de lesões em um sujeito

4.4.2 Resultados da análise espacial de tratos

A análise dos dados de DTI através do TBSS revelou diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros de FA e RD entre os pacientes com EM com baixo comprometimento e os controles saudáveis para ambas as abordagens (sem e com mascaramento de lesão). As análises *voxelwise* foram conduzidas utilizando a ferramenta *Randomise* do FSL, com aplicação das correções TFCE e FWR. O nível de significância adotado foi $p < 0,01$.

Os resultados estão organizados de acordo com cada métrica de difusão analisada (com e sem mascaramento), detalhando as regiões cerebrais em que foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

As informações quantitativas da análise *voxelwise* estão apresentadas nas tabelas 3, 4, 5 e 6 que descrevem os *clusters* significativos identificados para as métricas de FA e RD, respectivamente.

As tabelas estão organizadas por *cluster* (do maior para o menor), e a coluna "*Voxels*" indica o número de *voxels* que compõem cada *cluster*, ou seja, sua extensão espacial no espaço padrão do TBSS. Como os resultados estão no *template* FMRIB58 com *voxels* isotrópicos de 1 × 1 × 1 mm (pixdim = 1 mm), esse valor corresponde diretamente ao volume do *cluster* em mm³ (1 *voxel* = 1 mm³).

A coluna "valor-p" refere-se ao p-valor corrigido por múltiplas comparações (TFCE), obtido a partir das saídas do *randomise*, nas quais os mapas corrigidos (corrp) são gerados, por padrão, como $1 - p$ (MAX *stats*); assim, para facilitar a interpretação, repostamos o p-valor como $p = 1 - corrp$.

As coordenadas máximas (MAX) indicam a localização do *voxel* com o maior valor estatístico dentro do *cluster*, representando o ponto de maior significância entre os grupos analisados. O centro de gravidade (COG) corresponde à média ponderada das coordenadas de todos os *voxels* significativos que compõem o *cluster*, oferecendo uma representação anatômica central da sua extensão.

Para a abordagem sem mascaramento de lesão, foram encontrados quatro *clusters* significativos, dos quais três apresentaram redução nos valores de FA nos pacientes e um, apresentou aumento nos valores de RD dos pacientes. Não foram observadas diferenças significativas nas métricas de AD e MD.

Já para a abordagem com mascaramento, foram encontrados sete *clusters* significativos, dos quais três apresentaram redução nos valores de FA nos pacientes e quatro apresentaram aumento nos valores de RD dos pacientes. Também não foram observadas diferenças significativas nas métricas de AD e MD.

4.4.2.1 Anisotropia fracionada

4.4.2.1.1 Sem mascaramento de lesão

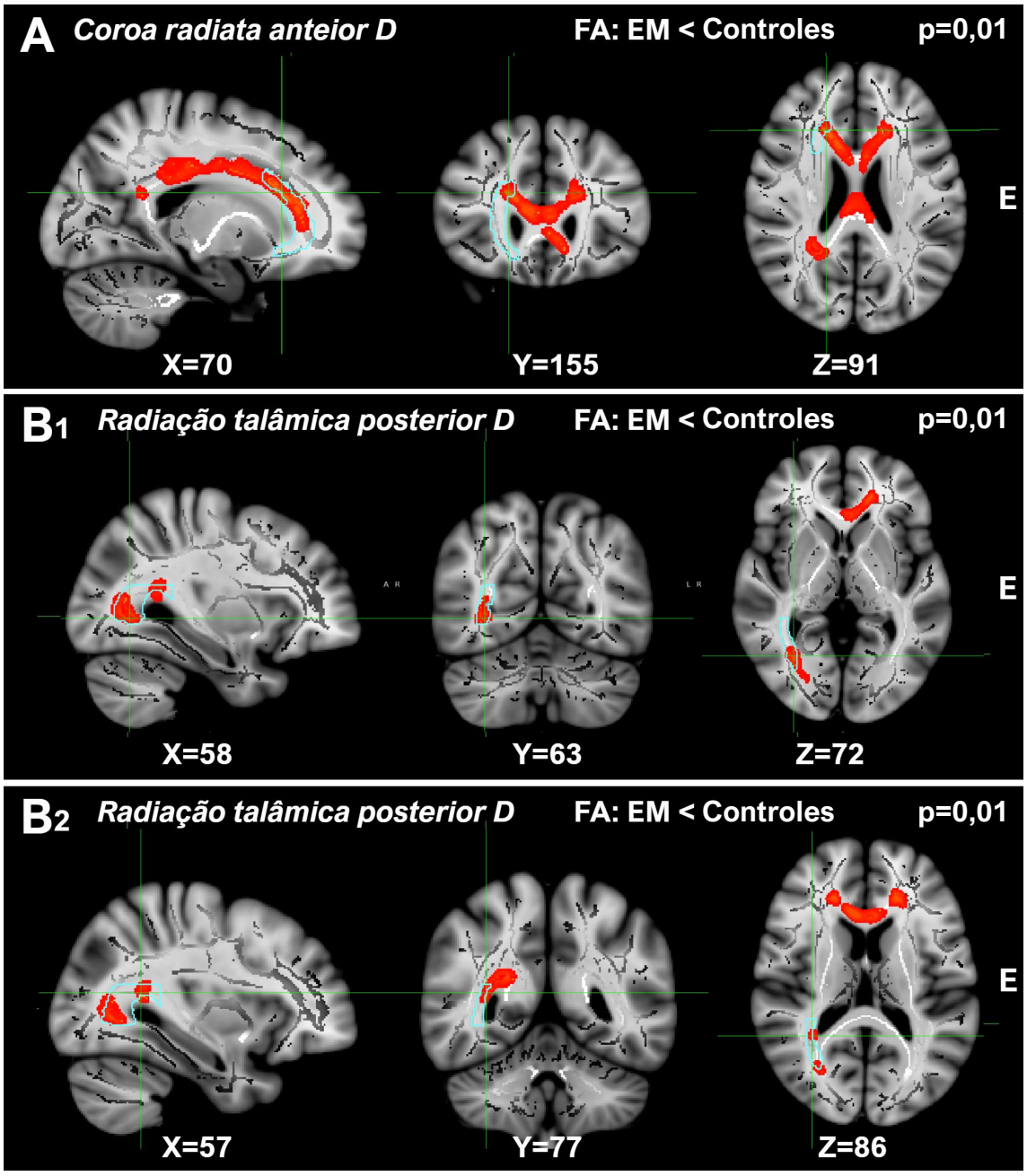
A análise revelou três *clusters* significativos de redução na FA dos pacientes em comparação aos controles saudáveis. Essa alteração foi identificada na coroa radiata anterior direita (ACR – *anterior corona radiata*), com volume de 4345 *voxels* e na radiação talâmica posterior (incluindo a região da radiação óptica), com dois *clusters* significativos com 304 e 223 *voxels*, respectivamente. As informações detalhadas, incluindo as coordenadas máximas, o COG, o valor-p e o número de *voxels*, estão apresentadas na tabela 3.

A figura 6 apresenta o mapa estatístico das regiões com redução de FA ($p < 0,01$), evidenciando a localização dos *clusters* significativos na ACR direita (A) e na radiação talâmica posterior (B) destacados em vermelho. Para nomeação das regiões, foi utilizado o *JHU White-Matter Tractography Atlas*.[103]

Tabela 3. Regiões com redução significativa de anisotropia fracionada em pacientes com esclerose múltipla na abordagem *voxelwise* sem mascaramento de lesão

***Cluster* Index**	***Voxels***	**Valor-p**	**MAX X**	**MAX Y**	**MAX Z**	**COG X**	**COG Y**	**COG Z**	**Região**
1	4345	0,003	70	155	91	90,9	134	95,3	Coroa radiata anterior direita
2	304	0,008	58	63	72	60,4	56,6	76,2	Radiação talâmica posterior direita
3	223	0,009	57	77	86	63,1	78,6	92,8	Radiação talâmica posterior direita

Localização dos *clusters* estatisticamente significativos para redução de FA ($p < 0,01$) em pacientes com esclerose múltipla comparados a controles saudáveis. Os valores listados incluem o número de *voxels*, o valor-p corrigido para múltiplas comparações, as coordenadas máximas (MAX X, Y, Z) e o centro de gravidade (COG X, Y, Z). As identificações foram realizadas com base no *JHU White-Matter Tractography Atlas*.



Os *clusters* estão localizados (A) na coroa radiata anterior direita e (B1 e B2) na radiação talâmica posterior direita (p<0,01, corrigido por TFCE). A identificação da região foi realizada com base no JHU *White-Matter Tractography Atlas*, cuja correspondência anatômica foi contornada em azul. EM: esclerose múltipla; D: direita; FA: anisotropia fracionada; TFCE: *threshold-free cluster enhancement*. EM: esclerose múltipla; D: direita; FA: anisotropia fracionada; TFCE: *threshold-free cluster enhancement*.

Figura 6. Mapa estatístico das regiões com redução significativa de anisotropia fracionada em pacientes com esclerose em comparação aos controles saudáveis sem mascaramento de lesão

4.4.2.1.2 Com mascaramento de lesão

A análise revelou três *clusters* significativos de redução na FA dos pacientes em comparação aos controles saudáveis. Essa alteração foi identificada no

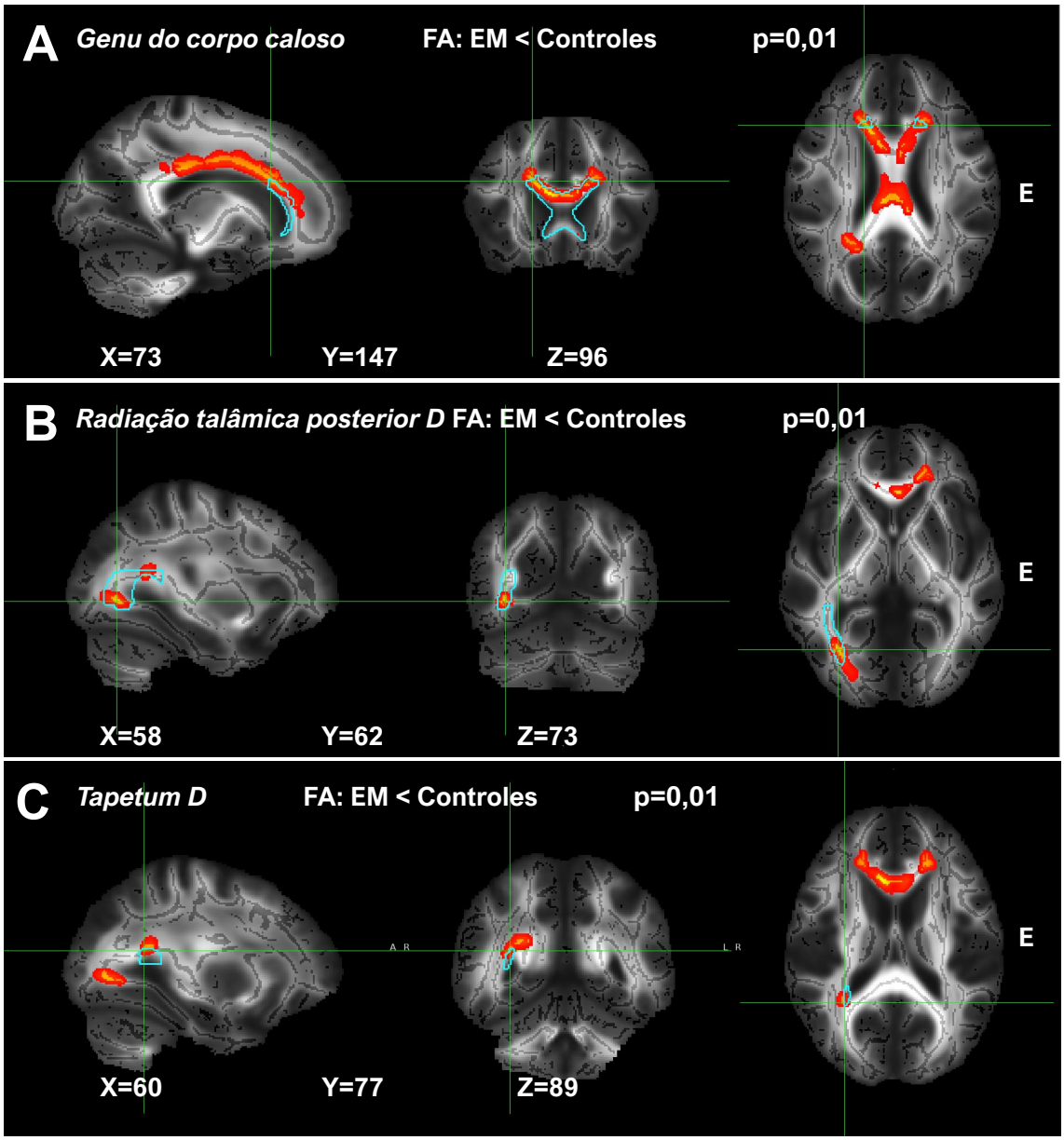
genu do corpo caloso, com volume de 3.828 *voxels*, na parte posterior da radiação talâmica (incluindo a região da radiação óptica), com volume de 205 *voxels* e na região do tapetum, com 148 *voxels*. As informações detalhadas, incluindo as coordenadas máximas, o centro de gravidade, o valor-p *e* o número de *voxels*, estão apresentadas na tabela 4.

A figura 7 apresenta o mapa estatístico das regiões com redução de FA ($p < 0,01$), evidenciando a localização dos *clusters* significativos no genu do corpo caloso (A), na radiação talâmica posterior (B) e no tapetum (C) destacados em vermelho. Para nomeação das regiões, foi utilizado o *JHU White-Matter Tractography Atlas*.[103]

Tabela 4. Regiões com redução significativa de anisotropia fracionada em pacientes com esclerose múltipla na abordagem *voxelwise* com mascaramento de lesão

***Cluster* Index**	***Voxels***	**Valor-p**	**MAX X**	**MAX Y**	**MAX Z**	**COG X**	**COG Y**	**COG Z**	**Região**
1	3828	0,004	73	147	96	91,3	34	95,6	Genu do corpo caloso
2	205	0,009	58	62	73	60,7	56	74,5	Radiação talâmica posterior direita
3	148	0,009	60	77	89	63,4	78,2	93,3	Tapetum direito

Localização dos *clusters* estatisticamente significativos para redução de FA ($p < 0,01$) em pacientes com esclerose múltipla comparados a controles saudáveis. Os valores listados incluem o número de *voxels*, o valor-p corrigido para múltiplas comparações, as coordenadas máximas (MAX X, Y, Z) e o centro de gravidade (COG X, Y, Z). As identificações foram realizadas com base no *JHU White-Matter Tractography Atlas*.



Os *clusters* estão localizados (A) na coroa radiata anterior direita, (B) na radiação talâmica posterior direita e (C) no *tapetum* direito (p<0,01, corrigido por TFCE). A identificação da região foi realizada com base no JHU *White-Matter Tractography Atlas,* cuja correspondência anatômica foi contornada em azul. EM: esclerose múltipla; D: direita; FA: anisotropia fracionada; TFCE: *threshold-free cluster enhancement*.

