Joselisa Péres Queiroz de Paiva

**IMAGEM POR TENSOR DE DIFUSÃO E TRACTOGRAFIA NO
ESTUDO DA FISIOPATOLOGIA DA SÍNDROME DAS PERNAS
INQUIETAS / DOENÇA DE WILLIS-EKBOM**

Tese apresentada à Faculdade Israelita de
Ciências da Saúde Albert Einstein para
obtenção do Título de Doutor em Ciências
da Saúde.

São Paulo

2020

Joselisa Péres Queiroz de Paiva

**IMAGEM POR TENSOR DE DIFUSÃO E TRACTOGRAFIA NO
ESTUDO DA FISIOPATOLOGIA DA SÍNDROME DAS PERNAS
INQUIETAS / DOENÇA DE WILLIS-EKBOM**

Tese apresentada à Faculdade Israelita de
Ciências da Saúde Albert Einstein para
obtenção do Título de Doutor em Ciências
da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Bastos
Conforto

Coorientadores: Prof. Dr. Edson Amaro
Junior e Prof. Dr. João Ricardo Sato

São Paulo

2020

P149i

Paiva, Joselisa Péres Queiroz de

Imagem por tensor de difusão e tractografia no estudo da fisiopatologia da síndrome das pernas inquietas/doença de Willis-Ekbom / Joselisa Péres Queiroz de Paiva. -- São Paulo, 2020.
xviii, 97 f.

Tese (Doutorado) – 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: *Diffusion tensor imaging and tractography in the study of the pathophysiology of restless legs syndrome/Willis-Ekbom disease.*

1. Síndrome das pernas inquietas. 2. Imagem de tensor de difusão.

NLM – WL 108

Elaborada pelo Sistema Einstein Integrado de Bibliotecas

FACULDADE ISRAELITA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE ALBERT EINSTEIN

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo

Joselisa Péres Queiroz de Paiva

**IMAGEM POR TENSOR DE DIFUSÃO E TRACTOGRAFIA NO ESTUDO
DA FISIOPATOLOGIA DA SÍNDROME DAS PERNAS INQUIETAS /
DOENÇA DE WILLIS-EKBOM**

Presidente da banca: Profa. Dra. Adriana Bastos Conforto

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:

Profa. Dra. Patrícia Maria de Carvalho Aguiar

Dr. Ellison Fernando Cardoso

Dra. Maria Concepción García Otaduy

Membros suplentes:

Dra. Sonia Maria Dozzi Brucki

Prof. Dr. Luis Otávio Sales Ferreira Caboclo

Aprovada em: 03/03/2020.

Dedicatória

Dedico com todo carinho esta tese à minha querida vó, dona Maria Aparecida, por seu bom humor, resiliência, força e, principalmente, por ser detentora do coração mais gentil, altruísta e amoroso que já conheci. Minha admiração e amor por ti são eternos.

Agradecimentos

Assim como a produção do conhecimento científico é uma construção coletiva, a trajetória transformadora de um doutorado não é - como muitos supõem - solitária. Por isso, deixo meu agradecimento geral a todos que contribuíram direta e indiretamente para a conclusão deste trabalho e, em especial:

Aos meus amados pais, Elisabete e José Nilton: minha eterna gratidão por terem acreditado e me apoiado neste desejo de largar o que era tido como certo e estável para viver meu sonho de ser neurocientista. Agradeço pelo incentivo a cada pequena vitória e pela paciência nos momentos de ausência.

Ao Zé Filipe: sou-lhe eternamente grata por ter me incentivado a seguir a vida acadêmica, quando esta ideia ainda era uma sementinha. Muito obrigada por ter ficado ao meu lado nos momentos mais difíceis. Seu apoio foi indispensável para que eu concluísse mais esta etapa.

À Dra. Adriana Conforto: meu apreço e sincera gratidão por ter me aceitado como estagiária em seu grupo e, depois como aluna de doutorado, mesmo sabendo que eu não tinha qualquer experiência em pesquisa com seres humanos. Muito obrigada por ter confiado em meu potencial ao embarcar em um projeto focado em neuroimagem; pela paciência de ouvir minhas ideias, pelas revisões detalhadas, pelo tempo e atenção dedicadas; por ter me convidado a colaborar nos seus outros projetos e, acima de tudo, por ter incentivado meu desenvolvimento como cientista. Agradeço por todos os ensinamentos, em especial sobre as técnicas de neuroestimulação, escrita e método científicos. Foi uma verdadeira honra tê-la como minha orientadora.

Estendo os agradecimentos aos demais colegas do grupo de neuroestimulação: Daniel Santos, Larissa Servinsckins, Marcela Takahashi, Rafael Luccas e, especialmente:

Ao Samir Magalhães, meu amigo querido, irmão de alma: um parágrafo não é suficiente para expressar o privilégio e gratidão que sinto de ter sido sua colaboradora. Agradeço por ter me acolhido como sua estagiária no decorrer do seu projeto, por ter me ensinado e respondido, sempre com tanta paciência, minhas inúmeras dúvidas técnicas e sobre a fisiopatologia da SPI. Aprendi muito observando sua ética profissional no recrutamento e triagem dos voluntários. Muito obrigada por

sempre valorizar minhas sugestões e por ter acreditado em minha capacidade científica para realizar este estudo.

À Danielle Boasquevisque, irmã-científica e amiga que tanto admiro: agradeço por ter me proporcionado a chance de colaborar consigo em seu projeto. Sua dedicação inabalável à pesquisa e o desejo de se superar sempre me motivaram. Muito obrigada, também, pelo apoio e pelos momentos de descontração.

Aos meus coorientadores, Dr. Edson Amaro Jr e Prof. João Sato, pelo incentivo e suporte essenciais ao desenvolvimento deste projeto. Agradeço também à Joana Balardin, Liana Sanches e à Luciana Moura, pela troca de figurinhas em neuroimagem. Muito obrigada aos membros da banca de qualificação e defesa, com destaque para a Prof. Patrícia Aguiar, Dra Maria Otaduy e Dr. Ellison Cardoso.

Aos que contribuíram com meditações, café, chocolate, cerveja, música e risadas, tornando esta trajetória mais leve e prazerosa, com destaque para: Andréia Balbino, Camilla Aquemi, Cássia Coelho, Daniele Vilela, Diego (Vô), Elisa Kozasa, Fábio Munhoz, Hudson Roger, Iago de Oliveira, Karina Fatima, Luiz Fernando Albuquerque, Maria Adélia Aratanha, Maurício Caetano (Puff), Nadja Shinyashiki, Raquel Nakasone, Rui Afonso, Vinícius Leati e amigos do Via Solis. Meu agradecimento especial à Camila Sardeto e ao Maurício Watanabe, colegas de doutorado e amigos que levo para a vida: por todas as vezes que compartilharam sua sabedoria budista, por terem me acolhido em suas casas, me apoiado nos momentos difíceis e pela companhia agradável nas semanas em que trabalhamos, lado a lado, dedicados às nossas teses.

Agradeço meus professores e amigos da Neuro-UFABC, em especial à minha orientadora de mestrado (Profa. Raquel Fornari), à Profa. Tatiana Ferreira e Profa. Paula Tiba, assim como aos queridos amigos neurocientistas Daniel Moreira, Estela Braga, Moisés Corrêa e Samanta Rodrigues. Agradeço, também, aos amigos do projeto PROADI MARIA pela convivência e ensinamentos, em especial ao Birajara Machado, Carlos Baltazar, Luiz Vittorelli, Marcelo de Araújo e aos colegas do ZIKA.

Por fim, agradeço à Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Albert Einstein pelo seu apoio à pesquisa científica; à coordenação do Programa de Ciências da Saúde (em especial, à Laudiceia Almeida e Jaciele Conceição pela dedicação e por estarem sempre dispostas a ajudar) e ao núcleo de assistência ao pesquisador (em especial, à Aline Pacífico e à Sandra Malagutti). Agradeço, também, à Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, processo 88882.366123/2019-01) pelo apoio financeiro.

“Existem muitas hipóteses erradas na Ciência. Isso é perfeitamente aceitável: é a abertura para que encontremos as que estão certas”.

(Carl Sagan. Episódio 4 da série Cosmos, 1990).