Figura 7. Mapa estatístico das regiões com redução significativa de FA em pacientes com EM em comparação aos controles saudáveis com mascaramento de lesão

4.4.2.2 Difusividade radial

4.4.2.2.1 Sem mascaramento de lesão

Foi identificado um *cluster* com aumento significativo na RD em pacientes com EM em comparação aos Controles, na região do genu do corpo caloso.

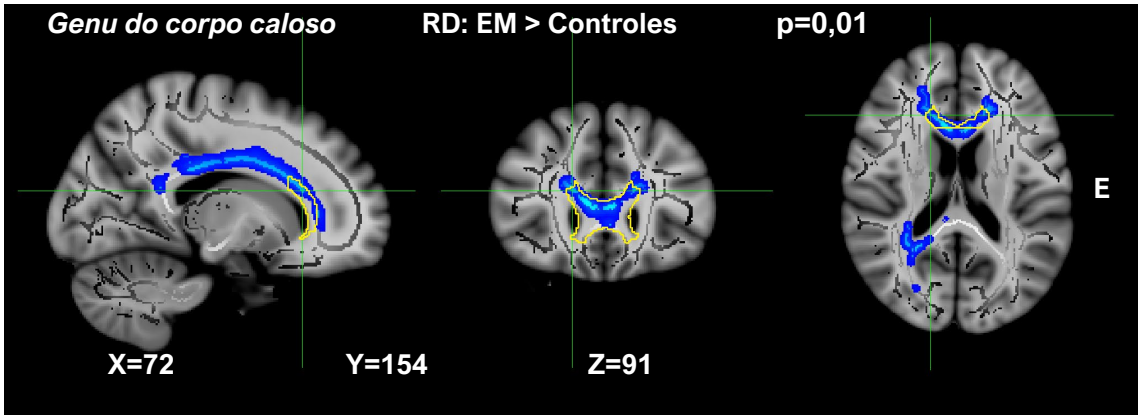
As informações detalhadas, incluindo as coordenadas máximas, o centro de gravidade, o valor-p e o número de *voxels*, estão apresentadas na tabela 5.

A figura 8 exibe os mapas estatísticos correspondentes ao aumento de RD, com o *cluster* destacado em azul. Para nomeação das regiões, foi utilizado o *JHU White-Matter Tractography Atlas*.[103]

Tabela 5. Regiões com aumento significativa de difusividade radial em pacientes com esclerose múltipla na abordagem *voxelwise* sem mascaramento de lesão

***Cluster* Index**	***Voxels***	**Valor-p**	**MAX X**	**MAX Y**	**MAX Z**	**COG X**	**COG Y**	**COG Z**	**Região**
1	5.870	0,007	72	154	91	84	118	94,7	Genu do corpo caloso

Localização do *cluster* estatisticamente significativo para aumento de RD (p < 0,01) em pacientes com esclerose múltipla comparados a controles saudáveis sem mascaramento de lesão. Os valores listados incluem o número de *voxels*, o valor-p corrigido para múltiplas comparações, as coordenadas máximas (MAX X, Y, Z) e o centro de gravidade (COG X, Y, Z). As identificações foram realizadas com base no *JHU White-Matter Tractography Atlas*.



A região identificada inclui o genu do corpo caloso. A nomeação das regiões foi realizada com base no JHU *White-Matter Tractography Atlas* (p<0,01, corrigido por TFCE), cuja correspondência anatômica foi contornada em amarelo. EM: esclerose múltipla; RD: difusividade radial; TFCE: *threshold-free cluster enhancement*.
Figura 8. Mapa estatístico da região com aumento significativo de RD em pacientes com EM em comparação aos controles saudáveis sem mascaramento de lesão

4.4.2.2.2 Com mascaramento de lesão

Foi identificado dois *clusters* com aumento significativo na RD em pacientes com EM em comparação aos controles, na região ACR direita e esquerda, com 5.070 e 190 *voxels*, respectivamente. Os outros *clusters* foram formados por um agrupamento muito pequeno de *voxels* (<9) na parte posterior da coroa radiata direita

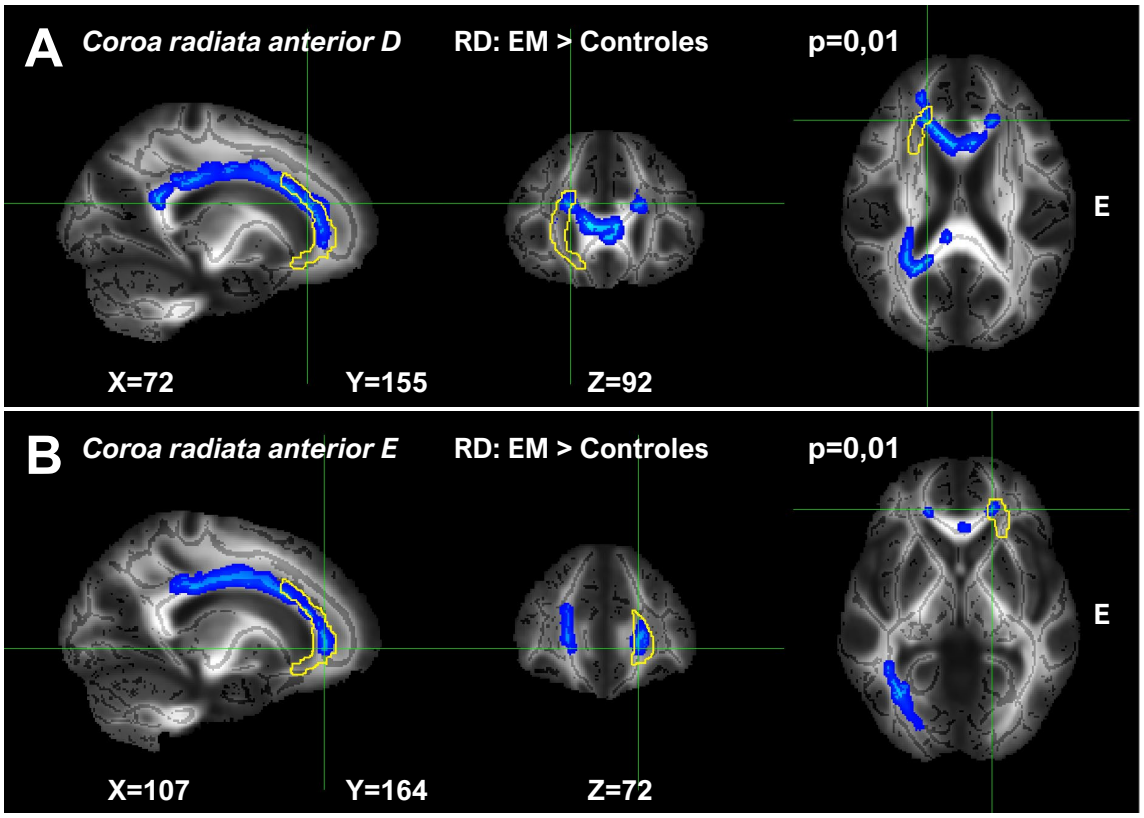
(PCR - *posterior corona radiata*) e em uma região não-classificada, por isso foram desconsiderados na discussão. As informações detalhadas, incluindo as coordenadas máximas, o centro de gravidade, o valor-p e o número de *voxels*, estão apresentadas na tabela 6.

A figura 9 exibe os mapas estatísticos correspondentes ao aumento de RD nos dois primeiros *clusters*, destacado em azul. Para nomeação das regiões, foi utilizado o *JHU White-Matter Tractography Atlas*.[103]

Tabela 6. Regiões com aumento significativa de difusividade radial em pacientes com esclerose múltipla na abordagem *voxelwise* com mascaramento de lesão

***Cluster* Index**	***Voxels***	**Valor-p**	**MAX X**	**MAX Y**	**MAX Z**	**COG X**	**COG Y**	**COG Z**	**Região**
1	5070	0,006	72	155	92	80,8	115	95,7	Genu do corpo caloso
2	190	0,009	107	164	72	108	161	81,2	Coroa radiata anterior esquerda
3	9	0,01	62	80	99	61,4	80,9	99,6	Radiação talâmica posterior direita
4	1	0,01	64	46	83	64	46	83	Tapetum direito

Localização dos *clusters* estatisticamente significativos para aumento de RD ($p < 0,01$) em pacientes com esclerose múltipla comparados a controles saudáveis com mascaramento de lesão. Os valores listados incluem o número de *voxels*, o valor p corrigido para múltiplas comparações, as coordenadas máximas (MAX X, Y, Z) e o centro de gravidade (COG X, Y, Z). As identificações foram realizadas com base no *JHU White-Matter Tractography Atlas*.



Os *cluster*s estão localizados (A) na coroa radiata anterior direita e (B) esquerda (p<0,01, corrigido por TFCE). A nomeação das regiões foi realizada com base no JHU *White-Matter Tractography Atlas*, cujas correspondências anatômicas foram contornadas em amarelo. D: direita; E: esquerda; EM: esclerose múltipla; RD: difusividade radial; TFCE: *threshold-free cluster enhancement*.

Figura 9. Mapa estatístico da região com aumento significativo de RD em pacientes com EM em comparação aos controles saudáveis sem mascaramento de lesão

4.4.2.3 Demais métricas de difusão

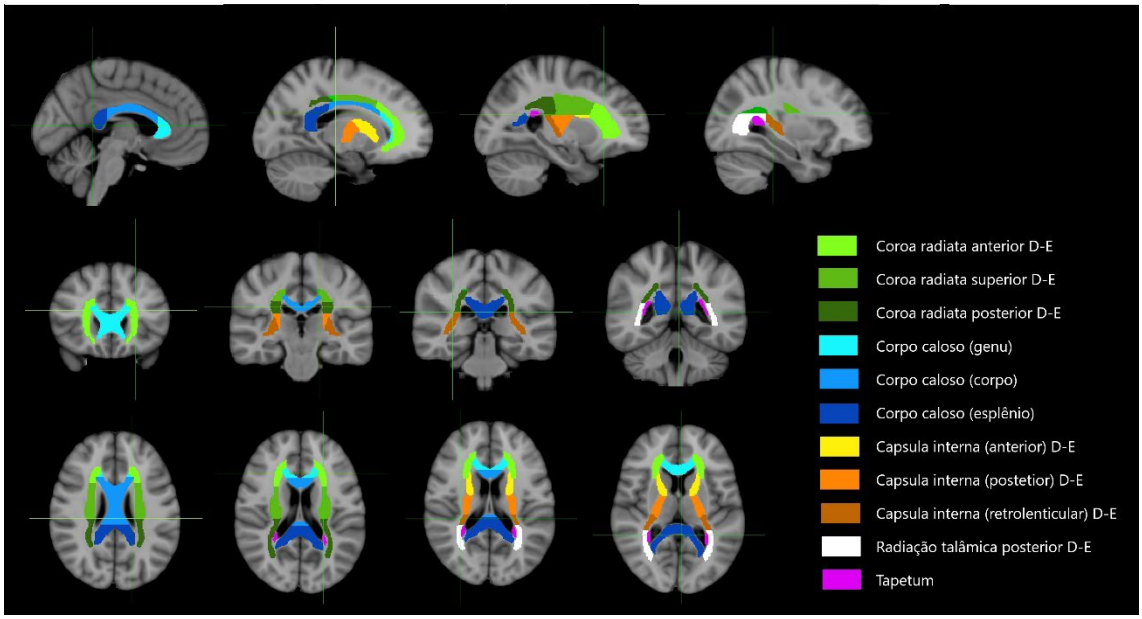
As análises dos parâmetros de AD e MD revelaram diferenças estatisticamente significativas apenas com um nível de significância de $p < 0,05$ para ambas as abordagens. Análises complementares de FA e RD aplicando o mesmo limiar de $p < 0,05$ resultaram em um número substancialmente maior de *clusters* significativos. Contudo, tais resultados foram considerados exploratórios e secundários, uma vez que o aumento no número de regiões com significância estatística poderia dificultar a interpretação dos achados e introduzir riscos de análises especulativas. Para assegurar maior rigor metodológico e foco nos resultados mais robustos, a presente análise priorizou os achados com $p < 0,01$, detalhados nas seções anteriores.

4.4.3 Análise complementar: distribuição dos valores

Com o objetivo de verificar a distribuição dos valores individuais nas regiões que apresentaram significância estatística no TBSS, foram construídos *boxplots* a partir da mediana da métrica de difusão extraída nessas regiões. Essa verificação foi realizada tanto para o TBSS padrão quanto para a análise com mascaramento de lesões (NAWM). Os gráficos correspondentes encontram-se apresentados no apêndice 3.

4.5 Análise por região de interesse e correlação

A figura 10 mostra todos as ROIs incluídas para análise neste estudo. As subdivisões pertencentes a uma mesma estrutura anatômica foram representadas por uma cor comum, diferenciadas apenas por variações de tonalidade. Assim, cada conjunto de sub-regiões mantém coerência visual, facilitando a identificação da estrutura principal no mapa espacial.



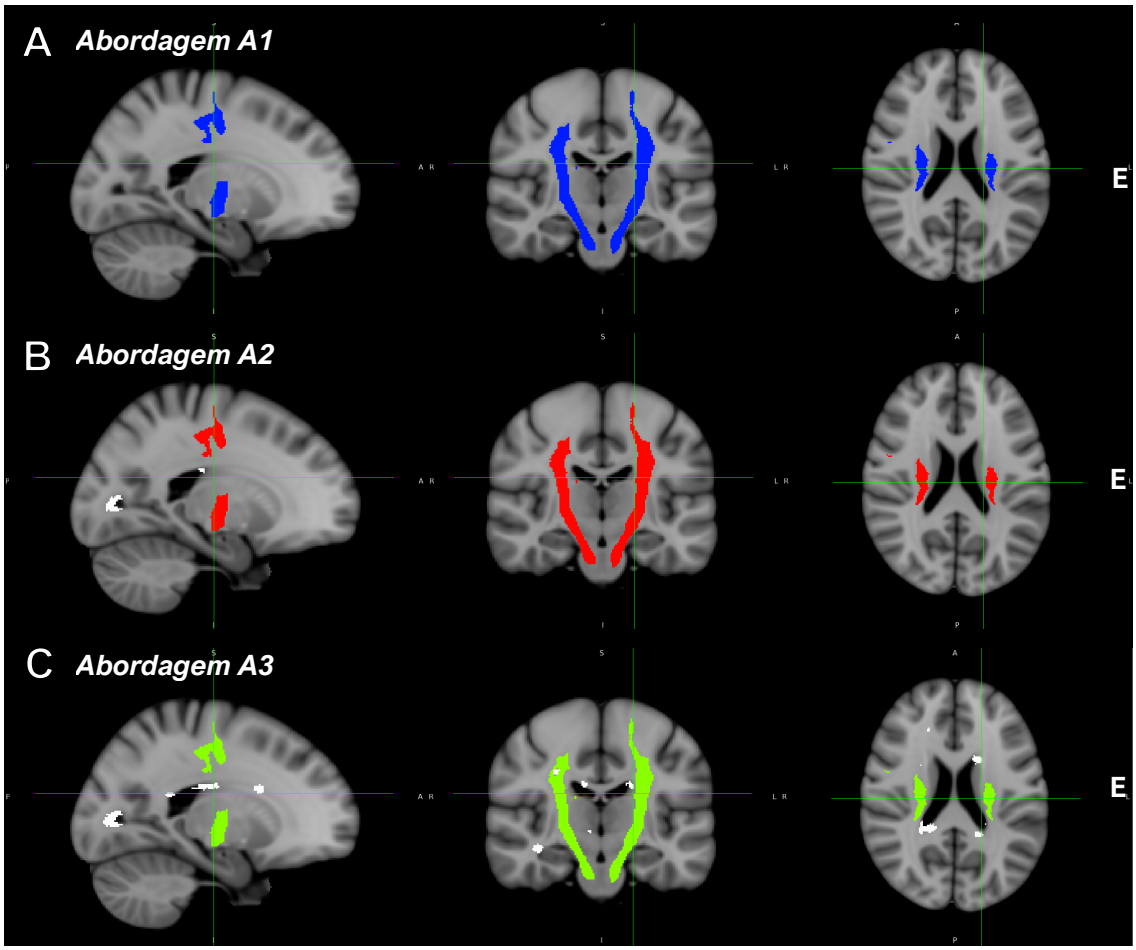
Os *cluster*s estão localizados (A) na coroa radiata anterior direita e (B) esquerda (p<0,01, corrigido por TFCE). A nomeação das regiões foi realizada com base no JHU *White-Matter Tractography Atlas*. D: direita; E: esquerda; EM: esclerose múltipla; RD: difusividade radial; TFCE: *threshold-free cluster enhancement*.
Figura 10. Regiões de interesse projetadas no espaço MNI

A análise de correlação entre o EDSS e as métricas do DTI nas 11 ROIs não revelou associações significativas após correção para múltiplas comparações (FDR). Os coeficientes de Spearman apresentaram magnitudes baixas (ρ variando entre –0,25 e 0,22), sem padrão consistente entre as métricas ou entre as diferentes ROIs.

Apesar da ausência de correlações estatisticamente significativas, foram gerados gráficos de dispersão (EDSS × métrica) para todas as combinações ROI × métrica, visando ilustrar visualmente os padrões individuais, foram disponibilizadas no apêndice 4. Nenhum dos painéis sugeriu tendências de aumento ou redução das métricas com o EDSS nesta amostra de pacientes com baixo comprometimento clínico.

4.6 Tractografia

A figura 11 mostra um exemplo da reconstrução do TCE em um controle representativo da amostra nas três abordagens de tractografia utilizadas no estudo. As reconstruções são apresentadas sobrepostas ao *template* MNI nas orientações coronal, axial e sagital. Em (A) observa-se a reconstrução do TCE sem restrições adicionais (A1), em (B) a reconstrução com exclusão das lesões do respectivo controle (A2), e em (C) a reconstrução com mascaramento virtual de lesões (A3) com as lesões do controle em questão somada às lesões do paciente pareado. Todos as imagens foram tiradas na mesma coordenada (X:109, Y:108, Z:93).



(A) Abordagem A1 - reconstrução sem restrições adicionais (tratos em azul); (B) Abordagem A2 - reconstrução com exclusão de lesões reais no rastreamento (tratos em vermelho, lesões do respectivo controle em branco); (C) Abordagem A3 - reconstrução com mascaramento virtual de lesões no controle pareado (tratos em verde, lesões virtuais em branco).
Figura 11. Reconstrução probabilística do trato corticoespinhal em um controle representativo da amostra nas três abordagens de tractografia

4.6.1 ANOVA

Foram ajustados modelos lineares mistos para investigar os efeitos de grupo (Controles *versus* EM), abordagem de tractografia (A1: sem restrição por lesão, A2: exclusão de lesão individual, A3: lesão virtual em controle pareado) e sua interação, sobre as métricas de difusão (AD, FA, MD, RD) extraídas do TCE. Idade, sexo e log(n_vox) foram incluídos como covariáveis, e participante foi modelado como efeito aleatório. Os resultados estão resumidos na tabela 7.

- Efeito de grupo (Controles *versus* EM): houve efeito significativo para AD ($p = 0,03$) e MD ($p = 0,04$). Não houve efeito significativo para FA nem RD ($p > 0,09$).

- Efeito de abordagem de tractografia (A1, A2, A3): houve efeito significativo para FA ($p = 1{,}16\times10^{-5}$), MD (p = 0,001) e RD (p = 0,0001). O efeito não foi significativo para AD (p = 0,26).

- Interação grupo *versus* abordagem: a interação foi significativa para todas as métricas: AD (p = 0,04), FA (p = 0,002), MD (p = 0,003), RD (p = 0,002).

Tabela 7. Valores-p da ANOVA (modelo misto) para efeitos de grupo, abordagem e grupo *versus* abordagem para cada métrica de difusão no trato córtico espinal

Métrica DTI	Grupo	Abordagem	Grupo *versus* Abordagem (interação)
AD	0,01*	0,26	0,04*
FA	0,27	$1{,}11\times10^{-5}$*	0,002*
MD	0,03*	0,001*	0,003*
RD	0,26	0,0001*	0,002*

As colunas correspondem ao valor-p do teste F associado ao termo do modelo. Grupo: comparou Controles *versus* EM; Abordagem: comparou abordagem 1 (sem máscara) *versus* abordagem 2 (sem lesão) *versus* abordagem 3 (controle virtual); Grupo × Abordagem: verificou se a diferença entre Controles e EM muda conforme a abordagem; *resultados significativos; AD: difusividade axial; EM: esclerose múltipla; FA: anisotropia fracionada; MD: difusividade média; RD: difusividade radial.

4.6.2 *Post hoc*: abordagem dentro de grupo

Testes *post hoc* (*emmeans*, FDR) foram utilizados para comparar as abordagens de tractografia dentro de cada grupo (Tabela 8). As métricas AD e MD não diferiram entre as abordagens em nenhum grupo (p > 0,23). Nos controles, FA e RD foram menores na A3 (mascaramento virtual de lesões) em comparação com A1 e A2 (FA: p = 0,018; RD: p = 0,025), sem diferença entre A1 e A2 (p > 0,96). Nos pacientes, nenhuma métrica apresentou diferença entre as abordagens (p > 0,26).

Tabela 8. Comparações entre abordagens (A1, A2 e A3) dentro de cada grupo (EM e Controles) para o trato corticoespinhal

Grupo	Métrica	Comparações entre abordagens	Valor-p corrigido
Controle	FA	A3 < A1, A3 < A2	0,018*
Controle	RD	A3 < A1, A3 < A2	0,025*
Controle	AD e MD	ns	
Paciente	Todas as métricas	ns	

AD: difusividade axial; EM: esclerose múltipla; FA: anisotropia fracionada; MD: difusividade média; RD: difusividade radial; ns = não significativo, p>0,05 após correção por *false discovery rate*. *resultados significativos.

4.6.3 *Post hoc*: grupo dentro da abordagem

As comparações *post hoc* entre grupos (Controle *versus* EM) dentro de cada abordagem (A1, A2 e A3), descritos na tabela 9, mostraram que as métricas AD e MD foram significativamente maiores nos pacientes em todas as abordagens (AD: p = 0,009 em A1; p = 0,014 em A2; p = 0,023 em A3 e MD: p = 0,0078 em A1; p = 0,018 em A2; p = 0,039 em A3). Para RD, foi observado diferença significativa apenas na abordagem A1 (p = 0,034), com tendência na abordagem A2 (p = 0,070). Para FA, não foram observadas diferenças significativas entre grupos em nenhuma das abordagens (p > 0,75).

Tabela 9. Comparação entre grupos (Controle *versus* EM) em cada abordagem de tractografia (A1, A2 e A3) para o trato corticoespinhal

Métrica DTI	Abordagem	Estimate	Valor-p
AD	A1_total	$-4{,}14 \times 10^{-5}$	0,009*
	A2_noLesion	$-3{,}88 \times 10^{-5}$	0,014*
	A3_ctrlVirtual	$-3{,}58 \times 10^{-5}$	0,023*
FA	A1_total	$+6{,}74 \times 10^{-4}$	0,937
	A2_noLesion	$-5{,}03 \times 10^{-4}$	0,953
	A3_ctrlVirtual	$-2{,}52 \times 10^{-3}$	0,770
MD	A1_total	$-2{,}89 \times 10^{-5}$	0,0078*
	A2_noLesion	$-2{,}56 \times 10^{-5}$	0,018*
	A3_ctrlVirtual	$-2{,}19 \times 10^{-5}$	0,039*
RD	A1_total	$-2{,}30 \times 10^{-5}$	0,034*
	A2_noLesion	$-1{,}96 \times 10^{-5}$	0,070 (tendência)
	A3_ctrlVirtual	$-1{,}55 \times 10^{-5}$	0,146

Diferenças estimadas (Controle – Paciente). Valores negativos do *estimate* indicam que o Grupo EM apresenta valor maior que o Controle. Todos os valores-p apresentados foram corrigidos para múltiplas comparações utilizando *false discovery rate*. *valores estatisticamente significativos; A1_total: tractografia sem máscara; A2_noLesion: máscara real de lesão (EM e Controles pareados); A3_ctrlVirtual: mesma máscara, mas aplicada apenas aos Controles; AD: difusividade axial; EM: esclerose múltipla; FA: anisotropia fracionada; MD: difusividade média; RD: difusividade radial.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, investigamos alterações microestruturais da substância branca em pacientes com EM com baixo comprometimento clínico (EDSS 0–3,5), utilizando DTI. A análise foi conduzida por meio de duas abordagens complementares: o TBSS, que permite avaliação *voxelwise* de todo o esqueleto de substância branca, e a análise por ROIs, direcionada a tratos previamente implicados na fisiopatologia da EM. Adicionalmente, exploramos a associação entre as métricas de difusão e o grau de incapacidade funcional.

Os resultados obtidos por meio do TBSS evidenciaram alterações estatisticamente significativas em regiões específicas da substância branca. A inspeção da distribuição dos valores individuais nessas regiões — realizada para verificar a possível influência de valores extremos — não sugere que os efeitos observados sejam decorrentes de participantes isolados, reforçando a consistência e a robustez dos achados *voxelwise*.

5.1 Métricas do tensor por difusão

A FA quantifica o grau de anisotropia da difusão, isto é, o quanto a água tende a se movimentar preferencialmente em uma direção. É a métrica mais utilizada do DTI e estudos associam alterações dessa métrica a mudanças na coerência das fibras.[114,115] Na EM, a redução da FA é um dos achados mais consistentes. Diversos estudos mostram diminuição da FA não apenas em lesões, mas também em áreas de NAWM, e que isso poderia estar associado ao grau de incapacidade clínica.[70,116] Em análise histopatológica, Schmierer *et al.* demonstraram correlação entre redução de FA e perda de mielina em tecido cerebral de pacientes com EM.[117]

Por sua vez, a AD corresponde à difusividade ao longo do principal eixo do trato (λ1). Em modelos biológicos, o AD tem sido associado ao estado dos axônios; com sua redução acompanhando o aumento na degeneração axonal.[114,115]

Já a RD representa a difusividade média perpendicular ao eixo principal (λ2 e λ3) e estaria associada principalmente à mielinização. Por este motivo, o aumento da RD forneceria uma pista sobre o mecanismo da redução da FA.[26,114]

Por fim, a MD é a média das três difusividades e reflete o grau geral de liberdade das moléculas de água para se mover no tecido, sendo descrita como uma medida da magnitude total da difusão, influenciada pela densidade de membranas e alterações como edema ou necrose.[114,115] Entretanto, vale ressaltar que, apesar de sensíveis, nenhuma métrica é específica, podendo ser alteradas por diferentes mecanismos microestruturais. Por isso as análises devem sempre ser feitas com cautela.[118]

5.2 Coroa radiata

A coroa radiata é composta por fibras de projeção que conectam o córtex motor e sensorial a estruturas subcorticais, como tálamo, tronco encefálico e medula espinhal. Essas fibras se organizam em um arranjo em leque que se estende a partir da cápsula interna e, tradicionalmente, é dividida em porções anterior, superior e posterior. A porção anterior (ACR) contém majoritariamente fibras corticoespinais, fronto-pontinas, corticoestriatais e radiações talâmicas anteriores, estando envolvida no controle motor voluntário, planejamento motor e funções cognitivas superiores ligadas às áreas pré-frontais.[119-122]

No presente estudo, alterações na ACR foram identificadas em pacientes com baixa incapacidade clínica (EDSS ≤ 3,5), sugerindo envolvimento precoce dessa região funcionalmente crítica. Estudos com pacientes em estágios iniciais da doença já haviam apontado alterações microestruturais nessa região mesmo na ausência de lesões visíveis, reforçando esse achado.[98,123] Ainda assim, a coroa radiata costuma ser analisada de forma genérica ou agrupada a outros tratos, com pouca atenção às suas sub-regiões. Mesmo quando incluída na análise e apresentando resultados significativos, como no estudo de Bao *et al.*, a interpretação clínica ou fisiopatológica costuma ser limitada.[26] Embora compreensível, dado o grande número de regiões incluídas no delineamento, dificulta uma discussão aprofundada individual, reforça uma lacuna quanto à compreensão aprofundada tanto da coroa radiata como um todo quanto de suas subdivisões.

A relevância da ACR também é apontada por estudos que não utilizaram análise microestrutural. Kerbrat *et al.* investigaram a distribuição de lesões visíveis em T2 ao longo do TCE e identificaram maior frequência de lesões na coroa

radiata como um todo, e sugerem implicações funcionais relacionadas ao arranjo somatotópico das fibras nessa região.[99] De forma complementar, Dalton et al., utilizando mapas de probabilidade de lesão, analisaram pacientes cerca de 20 anos após o primeiro evento clínico sugestivo de EM e observaram associação entre maior incapacidade clínica (EDSS > 3) e a presença de lesões na cápsula interna e, em análise de regressão, na ACR esquerda.[124] Esses achados reforçam a necessidade de análises mais refinadas da coroa radiata, especialmente de suas sub-regiões, uma vez que diferentes porções (ainda que baseada em critérios anatômicos convencionais) podem conduzir fibras com destinos funcionais distintos, e lesões localizadas nessas áreas podem não apenas mascarar padrões topográficos relevantes, mas também contribuir para o comprometimento clínico cumulativo ao longo da evolução da doença.

Além de seu papel motor, há evidências de que a ACR também esteja envolvida em sintomas não motores. Bisecco et al. identificaram correlações negativas significativas entre a escala de severidade da fadiga (FSS - *fatigue severity scale*), e a FA em diversas regiões da NAWM, incluindo a coroa radiata bilateral. Os autores sugerem que tais alterações possam refletir um padrão de desconexão entre áreas frontais e subcorticais.[98] Complementarmente, Novo et al. observaram correlações entre o aumento da MD e a gravidade da fadiga - escala modificada do impacto da fadiga (MFIS - *modified fatigue impact scale*) em regiões específicas da substância branca, incluindo a ACR bilateral, embora não tenham encontrado alterações significativas na FA.[123] Esses resultados indicam que essa região pode estar envolvida em circuitos afetados em pacientes com fadiga, ainda que os mecanismos subjacentes permaneçam incertos.