Sumário

Dedicatória	v
Agradecimentos.....	vi
Lista de figuras	xii
Lista de abreviaturas e símbolos	xiv
Resumo	xvii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos.....	8
2 REVISÃO DA LITERATURA	9
2.1 Síndrome das pernas inquietas/doença de Willis-Ekbom.....	9
2.1.1 Histórico, definições e impacto	9
2.1.2 Teorias fisiopatológicas	13
2.1.2.1 Excitabilidade cortical e periférica.....	13
2.1.2.2 Disfunção na integração sensorio-motora	13
2.1.2.3 Disfunção do metabolismo de ferro	16
2.1.2.4 Teoria da ativação da via de hipóxia	17
2.1.2.5 Disfunção dopaminérgica	18
2.1.2.6 Interação do ferro e dopamina.....	19
2.1.2.7 Hipótese glutamatérgica	20
2.1.2.8 Hipótese de disfunção adenosinérgica	21
2.1.2.9 Hipótese genética e de alterações no desenvolvimento	22
2.1.2.10 Alterações estruturais e funcionais	23
2.2 Imagem ponderada em difusão	25
2.3 Imagem por tensor de difusão	27
2.3.1 Significado das métricas de Imagem por tensor de difusão	30
2.3.2 Controle de qualidade e pré-processamento de imagens por tensor de difusão..	32
2.3.3 Pós-processamento de Imagem por tensor de difusão	33
2.3.3.1 Tractografia	34
2.4 Estudos de imagem por tensor de difusão em síndrome das pernas inquietas.....	36
3 MÉTODOS	38
3.1 Participantes.....	38
3.1.1 Critérios de elegibilidade	38

3.1.2 Características dos participantes.....	39
3.2 Desenho experimental.....	40
3.2.1 Desfechos esperados.....	40
3.2.2 Protocolo de aquisição de imagens de ressonância magnética	41
3.2.3 Processamento das sequências de imagem por tensor de difusão.....	41
3.2.4 Pré-processamento	41
3.2.5 Análise por estatística espacial baseada em tratos	42
3.2.6 Análise por região de interesse	43
3.2.7 Tractografia	44
3.3 Análise estatística.....	44
3.3.1 Análise estatística da amostra.....	44
3.3.2 Desfecho primário: estatística espacial baseada em tratos	45
3.3.3 Desfechos secundários: análises de região-de-interesse e tractografia.....	46
3.4 Aspectos éticos	46
4 RESULTADOS	47
4.1 Características da amostra final	47
4.2 Características demográficas e clínicas dos participantes	48
4.3 Desfecho principal: estatística espacial baseada em tratos	49
4.4 Desfechos secundários	53
4.4.1 Análise baseada em região de interesse.....	53
4.4.2 Tractografia	55
5 DISCUSSÃO	57
5.1 Análise exploratória de cérebro inteiro com estatística espacial baseada em tratos.....	58
5.1.1 Radiação talâmica posterior: relevância funcional e envolvimento na síndrome das pernas inquietas e em outras condições.....	59
5.1.2 Coroa radiada posterior: relevância funcional e envolvimento na síndrome das pernas inquietas e em outras condições	60
5.2 Análise por regiões de interesse	61
5.2.1 Cerebelo: relevância funcional e envolvimento na SPI e em outras condições....	62
5.3 Análise por trato de interesse (tractografia).....	63
5.4 Limitações	64
6 CONCLUSÕES	65
7 ANEXOS.....	66
8 REFERÊNCIAS	80