Em seu estudo, Bao et al. mencionam, de forma breve e especulativa, que essa região poderia estar associada a funções mediadas pela porção anterior da rede de modo padrão (DMN - *default mode network*).[26] Em linha semelhante, Høgestøl et al., utilizando ressonância magnética funcional (fMRI - *functional magnetic ressonance imaging*), observaram aumento da conectividade da DMN em pacientes com EM e altos níveis de fadiga, mesmo na ausência de depressão significativa, sugerindo que o envolvimento da DMN na fadiga não se deve apenas à presença de comorbidade depressiva.[125]

Embora os estudos mencionados utilizem abordagens metodológicas distintas, seus resultados convergem ao apontar a coroa radiata como uma região vulnerável a alterações da substância branca na EM. No presente estudo, alterações

microestruturais foram detectadas na ACR mesmo em indivíduos com baixa incapacidade clínica e mesmo após o mascaramento das lesões, reforçando que o comprometimento pode ocorrer de forma precoce e sutil.

5.3 Radiação talâmica posterior

A radiação talâmica posterior faz parte das radiações talâmicas – feixe de fibras localizado na parte retrolenticular da cápsula interna. Esta, por sua vez, localiza-se posteriormente ao núcleo lentiforme e contém fibras talamocorticais que se projetam para as regiões parietal e occipital, envolvidas em processamento sensorial complexo, incluindo percepção espacial e integração sensório motora. Abriga também as radiações ópticas, responsáveis pela condução das informações visuais do corpo geniculado lateral ao córtex visual primário.[118,120-122,126,127]

No presente estudo, foi observado uma diminuição da FA em pacientes com EM nessa região para ambas as abordagens do TBSS. Tal achado pode estar relacionado a processos de degeneração axonal precoce em fibras talamocorticais que integram circuitos de processamento sensorial, particularmente aqueles associados à visão.[128-130]

Embora a neurite óptica, caracterizada por inflamação e desmielinização do nervo óptico (pré-quiasma), seja reconhecida como a manifestação inicial mais comum da EM, acometendo cerca de 20 a 30% dos pacientes,[131,132] evidências crescentes apontam que o comprometimento visual na EM não se restringe à via anterior. Alterações microestruturais nas vias visuais centrais, incluindo as radiações ópticas — vias essenciais para a condução e processamento consciente das informações visuais — e o córtex visual, podem ocorrer mesmo em estágios iniciais da doença, frequentemente de forma subclínica.[131-134]

Nesse contexto, Reich *et al.*[97] demonstraram que danos específicos nas radiações ópticas, avaliados por DTI, estão associados a déficits visuais centrais e à redução da espessura da camada de fibras nervosas da retina (RNFL - *retinal nerve fiber layer*), mesmo em pacientes sem histórico clínico evidente de neurite óptica. Esses achados reforçam que a disfunção visual em EM pode ter contribuição significativa da via visual pós-quiasmática, sendo o dano da radiação óptica capaz de impactar a visão de forma independente ou adicional ao dano do nervo óptico. Pawlitzki *et al.*[129] também

corroboraram esse conceito, identificando alterações microestruturais nas radiações ópticas de pacientes com EM correlacionadas a déficits visuais discretos e dificuldades em tarefas visuais complexas, como navegação espacial.

Embora não existam, até o momento, estudos que descrevam diretamente lesões isoladas nessa região correlacionadas a déficits visuais específicos em EM, a anatomia funcional da cápsula interna e os achados de estudos anteriores permitem inferir que alterações microestruturais nessa região possam refletir dano precoce de fibras visuais centrais. Tal interpretação é coerente com manifestações visuais centrais descritas em EM, como hemianopsias homônimas discretas, dificuldades de leitura e insegurança em ambientes complexos, mesmo na ausência de sintomas visuais francos, como relatado por Costello *et al.*[132] Esse modelo mais abrangente reforça a visão de que a via visual na EM deve ser considerada como um eixo contínuo e integrado, em que lesões tanto anteriores (nervo óptico) quanto posteriores (radiação óptica, córtex visual) podem contribuir de maneira combinada para a disfunção visual observada na doença.

5.4 Corpo caloso e tapetum

O corpo caloso é o maior feixe comissural do cérebro, conectando os dois hemisférios. Sua principal função é conectar as regiões temporais dos dois hemisférios cerebrais, facilitando a comunicação inter-hemisférica e a integração de informações neurais.[135,136] Ele é dividido em rostral, genu, corpo e esplênio. O tapetum origina-se principalmente a partir das fibras que saem do corpo e do esplênio do corpo caloso e então se estendem lateralmente ao redor do ventrículo lateral. Por isso, ele pode ser visto como parte da radiação do corpo caloso.[102,137]

Na análise por TBSS sem máscara, observou-se aumento da RD no Grupo EM na região do genu do corpo caloso. Com aplicação de máscara de lesão no TBSS, o padrão incluiu diminuição da FA no genu e no Tapetum.

O tapetum é pouco explorado em estudos de difusão na EM, apesar de citado nos resultados, possivelmente por ser uma sub-região do corpo caloso com difícil segmentação nos métodos tradicionais de análise. Em um dos poucos estudos, Batista *et al.* investigaram alterações microestruturais da substância branca na NAWM e observaram que o tapetum estava entre os tratos com maior extensão de alteração,

acompanhando o envolvimento de regiões do corpo caloso e de tratos de vias límbicas; alteração esta que foram associadas a um pior desempenho em testes de cognição social.[138] Em um eixo complementar, Narayanan et al. demonstraram que lesões e dano axonal em EM tendem a se concentrar em áreas periventriculares e no esplênio/forceps major — regiões que constituem a origem anatômica das fibras que formam o tapetum — o que aponta para a possibilidade de degeneração secundária ou contínua dessas fibras, mesmo quando não há lesões visíveis diretamente sobre o trato.[139]

Já em relação ao corpo caloso mais especificamente, diversos estudos apontam a região como uma das estruturas mais sensíveis à agressão microestrutural na EM. Rimkus et al., avaliando pacientes recém-diagnosticados e com baixo comprometimento clínico pelo EDSS, também identificaram redução de FA e aumento de RD e MD.[140]

Além disso, uma metanálise envolvendo 15 estudos (461 pacientes) demonstrou de forma consistente redução de FA e aumento de MD, AD e RD no corpo caloso — tanto no genu quanto no esplênio. Os autores destacam que o corpo caloso é uma estrutura que apresenta desmielinização e atrofia desde fases iniciais da doença e concluem que as métricas de difusão nessa região constituem biomarcadores sensíveis para detecção de lesão microestrutural na EM.[141] A consonância entre esses achados e os resultados do presente estudo, obtidos em pacientes com baixo comprometimento clínico, reforça que alterações microestruturais do corpo caloso podem ser detectadas mesmo quando a incapacidade ainda é mínima.

5.5 Análise de correlação entre incapacidade clínica e métricas de difusão

A análise de correlação entre o EDSS e as métricas do DTI (FA, AD, MD, RD) nas 11 ROIs não revelou associações estatisticamente significativas após correção por múltiplas comparações.

Estudos prévios já investigaram essa relação. Rimkus et al.[140] avaliaram pacientes com EM-RR com EDSS entre 0 e 3 e encontraram correlações significativas entre EDSS e algumas métricas do corpo caloso, especialmente AD e, em segmentos específicos, MD. Schneider *et al.* acompanharam uma amostra maior, composta por indivíduos com CIS ou EM inicial, e relataram correlações negativas entre

FA e EDSS ao longo de dois anos, principalmente em regiões específicas da substância branca.[24,140]

No presente estudo, embora os pacientes também apresentem baixa incapacidade clínica, as correlações observadas foram pequenas e sem padrão consistente. Uma possibilidade para essa diferença é o número reduzido de participantes, que limita a detecção de associações sutis entre comprometimento clínico e microestrutura. Além disso, em pacientes com baixa incapacidade, alterações de difusão podem ser amplas e heterogêneas entre os indivíduos — o que significa que as métricas de DTI não necessariamente se alinham de forma direta com o EDSS.[142,143] Essa heterogeneidade, descrita em estudos anteriores, pode reduzir a força de correlações transversais em amostras pequenas.

Dessa forma, o fato de não terem sido observadas associações estatisticamente significativas não implica necessariamente ausência de alterações microestruturais, mas reforça a necessidade de estudos com maior número de participantes, amplitude aumentada de comprometimento e, idealmente, acompanhamento longitudinal para capturar essas relações com maior sensibilidade.

5.6 Tractografia

Primeiramente, o efeito dos fatores grupo (Controles *versus* EM), abordagem de tractografia (3 estratégias) e sua interação foi avaliado por meio de LLM, considerando sujeito como efeito aleatório. A significância dos efeitos principais e da interação foi examinada através da ANOVA do modelo misto com correção de Satterthwaite para os graus de liberdade.

A análise mostrou que as métricas AD e MD diferenciam pacientes de controles quando o TCE é considerado como um todo. Isso significa que, independentemente da forma como o trato foi reconstruído, os pacientes tendem a ter AD e MD maiores que os controles. Já FA e RD não apresentaram diferença global entre grupos, o que indica que, analisando o trato como um todo, essas métricas não distinguem pacientes de controles.

Foi observado efeito significativo de abordagem de tractografia para FA, MD e RD, indicando que o processo de reconstrução influencia os valores obtidos das métricas — especialmente quando o algoritmo inclui regiões com lesão ou quando

máscaras artificiais são aplicadas nos controles. Além disso, a interação significativa grupo *versus* abordagem para FA, MD e RD sugere que o modo como o trato é reconstruído modula o contraste entre pacientes e controles.

Após a ANOVA indicar efeito de abordagem e interação grupo × abordagem, foram realizadas comparações *post hoc*. Essas análises mostraram que a simples mudança na forma de reconstruir o feixe — incluir todo o trato (A1), excluir *voxels* lesionados (A2) ou aplicar máscaras virtuais nos controles (A3) — alterou FA e RD apenas no Grupo Controle, indicando que essas métricas são sensíveis ao conjunto de *voxels* incluídos na reconstrução, e não apenas à presença de lesões.

Estudos demonstram que essa sensibilidade não é específica do nosso *dataset*. Schilling et al. mostraram que diferentes grupos, usando o mesmo *dataset*, obtêm reconstruções de feixes substancialmente diferentes, com grandes variações na geometria, extensão espacial e métricas associadas.[144] Em um estudo complementar, os mesmos autores demonstraram que a escolha do workflow de segmentação afeta a forma, o volume e as métricas microestruturais do feixe, gerando variações maiores do que o próprio efeito do scanner, resolução ou *b-value*.[145]

No contexto de lesão, Lipp et al. mostram que a presença de lesões não impede a reconstrução do feixe em >90% dos pacientes com EM, e que excluir regiões lesionadas não leva a omissão sistemática de segmentos danificados.[78] De forma complementar, Chamberland et al. demonstram que a localização das lesões dentro do feixe altera métricas de tractometria, reforçando que pequenas variações espaciais na reconstrução modificam a microestrutura estimada.[146]

Em conjunto, esses estudos mostram que a tractografia não mede uma propriedade fixa do feixe, mas sim o resultado da combinação de *voxels* incluídos na segmentação.

Já na população de pacientes, não observamos diferenças significativas entre as abordagens A1_total e A2_noLesion (A3 adota a mesma máscara de lesão da A2). Esse resultado é coerente com evidências de que a NAWM em EM apresenta alterações microestruturais detectáveis por difusão mesmo na ausência de lesões visíveis.[26,79,147] Assim, excluir apenas *voxels* de lesão explícita não altera substancialmente as métricas porque o feixe continua atravessando regiões já alteradas. Em outras palavras, nos pacientes, o que dominaria o valor médio das métricas não é a presença de uma lesão pontual, mas a alterações difusas ao longo do feixe.

De forma consistente, a análise *post hoc* por abordagem mostrou que AD e MD diferenciaram pacientes de controles em todas as abordagens, inclusive quando lesões foram removidas ou máscaras foram aplicadas aos controles. Isso sugere que tais métricas capturam alterações microestruturais mais difusas. FA e RD, por outro lado, não diferenciaram os grupos de forma consistente, mas foram as únicas métricas sensíveis à mudança metodológica nos controles. Ou seja: quando o que muda é o método, FA e RD variam; quando o que muda é a biologia, AD e MD diferenciam pacientes de controles.

Em revisão abrangente de múltiplas doenças da substância branca, Kornaropoulos et al. reportam que MD é frequentemente a métrica mais sensível à neurodegeneração, surgindo antes de alterações em FA ou RD.[148] Kamagata et al. reforçam que métricas de DTI não devem ser interpretadas isoladamente, pois não são específicas para um tipo de dano, recomendando a combinação de métricas para interpretação microestrutural.[115] Finalmente, Tae et al. destacam que AD, RD, MD e FA são *proxies* do movimento da água no tecido, influenciados por mielina, axônios, edema e arquitetura de fibras, e que o uso de termos como “integridade” pode ser simplista, dado o caráter semiquantitativo da DTI.[114]

Até onde sabemos, nenhum estudo testou diretamente se algumas métricas permanecem estáveis frente a alterações metodológicas da tractografia enquanto outras variam com o método. Assim, nossos achados não constituem conclusão, mas uma hipótese gerada pelos dados: AD e MD podem ser métricas mais estáveis frente à definição do feixe, enquanto FA e RD podem ser mais dependentes de decisões metodológicas (especialmente em regiões com geometria complexa).

Estudos futuros deveriam investigar sistematicamente como cada métrica responde a diferentes estratégias de reconstrução, idealmente combinando métricas de difusividade e anisotropia com métodos mais específicos à microestrutura tecidual. Entre eles, destacam-se modelos multicompartimentais, como a *neurite orientation dispersion and density imaging* (NODDI) e o *spherical mean technique* (SMT),[79,149] que permitem estimar parâmetros biologicamente mais interpretáveis, como densidade e orientação de neuritos, reduzindo ambiguidades inerentes ao modelo tensorial. Além disso, técnicas independentes da difusão, como a tomografia por emissão de pósitrons (PET) com traçadores de mielina, podem fornecer medidas mais diretas do conteúdo mielínico, enquanto biomarcadores séricos, como o NfL, refletem dano axonal de forma sistêmica.[150-153] A integração dessas abordagens poderia esclarecer se a

maior estabilidade de AD e MD está associada a maior sensibilidade ao dano microestrutural difuso, enquanto FA e RD seriam mais vulneráveis à definição do feixe.

Com base nos nossos achados, propomos uma interpretação para o padrão observado nas três abordagens de tractografia. Nos pacientes, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as três abordagens. Uma explicação possível é que as lesões já representam, por si mesmas, uma descontinuidade microestrutural consistente ao longo do trato. Em outras palavras, independentemente de serem utilizadas ou não máscaras de lesão, a ruptura no fluxo preferencial de água já existe biologicamente — e as abordagens A2 e A3 apenas tornam explícita uma interrupção que já estava presente desde o início. Assim, o fato de não surgirem diferenças entre as abordagens sugere que, nos pacientes, o dano microestrutural subjacente domina o comportamento do rastreamento probabilístico.

Nos controles, porém, a situação é diferente. Como esperado em indivíduos saudáveis, a difusão da água ao longo dos tratos corticoespinhais deve ser contínua, sem interrupções anatômicas. Ao introduzir máscaras de exclusão derivadas de hiperintensidades inespecíficas ou artefatos de segmentação, cria-se artificialmente um ponto de ruptura que não existe biologicamente. Essa descontinuidade imposta modifica o caminho de maior probabilidade do PROBTRACKX, alterando a geometria local do trato e resultando em diferenças estatisticamente significativas entre as abordagens — diferenças que não refletem alterações microestruturais reais.

Conjunto com nossos resultados, essa interpretação sugere que a ausência de diferenças entre A1–A2–A3 nos pacientes reflete um padrão de dano estrutural consistente, enquanto as diferenças observadas nos controles derivam principalmente do efeito geométrico induzido pelo mascaramento artificial. Esse padrão reforça a importância de interpretar abordagens com mascaramento à luz da fisiologia de cada grupo, reconhecendo que técnicas altamente sensíveis, como a tractografia probabilística, podem reagir de maneira diferente a pequenas alterações geométricas.

5.7 Adaptações no *script* e manejo de lesões

Em cérebros com lesões focais de substância branca (como na EM), etapas de normalização/registro podem ser enviesadas porque algoritmos de alinhamento minimizam diferenças de intensidade entre imagens. Quando há uma

estrutura anômala em um sujeito (lesão) e não no *template*/controles, especialmente em registros não lineares, parte dessa discrepância pode ser “explicada” por deformações locais indevidas, reduzindo a correspondência anatômica entre sujeitos.[71]

O FSL reconhece explicitamente que patologia pode afetar registro e fornece alternativas (disponibilizadas na documentação oficial do FSL) como o uso de volumes de peso (*-inweight*/*-refweight*) para excluir regiões (peso 0) do FLIRT; já o FNIRT não possui um “modelo anatômico”, podendo falhar quando há uma estrutura presente em uma imagem e não na outra (ex.: tumor/lesão), com risco de deformações locais. Quando ao *randomise* também inclui um fluxo específico para “*lesion masking/missing data*”, via *script setup_masks*, para excluir *voxels* com patologia/artefatos inconsistentes entre sujeitos; assim como a ferramenta *lesion_filling*, muito utilizado no contexto da EM, visando reduzir o impacto de lesões em segmentação e medidas volumétricas/atrofia.

Apesar de úteis, essas abordagens isoladas não eliminam, por si só, os dois pontos críticos do TBSS: (i) como o *warp* é estimado a partir dos mapas de difusão e (ii) quais *voxels* efetivamente entram no teste estatístico no esqueleto. Como os desenvolvedores explicam, o *lesion_filling*, por exemplo, foi proposto para imagens estruturais (T1) com foco em segmentação/volumetria; já o TBSS é realizado sobre mapas derivados da difusão. Portanto, aplicar *lesion_filling* diretamente nesses mapas não é uma “correção padrão”: e poderia até conflitar com o objetivo de separar lesão versus NAWM. Além disso, mesmo se o preenchimento fosse feito em T1, o TBSS ainda continuaria dependente do registro não linear dos mapas de difusão e da projeção no esqueleto. Por isso, o manejo de lesões precisa estar incorporado no cálculo do registro (reduzindo a influência de lesões na otimização do alinhamento) e/ou na inferência estatística (controlando explicitamente a inclusão de *voxels* lesionais no teste).

No presente estudo, a aplicação das adaptações *lesion-aware* alterou os resultados do TBSS, o que era esperado, pois (i) excluir *voxels* lesionados direcionou a inferência para NAWM; e (ii) reduziu vieses de alinhamento ao excluir lesões que poderiam influenciar campos de deformação e repercutir na projeção para o esqueleto.

Em contraste, na tractografia do TCE, mascarar ou não as lesões, não produziu diferenças relevantes. Evidências em EM indicam que lesões podem alterar a orientação local, mas nem sempre impedem a reconstrução de tratos em larga escala—especialmente em abordagens probabilísticas—e porque o impacto do mascaramento depende de as lesões interceptarem de forma crítica as regiões das máscaras de rastreamento.[78] Além disso, métricas médias ao longo do trato/ROI

tendem a ser menos sensíveis a efeitos muito localizados, ao contrário do TBSS, que testa *voxelwise* no esqueleto.

Assim, o padrão “TBSS sensível às adaptações / tractografia estável ao mascaramento” sugere que o ganho do manejo explícito de lesões foi maior onde o método é mais vulnerável a *voxels* inconsistentes entre sujeitos e a variações sutis de alinhamento (TBSS). Ao mesmo tempo, o achado negativo na tractografia não invalida a utilidade do mascaramento em outros contextos: cargas lesionais maiores, tratos diferentes, estratégias de *seed* distintas, ou desfechos mais locais podem amplificar o impacto das lesões.

5.8 Limitações

Este estudo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas na interpretação dos resultados.

Primeiro, o tamanho amostral reduzido pode ter limitado o poder estatístico, principalmente para detectar efeitos sutis em regiões com menor variabilidade microestrutural, mesmo após nosso pareamento minucioso.

Além disso, este é um estudo transversal e retrospectivo, o que impede estabelecer relações de causalidade ou acompanhar a progressão temporal das alterações observadas. E as alterações microestruturais inferidas a partir do DTI representam um marcador indireto do estado microestrutural do tecido-axonal e não uma confirmação biológica do mecanismo envolvido.

Adicionalmente, o estudo utilizou métodos ainda pouco difundidos no contexto de EM, como o mascaramento virtual de lesões na tractografia e ainda pouco padronização na literatura, o que limita comparações diretas com outros estudos.

6 CONCLUSÕES

1. Na análise *voxelwise* exploratória foi identificado alterações microestruturais em pacientes com esclerose múltipla com baixo comprometimento funcional, quando comparados a controles saudáveis. Foram observadas: (i) reduções de anisotropia fracionada no genu do corpo caloso, na radiação talâmica posterior e no tapetum; e (ii) aumento de difusividade radial na coroa radiata anterior (bilateral). Essas alterações persistiram mesmo quando aplicadas estratégias de mascaramento para excluir as áreas lesionadas;

2. Na análise por região de interesse através da tractografia probabilística do trato corticoespinhal, foi observado aumento de difusividade axial e difusividade média em pacientes em comparação a controles independentemente da estratégia utilizada (reconstrução completa do trato, com exclusão das lesões ou com mascaramento virtual de lesões). A anisotropia fracionada, entretanto, não apresentou diferença significativa entre os grupos e a difusividade radial ficou restrita apenas à primeira abordagem, com pacientes apresentando valor aumentado;

3. Não foram observadas nenhuma correlação entre o comprometimento da doença, avaliado pela *Expanded Diability Status Scale*, e as métricas de difusão.

7 REFERÊNCIAS

1. Multz RA, Jamshidi P, Ahrendsen JT. Multiple sclerosis: a practical review for pathologists. J Pathol Transl Med. 2025;59(4):203-13.

2. Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, Schuchardt J, Brück W. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. Brain. 2002;125(Pt10):2202-12.

3. Sabatino JJ, Jr., Cree BAC, Hauser SL. New horizons for multiple sclerosis therapy: 2025 and beyond. Ann Neurol. 2025;98(2):317-28.

4. Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis - a review. Eur J Neurol. 2019;26(1):27-40.

5. Jakimovski D, Bittner S, Zivadinov R, Morrow SA, Benedict RH, Zipp F, et al. Multiple sclerosis. Lancet. 2024;403(10422):183-202.

6. Goodin DS, Reder AT, Bermel RA, Cutter GR, Fox RJ, John GR, et al. Relapses in multiple sclerosis: relationship to disability. Mult Scler Relat Disord. 2016;6:10-20.

7. Garton T, Gadani SP, Gill AJ, Calabresi PA. Neurodegeneration and demyelination in multiple sclerosis. Neuron. 2024;112(19):3231-51.

8. Gallien P, Robineau S. Sensory-motor and genito-sphincter dysfunctions in multiple sclerosis. Biomed Pharmacother. 1999;53(8):380-5.

9. Maggio MG, Russo M, Cuzzola MF, Destro M, La Rosa G, Molonia F, et al. Virtual reality in multiple sclerosis rehabilitation: a review on cognitive and motor outcomes. J Clin Neurosci. 2019;65:106-11.

10. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). Neurology. 1983;33(11):1444-52.

11. Cinar BP, Yorgun YG. What we learned from the history of multiple sclerosis measurement: expanded disability status scale. Noro Psikiyatr Ars. 2018;55(Suppl 1):S69-S75.

12. Meyer-Moock S, Feng Y-S, Maeurer M, Dippel F-W, Kohlmann T. Systematic literature review and validity evaluation of the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and the Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC) in patients with multiple sclerosis. BMC Neurol. 2014;14:58.

13. Lassmann H. Pathogenic mechanisms associated with different clinical courses of multiple sclerosis. Front Immunol. 2019;9:3116.

14. Metz I, Weigand SD, Popescu BF, Frischer JM, Parisi JE, Guo Y, et al. Pathologic heterogeneity persists in early active multiple sclerosis lesions. Ann Neurol. 2014;75(5):728-38.

15. Schirmer L, Velmeshev D, Holmqvist S, Kaufmann M, Werneburg S, Jung D, et al. Neuronal vulnerability and multilineage diversity in multiple sclerosis. Nature. 2019;573(7772):75-82.

16. Frischer JM, Weigand SD, Guo Y, Kale N, Parisi JE, Pirko I, et al. Clinical and pathological insights into the dynamic nature of the white matter multiple sclerosis plaque. Ann Neurol. 2015;78(5):710-21.

17. Barkhof F. The clinico-radiological paradox in multiple sclerosis revisited. Curr Opin Neurol. 2002;15(3):239-45.

18. Audoin B, Guye M, Reuter F, Duong M-VA, Confort-Gouny S, Malikova I, et al. Structure of WM bundles constituting the working memory system in early multiple sclerosis: a quantitative DTI tractography study. Neuroimage. 2007;36(4):1324-30.

19. Commowick O, Fillard P, Clatz O, Warfield SK, editors. Detection of DTI white matter abnormalities in multiple sclerosis patients. Med Image Comput Comput Assist Interv. 2008;11(Pt 1):975-82.

20. 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.

21. Oh J, Saidha S, Chen M, Smith SA, Prince J, Jones C, et al. Spinal cord quantitative MRI discriminates between disability levels in multiple sclerosis. Neurology. 2013;80(6):540-7.

22. Mollison D, Sellar R, Bastin M, Mollison D, Chandran S, Wardlaw J, et al. The clinico-radiological paradox of cognitive function and MRI burden of white matter lesions in people with multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2017;12(5):e0177727.

23. Natarajan R, Hagman S, Wu X, Hakulinen U, Raunio M, Helminen M, et al. Diffusion Tensor Imaging in NAWM and NADGM in MS and CIS: association with Candidate Biomarkers in Sera. Mult Scler Int. 2013;2013:265259.

24. Schneider R, Genç E, Ahlborn C, Gold R, Lukas C, Bellenberg B. Temporal dynamics of diffusion metrics in early multiple sclerosis and clinically isolated syndrome: a 2-year follow-up tract-based spatial statistics study. Front Neurol. 2019;10:1165.

25. Asaf A, Evan S, Anat A. Injury to white matter tracts in relapsing–remitting multiple sclerosis: a possible therapeutic window within the first 5 years from onset using diffusion-tensor imaging tract-based spatial statistics. NeuroImage Clin. 2015;8:261-6.

26. Bao J, Tu H, Li Y, Sun J, Hu Z, Zhang F, et al. Diffusion Tensor Imaging Revealed microstructural changes in normal-appearing white matter regions in relapsing-remitting multiple sclerosis. Front Neurosci. 2022;16:837452.

27. Atlas of MS. Number of people with MS: prevalence in Brazil. London: MS International Federation; 2020 [citado 2025 Mar 1]. Available from: https://www.atlasofms.org/map/global/epidemiology/number-of-people-with-ms.

28. Associação Brasileira de Esclerose Múltipla(ABEM). O que é Esclerose Múltipla (EM). São Paulo: ABEM; 2026 [citado 2025 Mar 5]. Available from: https://www.abem.org.br/esclerose-multipla/o-que-e-esclerose-multipla/.

29. Weinshenker BG. Natural history of multiple sclerosis. Ann Neurol. 1994;36(Suppl:S6-11).

30. Šoda J, Pavelin S, Vujović I, Rogić Vidaković M. Assessment of motor evoked potentials in multiple sclerosis. Sensors (Basel). 2023;23(1):497.

31. Reich DS, Zackowski KM, Gordon-Lipkin EM, Smith SA, Chodkowski BA, Cutter GR, et al. Corticospinal tract abnormalities are associated with weakness in multiple sclerosis. AJNR Am J Neuroradiol. 2008;29(2):333–9.

32. Tovar-Moll F, Evangelou IE, Chiu AW, Auh S, Chen C, Ehrmantraut M, et al. Diffuse and focal corticospinal tract disease and its impact on patient disability in multiple sclerosis. J Neuroimaging. 2015;25(2):200-6.

33. Kauv P, Chalah MA, Créange A, Lefaucheur JP, Hodel J, Ayache SS. The corticospinal tract in multiple sclerosis: correlation between cortical excitability and magnetic resonance imaging measures. J Neural Transm (Vienna). 2025;132(2):265-73.

34. Bilek F, Chaves AR, Fesenko O, Ploughman M. Gait instability is a more specific predictor of corticospinal tract function than gait speed in clinically stable multiple sclerosis. Sci Rep. 2025;15(1):26822.

35. Montalban X, Lebrun-Frénay C, Oh J, Arrambide G, Moccia M, Pia Amato M, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2024 revisions of the McDonald criteria. Lancet Neurol. 2025;24(10):850-65. Erratum in: Lancet Neurol. 2025;24(11):e13.

36. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 5th ed. Arlington (VA): American Psychiatric Publishing; 2013.

37. Kurtzke, John F. Expanded Disability Status Scale (EDSS) / Functional Systems Score (FSS). New York: MDCalc; 2005-2026 [cited 2025 Dec 15].Available from: https://www.mdcalc.com/calc/2146/expanded-disability-status-scale-edss-functional-systems-score-fss#creator-insights.

38. Demir S. Expanded Disability Status Scale (EDSS) in Multiple Sclerosis. Cam & Sakura Med J. 2022;2(3):82-9.

39. Caramia F, Pantano P, Di Legge S, Piattella MC, Lenzi D, Paolillo A, et al. A longitudinal study of MR diffusion changes in normal appearing white matter of patients with early multiple sclerosis. Magn Reson Imaging. 2002;20(5):383-8.

40. Griffin CM, Chard DT, Ciccarelli O, Kapoor R, Barker GJ, Thompson AJ, et al. Diffusion tensor imaging in early relapsing-remitting multiple sclerosis. Mult Scler. 2001;7(5):290-7.

41. De Santis S, Granberg T, Ouellette R, Treaba C, Herranz E, Fan Q, et al. Evidence of early microstructural white matter abnormalities in multiple sclerosis from multi-shell diffusion MRI. NeuroImage Clin. 2019;22:101699.

42. Chard D, Trip SA. Resolving the clinico-radiological paradox in multiple sclerosis. F1000Res. 2017;6:1828.

43. Chappell M, Jenkinson M, Okell T. Short Introduction to MRI Physics for Neuroimaging. Oxford: Oxford University Press; [s.d.] [cited 2025 Dec 15]. (Oxford Neuroimaging Primers appendix). Available from: https://www.fmrib.ox.ac.uk/primers/appendices/mri_physics.pdf.

44. McRobbie DW, Moore EA, Graves MJ, Prince MR. MRI from Picture to Proton. 3rd. ed.: Cambridge; New York: University Printing House, Cambridge University Press; 2017.

45. Chavhan GB. MRI made easy. 2nd. ed. New Delhi: Jaypee; 2013.

46. Ranzenberger LR, Snyder T, Das JM. Diffusion tensor imaging. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [cited 2025 Dec 15]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537361/.

47. Soares JM, Marques P, Alves V, Sousa N. A hitchhiker's guide to diffusion tensor imaging. Front Neurosci. 2013;7:31.

48. Mori S, Tournier J-D. Introduction to diffusion tensor imaging: and higher order models. London: Academic Press; 2013. 140 p.

49. Johansen-Berg H, Behrens TE, editors. Diffusion MRI: from quantitative measurement to in vivo neuroanatomy. 2nd. ed. London: Academic Press; 2013. 632 p.

50. Van Hecke W, Emsell L, Sunaert S, editors. Diffusion tensor imaging: a practical handbook. New York: Springer; 2015. 458 p.

51. Dell'Acqua F, Descoteaux M, Leemans A, editors. Handbook of diffusion MR tractography: imaging methods, biophysical models, algorithms and applications. London: Academic Press; 2024. 727 p.

52. Sbardella E, Tona F, Petsas N, Pantano P. DTI measurements in multiple sclerosis: evaluation of brain damage and clinical implications. Mult Scler Int. 2013;2013(1):671730.

53. Tromp D. The diffusion tensor, and its relation to FA, MD, AD and RD. In: Diffusion-Imaging [discussion forum]. [s.l]: Diffusion-Imaging; 2015 Oct 8. [cited 2025 Dec 15]. [1 screen].

54. Moneo J, Kramer JL, Nightingale TE, Berger MJ. Can magnetic resonance imaging reveal lower motor neuron damage after traumatic spinal cord injury? A scoping review. Neurotrauma Rep. 2021;2(1):541-47.

55. Tournier JD, Calamante F, Connelly A. MRtrix: diffusion tractography in crossing fiber regions. Int J Imaging Syst Technol. 2012;22(1):53-66.

56. Jones DK, editor. Diffusion MRI: theory, methods and applications. New York: Oxford University Press; 2010. 784 p.

57. Jeurissen B, Descoteaux M, Mori S, Leemans A. Diffusion MRI fiber tractography of the brain. NMR Biomed. 2019;32(4):e3785.

58. Behrens TE, Berg HJ, Jbabdi S, Rushworth MF, Woolrich MW. Probabilistic diffusion tractography with multiple fibre orientations: what can we gain? Neuroimage. 2007;34(1):144-55.

59. Alvez PB. [Inference of a human brain fiber bundle atlas from high angular resolution diffusion imaging] [thesis]: Paris: Université Paris Sud-Paris XI; 2011. 239 p. French.

60. Jones DK, Cercignani M. Twenty-five pitfalls in the analysis of diffusion MRI data. NMR Biomed. 2010;23(7):803-20.

61. Jones DK, Knösche TR, Turner R. White matter integrity, fiber count, and other fallacies: the do's and don'ts of diffusion MRI. Neuroimage. 2013;73:239-54.

62. Tax CMW, Bastiani M, Veraart J, Garyfallidis E, Okan Irfanoglu M. What's new and what's next in diffusion MRI preprocessing. Neuroimage. 2022;249:118830.

63. Jezzard P, Balaban RS. Correction for geometric distortion in echo planar images from B0 field variations. Magn Reson Med. 1995;34(1):65-73.

64. Smith SM, Jenkinson M, Woolrich MW, Beckmann CF, Behrens TE, Johansen-Berg H, et al. Advances in functional and structural MR image analysis and implementation as FSL. Neuroimage. 2004;23 (Suppl 1):S208-19.

65. Andersson JL, Skare S, Ashburner J. How to correct susceptibility distortions in spin-echo echo-planar images: application to diffusion tensor imaging. Neuroimage. 2003;20(2):870-88.

66. Andersson JL, Sotiropoulos SN. An integrated approach to correction for off-resonance effects and subject movement in diffusion MR imaging. NeuroImage. 2016;125:1063-78.

67. Smith SM, Jenkinson M, Johansen-Berg H, Rueckert D, Nichols TE, Mackay CE, et al. Tract-based spatial statistics: voxelwise analysis of multi-subject diffusion data. Neuroimage. 2006;31(4):1487-505.

68. Veraart J, Sijbers J, Sunaert S, Leemans A, Jeurissen B. Weighted linear least squares estimation of diffusion MRI parameters: strengths, limitations, and pitfalls. Neuroimage. 2013;81:335-46.

69. FSL - FMRIB Software Library. Diffusion MRI - FMRIB's Diffusion Toolbox (FDT). Oxford: Oxford Centre for Integrative Neuroimaging; 2025 [cited 2025 Dec 15]. FSL - FMRIB Software Library. Available from: Diffusion MRI - FSL - FMRIB Software Library.

70. Inglese M, Bester M. Diffusion imaging in multiple sclerosis: research and clinical implications. NMR in Biomedicine. 2010;23(7):865-72.

71. Brett M, Leff AP, Rorden C, Ashburner J. Spatial normalization of brain images with focal lesions using cost function masking. Neuroimage. 2001;14(2):486-500.

72. Andersen SM, Rapcsak SZ, Beeson PM. Cost function masking during normalization of brains with focal lesions: still a necessity? Neuroimage. 2010;53(1):78-84.

73. Andersson JL, Jenkinson M, Smith S. Non-linear optimisation. Oxford: FMRIB Centre; 2007 Jun 28. 16 p. Report No.: TR07JA1.

74. Andersson J, Jenkinson M, Smith S. Non-linear registration, aka Spatial normalisation. Oxford: FMRIB Centre; 2007 Jun 28. 21 p. Report No.: TR07JA2.

75. FSL - FMRIB Software Library. Tract-based Spatial Statistics (TBSS). Oxford: Oxford Centre for Integrative Neuroimaging; 2025 [cited 2025 Dec 15]. Available from: https://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/docs/diffusion/tbss.html.

76. De Groot M, Vernooij MW, Klein S, Ikram MA, Vos FM, Smith SM, et al. Improving alignment in tract-based spatial statistics: evaluation and optimization of image registration. Neuroimage. 2013;76:400-11.

77. Bach M, Laun FB, Leemans A, Tax CM, Biessels GJ, Stieltjes B, et al. Methodological considerations on tract-based spatial statistics (TBSS). Neuroimage. 2014;100:358-69.

78. Lipp I, Parker GD, Tallantyre EC, Goodall A, Grama S, Patitucci E, et al. Tractography in the presence of multiple sclerosis lesions. NeuroImage. 2020;209:116471.

79. Caranova M, Soares JF, Batista S, Castelo-Branco M, Duarte JV. A systematic review of microstructural abnormalities in multiple sclerosis detected with NODDI and DTI models of diffusion-weighted magnetic resonance imaging. Magn Reson Imaging. 2023;104:61-71.

80. Moll NM, Rietsch AM, Thomas S, Ransohoff AJ, Lee JC, Fox R, et al. Multiple sclerosis normal-appearing white matter: pathology–imaging correlations. Ann Neurol. 2011;70(5):764-73.

81. Kamraoui RA, Ta V-T, Tourdias T, Mansencal B, Manjon JV, Coupé P. DeepLesionBrain: Towards a broader deep-learning generalization for multiple sclerosis lesion segmentation. Med Image Anal. 2022;76:102312.

82. Fonov VS, Evans AC, McKinstry RC, Almli CR, Collins DL. Unbiased nonlinear average age-appropriate brain templates from birth to adulthood. NeuroImage. 2009;47:S102.

83. Fonov V, Evans AC, Botteron K, Almli CR, McKinstry RC, Collins DL. Unbiased average age-appropriate atlases for pediatric studies. NeuroImage. 2011;54(1):313-27.

84. 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. Ann Neurol. 2011;69(2):292-302.

85. McGinley MP, Goldschmidt CH, Rae-Grant AD. Diagnosis and treatment of multiple sclerosis: a review. JAMA. 2021;325(8):765-79.

86. Manjón JV, Coupé P. volBrain: an online MRI brain volumetry system. Front Neuroinform. 2016;10:30.

87. Coupé P, Mansencal B, Clément M, Giraud R, de Senneville BD, Ta V-T, et al. AssemblyNet: A large ensemble of CNNs for 3D whole brain MRI segmentation. NeuroImage. 2020;219:117026.

88. Manjón JV, Romero JE, Vivo-Hernando R, Rubio G, Aparici F, Iglesia-Vaya M et al. Blind MRI brain lesion inpainting using deep learning. In: Burgos N, Svoboda D, Wolterink JM, Zhao C, editors. Simulation and synthesis in medical imaging. 5th International Workshop; 2020 Oct 4. Cham: Springer; 2020. p. 41-49. (Lecture Notes in Computer Science; vol. 12417).

89. Senneville BD, Manjón JV, Coupé P. RegQCNET: Deep quality control for image-to-template brain MRI affine registration. Phys Med Biol. 2020;65(22):225022.

90. Fedorov A, Beichel R, Kalpathy-Cramer J, Finet J, Fillion-Robin J-C, Pujol S, et al. 3D Slicer as an image computing platform for the Quantitative Imaging Network. Magn Reson Imaging. 2012;30(9):1323-41.

91. Smith SM. Fast robust automated brain extraction. Hum Brain Mapp. 2002;17(3):143-55.

92. Jenkinson M, Smith S. A global optimisation method for robust affine registration of brain images. Med Image Anal. 2001;5(2):143-56.

93. Jenkinson M, Bannister P, Brady M, Smith S. Improved optimization for the robust and accurate linear registration and motion correction of brain images. Neuroimage. 2002;17(2):825-41.

94. Andersson JL, Graham MS, Drobnjak I, Zhang H, Campbell J. Susceptibility-induced distortion that varies due to motion: correction in diffusion MR without acquiring additional data. Neuroimage. 2018;171:277-95.

95. Leemans A, Jones DK. The B-matrix must be rotated when correcting for subject motion in DTI data. Magn Reson Med. 2009;61(6):1336-49.

96. Huang J, Liu Y, Zhao T, Shu N, Duan Y, Ren Z, et al. White matter microstructural alterations in clinically isolated syndrome and multiple sclerosis. J Clin Neurosci. 2018;53:27-33.

97. Reich DS, Smith SA, Gordon-Lipkin EM, Ozturk A, Caffo BS, Balcer LJ, et al. Damage to the optic radiation in multiple sclerosis is associated with retinal injury and visual disability. Arch Neurol. 2009;66(8):998-1006.

98. Bisecco A, Caiazzo G, d'Ambrosio A, Sacco R, Bonavita S, Docimo R, et al. Fatigue in multiple sclerosis: The contribution of occult white matter damage. Mult Scler. 2016;22(13):1676-84.

99. Kerbrat A, Gros C, Badji A, Bannier E, Galassi F, Combès B, et al. Multiple sclerosis lesions in motor tracts from brain to cervical cord: spatial distribution and correlation with disability. Brain. 2020;143(7):2089-105.

100. Wilson M, Tench C, Morgan P, Blumhardt L. Pyramidal tract mapping by diffusion tensor magnetic resonance imaging in multiple sclerosis: improving correlations with disability. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2003;74(2):203-7.

101. Pagani E, Filippi M, Rocca MA, Horsfield MA. A method for obtaining tract-specific diffusion tensor MRI measurements in the presence of disease: application to patients with clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis. Neuroimage. 2005;26(1):258-65.

102. Mytilinaios D. Corpus callosum. Leipzig: Kenhub; 2025 Mar 26 [cited 2025 Nov 06]. Available from: https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/corpus-callosum?

103. Mori S, Wakana S, Nagae-Poetscher LM, van Zijl PC. MRI atlas of human white matter. Amsterdam: Elsevier; 2005. 248 p.

104. Hernández M, Guerrero GD, Cecilia JM, García JM, Inuggi A, Jbabdi S, et al. Accelerating fibre orientation estimation from diffusion weighted magnetic resonance imaging using GPUs. PLoS One. 2013;8(4):e61892. Erratum in: PLoS One. 2015;10(6):e0130915.

105. Behrens TE, Woolrich MW, Jenkinson M, Johansen-Berg H, Nunes RG, Clare S, et al. Characterization and propagation of uncertainty in diffusion-weighted MR imaging. Magn Reson Med. 2003;50(5):1077-88.

106. Hernandez-Fernandez M, Reguly I, Jbabdi S, Giles M, Smith S, Sotiropoulos SN. Using GPUs to accelerate computational diffusion MRI: from microstructure estimation to tractography and connectomes. Neuroimage. 2019;188:598-615.

107. Warrington S, Bryant KL, Khrapitchev AA, Sallet J, Charquero-Ballester M, Douaud G, et al. XTRACT - Standardised protocols for automated tractography in the human and macaque brain. NeuroImage. 2020;217:116923.

108. Warrington S, Thompson E, Bastiani M, Dubois J, Baxter L, Slater R, et al. Concurrent mapping of brain ontogeny and phylogeny within a common space: Standardized tractography and applications. Sci Adv. 2022;8(42):eabq2022.

109. Schilling KG, Daducci A, Maier-Hein K, Poupon C, Houde JC, Nath V, et al. Challenges in diffusion MRI tractography - Lessons learned from international benchmark competitions. Magn Reson Imaging. 2019;57:194-209.

110. Taghvaei M, Mechanic-Hamilton DJ, Sadaghiani S, Shakibajahromi B, Dolui S, Das S, et al; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Impact of white matter hyperintensities on structural connectivity and cognition in cognitively intact ADNI participants. Neurobiol Aging. 2024;135:79-90.

111. Bennett CM, Wolford GL, Miller MB. The principled control of false positives in neuroimaging. Soc Cogn Affective Neurosc. 2009;4(4):417-22.

112. Nichols T, Hayasaka S. Controlling the familywise error rate in functional neuroimaging: a comparative review. Stat Methods Med Res. 2003;12(5):419-46.

113. Smith SM, Nichols TE. Threshold-free cluster enhancement: addressing problems of smoothing, threshold dependence and localisation in cluster inference. Neuroimage. 2009;44(1):83-98.

114. Tae WS, Ham BJ, Pyun SB, Kang SH, Kim BJ. Current clinical applications of diffusion-tensor imaging in neurological disorders. J Clin Neurol. 2018;14(2):129-140.

115. Kamagata K, Andica C, Kato A, Saito Y, Uchida W, Hatano T, et al. Diffusion magnetic resonance imaging-based biomarkers for neurodegenerative diseases. Int J Mol Sci. 2021;22(10):5216.

116. Filippi M, Cercignani M, Inglese M, Horsfield M, Comi G. Diffusion tensor magnetic resonance imaging in multiple sclerosis. Neurology. 2001;56(3):304-11.

117. Schmierer K, Wheeler-Kingshott CA, Boulby PA, Scaravilli F, Altmann DR, Barker GJ, et al. Diffusion tensor imaging of post mortem multiple sclerosis brain. Neuroimage. 2007;35(2):467-77.

118. Alexander AL, Lee JE, Lazar M, Field AS. Diffusion tensor imaging of the brain. Neurotherapeutics. 2007;4(3):316-29.

119. Mori S, Oishi K, Jiang H, Jiang L, Li X, Akhter K, et al. Stereotaxic white matter atlas based on diffusion tensor imaging in an ICBM template. Neuroimage. 2008;40(2):570-82.

120. Chowdhury F, Haque M, Sarkar M, Ara S, Islam M. White fiber dissection of brain; the internal capsule: a cadaveric study. Turk Neurosurg. 2010;20(3):314-22.

121. Costa M, Braga VL, Yağmurlu K, Centeno RS, Cavalheiro S, Chaddad-Neto F. A technical guide for fiber tract dissection of the internal capsule. Turk Neurosurg. 2018;28(6):934-939.

122. Emos MC, Khan Suheb MZ, Agarwal S. Neuroanatomy, internal capsule. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 updated 2023 Jun 5 [cited 2025 Dec 15]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542181/.

123. Novo AM, Batista S, Alves C, d'Almeida OC, Marques IB, Macário C, et al. The neural basis of fatigue in multiple sclerosis: A multimodal MRI approach. Neurol Clin Pract. 2018;8(6):492-500.

124. Dalton C, Bodini B, Samson R, Battaglini M, Fisniku L, Thompson A, et al. Brain lesion location and clinical status 20 years after a diagnosis of clinically isolated syndrome suggestive of multiple sclerosis. Mult Scler. 2011;18(3):322-8.

125. Høgestøl EA, Nygaard GO, Alnæs D, Beyer MK, Westlye LT, Harbo HF. Symptoms of fatigue and depression is reflected in altered default mode network connectivity in multiple sclerosis. PLoS One. 2019;14(4):e0210375.

126. Swienton DJ, Thomas AG. The visual pathway--functional anatomy and pathology. Semin Ultrasound CT MR. 2014;35(5):487-503.

127. George K, Das JM. Neuroanatomy, thalamocortical radiations. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 uptaded 2023 Jul 24 [cited 2025 Dec 15]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK546699/.

128. Balk LJ, Twisk JW, Steenwijk MD, Daams M, Tewarie P, Killestein J, et al. A dam for retrograde axonal degeneration in multiple sclerosis? J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2014;85(7):782-9.

129. Pawlitzki M, Horbrügger M, Loewe K, Kaufmann J, Opfer R, Wagner M, et al. MS optic neuritis-induced long-term structural changes within the visual pathway. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm. 2020;7(2):e665.

130. Budde MD, Xie M, Cross AH, Song SK. Axial diffusivity is the primary correlate of axonal injury in the experimental autoimmune encephalomyelitis spinal cord: a quantitative pixelwise analysis. J Neurosci. 2009;29(9):2805-13.

131. Kale N. Optic neuritis as an early sign of multiple sclerosis. Eye Brain. 2016;8:195-202.

132. Costello F. Vision Disturbances in Multiple Sclerosis. Semin Neurol. 2016;36(02):185-95.

133. McAlpine D. Multiple sclerosis: a review. Br Med J. 1973;2(5861):292-5.

134. Hornabrook RSL, Miller D, Newton M, MacManus D, Du Boulay G, Halliday A, et al. Frequent involvement of the optic radiation in patients with acute isolated optic neuritis. Neurology. 1992;42(1):77-9.

135. 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.

136. Nieuwenhuys R, Voogd J, Van Huijzen C. The human central nervous system: a synopsis and atlas. 3rd ed. Amsterdam: Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH; 1988 [cited 2025 Dec 15]. Available from: The Human Central Nervous System: A Synopsis and Atlas | SpringerLink.

137. Goldstein A, Covington BP, Mahabadi N, Mesfin FB. Neuroanatomy, corpus callosum. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 uptaded 2023 Apr 3 [cited 2025 Dec 15]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448209/.

138. Batista S, Alves C, d'Almeida OC, Afonso A, Félix-Morais R, Pereira J, et al. Disconnection as a mechanism for social cognition impairment in multiple sclerosis. Neurology. 2017;89(1):38-45.

139. Narayanan S, Fu L, Pioro E, De Stefano N, Collins D, Francis G, et al. Imaging of axonal damage in multiple sclerosis: spatial distribution of magnetic resonance imaging lesions. Ann Neurol. 1997;41(3):385-91.

140. Rimkus Cde M, Junqueira Tde F, Callegaro D, Otaduy MC, Leite Cda C. Segmented corpus callosum diffusivity correlates with the Expanded Disability Status Scale score in the early stages of relapsing-remitting multiple sclerosis. Clinics (Sao Paulo). 2013;68(8):1115-20.

141. Xu L, Chang S-H, Yang L, Zhang L-J. Quantitative evaluation of callosal abnormalities in relapsing-remitting multiple sclerosis using diffusion tensor imaging: a systemic review and meta-analysis. Clin Neurol Neurosurg. 2021;201:106442.

142. Krzyżak AT, Lasek J, Schneider Z, Wnuk M, Bryll A, Popiela T, et al. Diffusion tensor imaging metrics as natural markers of multiple sclerosis-induced brain disorders with a low expanded disability status scale score. NeuroImage. 2024;290:120567.

143. Kolasa M, Hakulinen U, Brander A, Hagman S, Dastidar P, Elovaara I, et al. Diffusion tensor imaging and disability progression in multiple sclerosis: a 4-year follow-up study. Brain Behav. 2019;9(1):e01194.

144. Schilling KG, Rheault F, Petit L, Hansen CB, Nath V, Yeh F-C, et al. Tractography dissection variability: What happens when 42 groups dissect 14 white matter bundles on the same dataset? NeuroImage. 2021;243:118502.

145. Schilling KG, Tax CMW, Rheault F, Hansen C, Yang Q, Yeh F-C, et al. Fiber tractography bundle segmentation depends on scanner effects, vendor effects, acquisition resolution, diffusion sampling scheme, diffusion sensitization, and bundle segmentation workflow. NeuroImage. 2021;242:118451.

146. Chamberland M, Winter M, Brice TA, Jones DK, Tallantyre EC. Beyond lesion-load: tractometry-based metrics for characterizing white matter lesions within fibre pathways. In: Gyori N, Hutter J, Nath V, Palombo M, Pizzolato M, Zhang F, editors. Computational Diffusion MRI. International MICCAI Workshop; 2020 Oct. Cham: Springer; 2021. pp. 227–237. (Mathematics and Visualization).

147. Alotaibi A, Podlasek A, AlTokhis A, Aldhebaib A, Dineen RA, Constantinescu CS. Investigating microstructural changes in white matter in multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis of neurite orientation dispersion and density imaging. Brain Sci. 2021;11(9):1151.

148. Kornaropoulos EN, Winzeck S, Rumetshofer T, Wikstrom A, Knutsson L, Correia MM, et al. Sensitivity of diffusion MRI to white matter pathology: influence of diffusion protocol, magnetic

field strength, and processing pipeline in systemic lupus erythematosus. Front Neurol. 2022;13:837385.

149. Andica C, Kamagata K, Hatano T, Saito Y, Ogaki K, Hattori N, et al. MR biomarkers of degenerative brain disorders derived from diffusion imaging. J Magn Reson Imaging. 2020;52(6):1620-36.

150. Niccolini F, Su P, Politis M. PET in multiple sclerosis. Clin Nucl Med. 2015;40(1):e46-e52.

151. van der Weijden CWJ, Biondetti E, Gutmann IW, Dijkstra H, McKerchar R, de Paula Faria D, et al. Quantitative myelin imaging with MRI and PET: an overview of techniques and their validation status. Brain. 2022;146(4):1243-66.

152. Ferreira-Atuesta C, Reyes S, Giovanonni G, Gnanapavan S. The evolution of neurofilament light chain in multiple sclerosis. Front Neurosci. 2021;15:642384.

153. Cai L, Huang J. Neurofilament light chain as a biological marker for multiple sclerosis: a meta-analysis study. Neuropsychiatr Dis Treat. 2018;14:2241-54.

Abstract

Introduction: Multiple sclerosis is a chronic, immune-mediated neurological disease of the central nervous system, characterized by demyelination, inflammation, and axonal damage. It is sustained by acute inflammatory episodes that contribute to insidious forms of neurodegeneration, responsible for the silent progression throughout life. Conventional magnetic resonance imaging detects only part of the structural changes, while diffusion tensor imaging allows for the investigation of more subtle microstructural changes. **Purpose:** Compare diffusion tensor imaging metrics between multiple sclerosis patients who are able to ambulate without support and healthy controls. **Methods:** A cross-sectional study with 20 multiple sclerosis patients and 20 controls matched for age, sex, and education. Lesions were automatically segmented. Analyses included: whole-brain exploratory analysis using Tract-Based Spatial Statistics with and without lesion masking, correlation statistics in regions of interest, and probabilistic tractography under three conditions: standard reconstruction, exclusion of real lesions, and virtual lesion masking. **Results:** The first analysis revealed reduced fractional anisotropy and increased radial diffusivity in patients, primarily in the anterior corona radiata, posterior thalamic radiation, genu of the corpus callosum, and tapetum. No robust differences were observed in other metrics. In the second analysis, no significant differences were found between the expanded disability status scale and diffusion metrics. In probabilistic tractography of the corticospinal tract, an approach effect and interaction between groups were observed. **Conclusion:** The findings demonstrate that even in individuals with low clinical disability, it is possible to identify microstructural changes in the white matter through diffusion tensor imaging, even in regions of seemingly normal white matter. The tractography analysis shows that the presence of lesions may influence tract reconstruction, highlighting the methodological importance of masking strategies in the analyses.

Keywords: Multiple sclerosis; Diffusion tensor imaging; White matter; Magnetic resonance imaging

Apêndices

Apêndice 1. Modificações no script *fsl_reg*

Este apêndice apresenta as alterações realizadas no *script* do *fsl_reg* empregados no *pipeline* do TBSS, a fim de permitir o uso de *cost-function masking* durante as etapas de registro linear e não-linear.

O objetivo dessas modificações foi garantir que regiões lesionadas não contribuíssem para o cálculo da função de custo utilizada nos alinhamentos, evitando vieses decorrentes de reduções anormais de FA no tecido lesado.

Abaixo são apresentados os trechos originais e modificados do *script*.

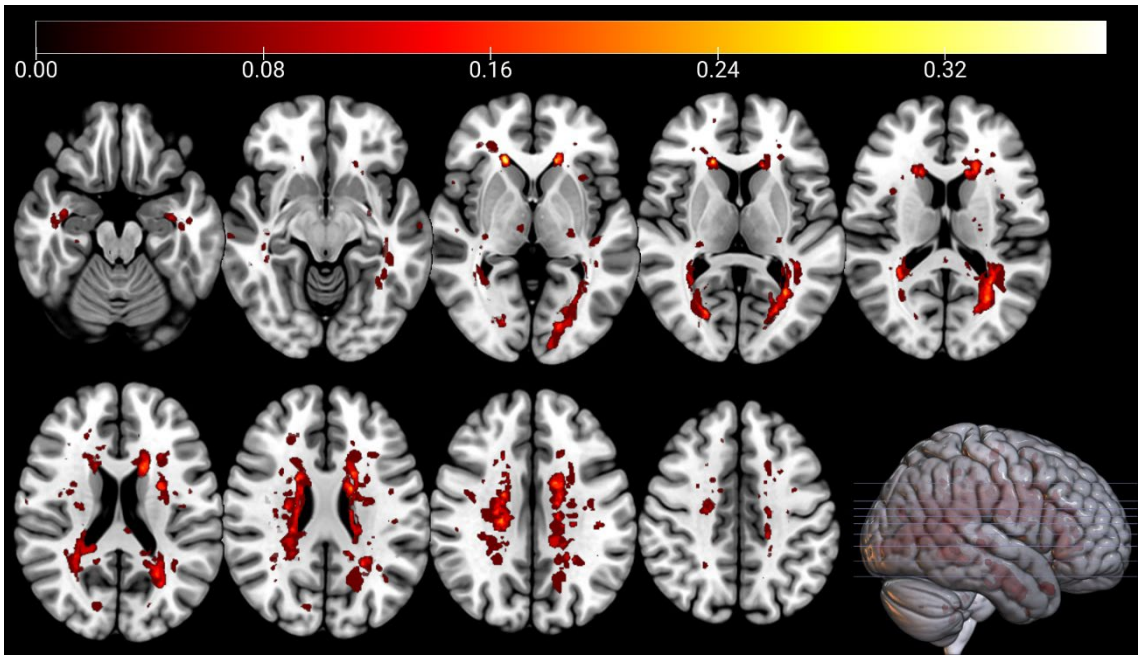
Apêndice 2. Mapa de probabilidade espacial das lesões

As máscaras binárias individuais de lesão, previamente obtidas por segmentação automática em imagens FLAIR e registradas para o espaço padrão MNI, foram utilizadas para a construção do mapa de probabilidade espacial.

Inicialmente, todas as máscaras individuais foram organizadas em um único volume 4D no espaço MNI, garantindo identidade de resolução espacial, dimensões e orientação. Em seguida, foi realizada a agregação *voxel*-a-*voxel* das máscaras individuais, de modo a representar, em cada *voxel*, a frequência relativa de ocorrência de lesão na amostra. A utilização de um mapa de probabilidade, em vez de valores absolutos de contagem, permite padronização independente do tamanho amostral e facilita a interpretação espacial da frequência de lesão.

A visualização foi realizada no software MRIcroGL (versão 1.2.20220720), utilizando o *template* anatômico MNI152 como imagem de fundo. Foi empregada organização em mosaico axial, restringindo as fatias ao intervalo de Z = -20 a 42 mm, de modo a priorizar regiões supratentoriais e evitar cortes inferiores e superiores com baixa relevância anatômica para o padrão lesional da doença.

Escalas de cores graduadas foram aplicadas para representar a magnitude da probabilidade, com ajuste manual do intervalo de visualização para otimizar contraste e legibilidade. As figuras 1 e 2 representam, respectivamente, o mapa de probabilidade das lesões no Grupo EM e Controle.



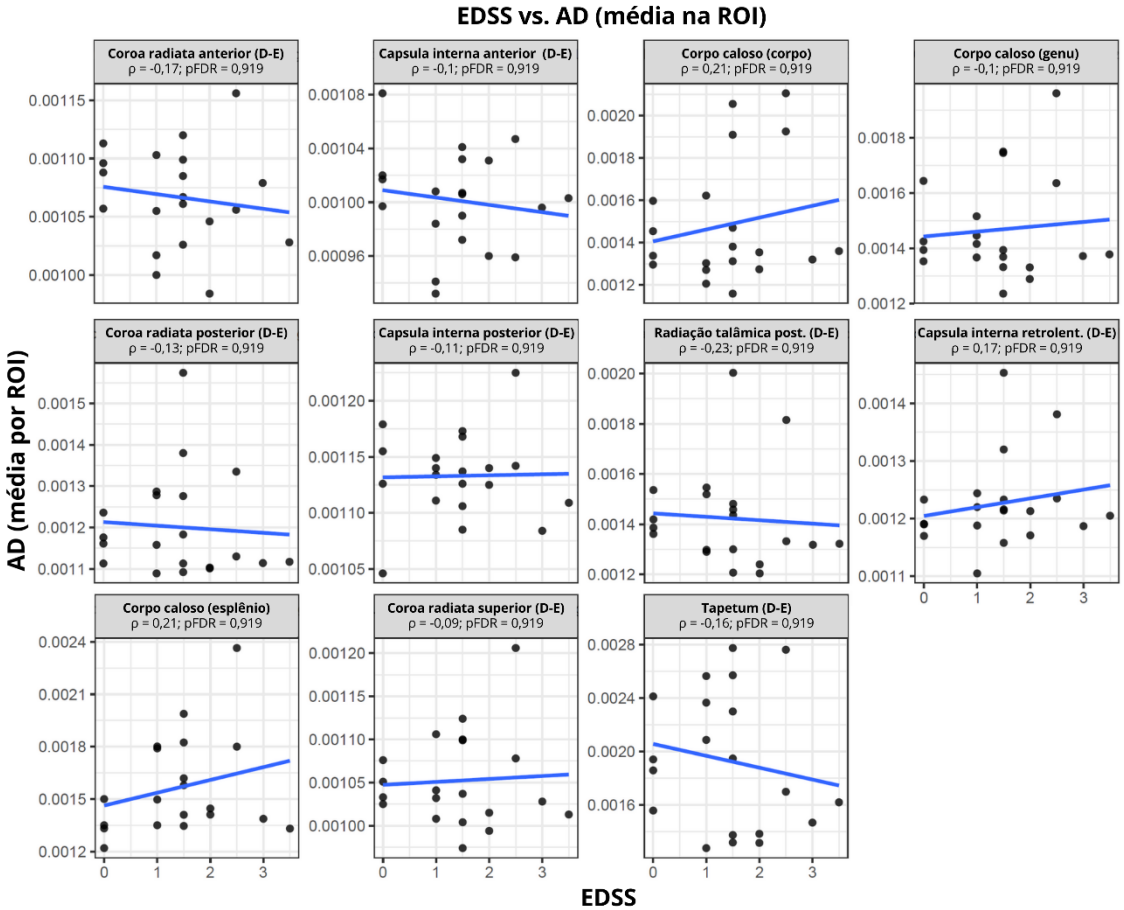
A escala de cores representa a frequência relativa de ocorrência de *voxels* classificados como lesão na amostra.

Figura 1. Mapa de probabilidade das lesões no Grupo EM, no espaço padrão MNI

Apêndice 4. Gráficos de dispersão entre EDSS e métricas do DTI nas ROIs

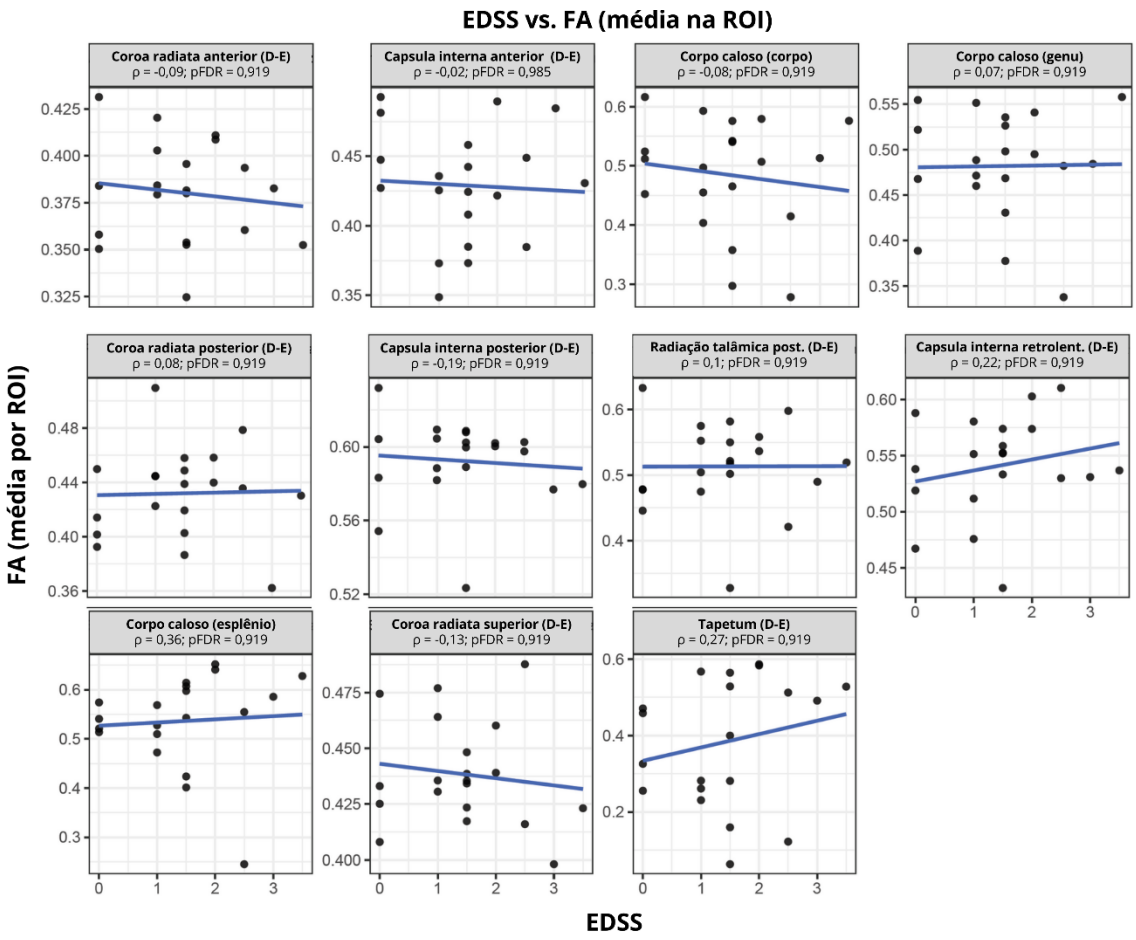
Este apêndice apresenta os gráficos de dispersão utilizados para avaliar a relação entre o EDSS e as métricas derivadas do DTI (FA, AD, RD e MD) nas 11 ROIs analisadas. Para cada métrica, é exibida uma figura contendo painéis separados por ROI, nos quais cada ponto representa um participante do Grupo EM.

As figuras de 7 a 10 incluem os valores individuais das métricas (média por ROI), o escore de EDSS correspondente, uma linha de tendência linear adicionada apenas para visualização destacado em azul, e os respectivos coeficientes de Spearman (ρ) e p-valores ajustados por FDR (pFDR) apresentados na barra superior de cada painel.



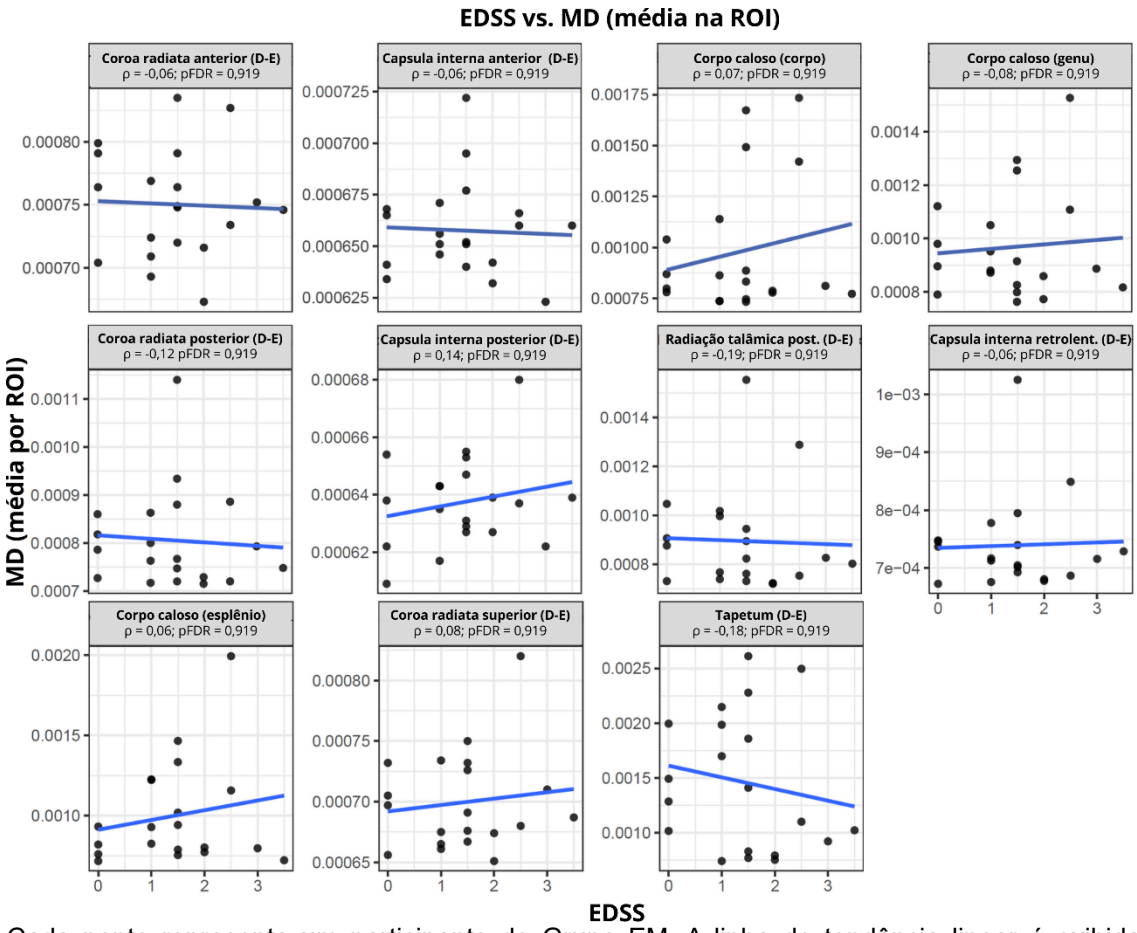
Cada ponto representa um participante do Grupo EM. A linha de tendência linear é exibida apenas para fins de visualização. Os painéis incluem os valores correspondentes do coeficiente de Spearman (ρ) e do valor-p ajustado pelo método de Benjamini–Hochberg (pFDR) para cada ROI. AD: difusividade axial; D: direita; E: esquerda; EDSS: *Expanded Disability Status Scale*; EM: esclerose múltipla; ROI:região de interesse.

Figura 7. Gráficos de dispersão ilustrando a relação entre o EDSS e os valores médios de AD nas 11 ROIs analisadas



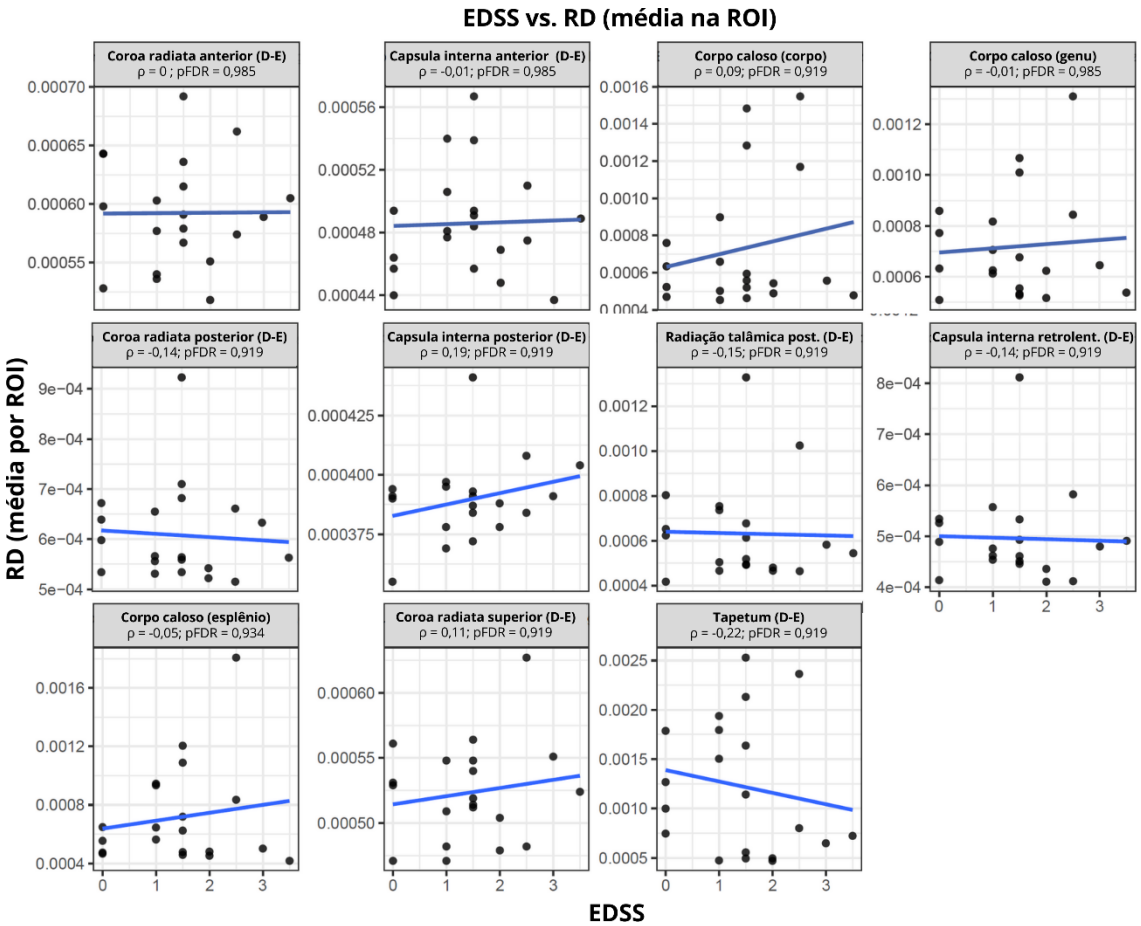
Cada ponto representa um participante do Grupo EM. A linha de tendência linear é exibida apenas para fins de visualização. Os painéis incluem os valores correspondentes do coeficiente de Spearman (ρ) e do valor-p ajustado pelo método de Benjamini–Hochberg (pFDR) para cada ROI. D: direita; E: esquerda; EDSS: *Expanded Disability Status* Scale; EM: esclerose múltipla; FA: anisotropia fracionada; ROI:região de interesse.

Figura 8. Gráficos de dispersão ilustrando a relação entre o EDSS e os valores médios de FA nas 11 ROIs analisadas



Cada ponto representa um participante do Grupo EM. A linha de tendência linear é exibida apenas para fins de visualização. Os painéis incluem os valores correspondentes do coeficiente de Spearman (ρ) e do valor-p ajustado pelo método de Benjamini–Hochberg (pFDR) para cada ROI. D: direita; E: esquerda; EDSS: *Expanded Disability Status* Scale; EM: esclerose múltipla; MD: difusividade média; ROI:região de interesse.

Figura 9. Gráficos de dispersão ilustrando a relação entre o EDSS e os valores médios de MD nas 11 ROIs analisadas



Cada ponto representa um participante do Grupo EM. A linha de tendência linear é exibida apenas para fins de visualização. Os painéis incluem os valores correspondentes do coeficiente de Spearman (ρ) e do valor-p ajustado pelo método de Benjamini–Hochberg (pFDR) para cada ROI. D: direita; E: esquerda; EDSS: *Expanded Disability Status* Scale; EM: esclerose múltipla; RD: difusividade radial; ROI: região de interesse.

Figura 10. Gráficos de dispersão ilustrando a relação entre o EDSS e os valores médios de RD nas 11 ROIs analisadas