Abstract
Apêndices

Lista de figuras

- Figura 1.** Modelo para estimativa do tensor - A partir da medida obtida da difusão da água em diferentes eixos (A), estima-se o formato e orientação do tensor, aqui representado como uma elipsoide (B), cujo eixo maior representa a direção principal da difusão e, portanto, da orientação do trato (C). Um mapa de anisotropia (D) é gerado a partir deste modelo, em que regiões escuras são isotrópicas (elipsoide esférica) e regiões claras são anisotrópicas (elipsoide alongada). A informação de orientação é convertida para cor (F). Ao combinarmos intensidade da anisotropia (D) e cor (F), obtemos um mapa de FA codificado por cor (E)29
- Figura 2.** Exemplos de Imagem por Tensor de Difusão (DTI) e Tractografia – (A) Típico mapa de anisotropia fracionada (FA) com codificação da direção preferencial por cores obtido após processamento DTI. (B) Resultado de tractografia determinística36
- Figura 3.** Fluxograma de recrutamento e inclusão no estudo48
- Figura 4.** Resultados da análise de estatística espacial baseada em tratos – Clusters significativos, no que se refere à comparação entre: (A) SPLtot e controles, diminuição de difusividade axial em sujeitos com síndrome das pernas inquietas, em cluster na radiação talâmica posterior esquerda; (B) sujeitos e controle50
- Figura 5.** Gráfico de diagrama de caixa (*boxplot*) dos valores da difusividade axial extraídos do cluster significativo revelado na análise de estatística espacial baseada em tratos entre controles e o grupo de todos os portadores de Síndrome das pernas inquietas – A localização do cluster corresponde à radiação talâmica posterior esquerda. O quadro inferior apresenta o mesmo *boxplot* ampliado para facilitar a visualização51
- Figura 6.** Diagrama de caixa (*boxplot*) dos valores da difusividade axial extraídos do cluster significativo revelado na análise de estatística espacial baseada em tratos entre controles e portadores das formas grave a muito grave de síndrome das pernas inquietas – (A) Valores de difusividade axial extraídos do cluster significativo revelado na análise de estatística espacial baseada em tratos entre controles e portadores das formas grave a muito grave de síndrome das pernas inquietas – (A) Valores de difusividade axial extraídos do cluster significativo revelado na análise de estatística espacial baseada em tratos entre controles e portadores das formas grave a muito grave de síndrome das pernas inquietas grave, correspondendo à coroa radiada

posterior esquerda. O quadro inferior apresenta o mesmo *boxplot* ampliado para facilitar a visualização. Valores são exibidos como mediana $\pm$ erro padrão. (B) Gráfico de dispersão mostra correlação significativa entre os valores de difusividade axial em portadores das formas grave a muito grave de síndrome das pernas inquietas e a escala de gravidade de sintomas de síndrome das pernas inquietas do Grupo Internacional de Estudos em Síndrome das Pernas Inquietas52

Figura 7. Localizações anatômicas das seis regiões de interesse corticais e subcorticais alvo deste estudo.....53

Figura 8. Diagrama de caixa (*boxplot*) dos valores da difusividade radial (RD) extraídos da ROI correspondente ao pedúnculo cerebelar superior entre controles e SPImg – O quadro inferior apresenta o mesmo *boxplot* ampliado para facilitar a visualização55

Figura 9. Os dois tratos de interesse no espaço padrão (FMRIB58_FA) reconstruídos via tractografia probabilística em sujeito representativo da amostra56

Lista de abreviaturas e símbolos

3D	Tridimensional
A11	Núcleo de neurônios dopaminérgicos no diencéfalo
A1R	Subtipo 1 de receptor de adenosina, difundido no cérebro
A2R	Subtipo 2 de receptor de adenosina, concentrado no estriado
AD	Difusividade axial (<i>Axial diffusivity</i>)
AMPA-R	Receptor pós-sináptico de glutamato do tipo AMPA, alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico, parte da família de receptores ionotrópicos de glutamato
<i>b value</i>	b-valor: duração, amplitude e intervalo entre dois gradientes de uma sequência pesada em difusão
B ₀	Campo magnético estático e principal produzido pelo <i>scanner</i> da RM
BVEC	Tábua de codificação das direções de gradiente (<i>Gradient vector direction table</i>)
CAAE	Certificado de Apresentação para apreciação Ética
D1	Subtipo 1 do receptor de dopamina
D2	Subtipo 2 do receptor de dopamina
DMN	Rede neural de modo padrão (<i>Default mode network</i>)
DP	Desvio-padrão
DTI	Imagem por tensor de difusão (<i>Diffusion tensor imaging</i>)
DWI	Imagem ponderada em difusão (<i>Diffusion weighted image</i>)
EPI	Imagem eco-planar (<i>Echo-planar imaging</i>)
FA	Anisotropia fracionada
FDR	Taxa de falsas descobertas (<i>False discovery-rate</i>)
fMRI	Imagem de ressonância magnética funcional (<i>Functional magnetic resonance imaging</i>)
FOV	Campo de visão (<i>Field-of-view</i>)
FSL	FMRIB's Software Library
FWE	Taxa de erro da família dos testes (<i>Family-wise error</i>)
HARDI	Imagem de difusão de alta resolução angular (<i>High angular resolution diffusion coefficient</i>)

IRLSS	Escala de gravidade de sintomas de síndrome das pernas inquietas do Grupo Internacional de Estudos em Síndrome das Pernas Inquietas (<i>International Restless Legs Syndrome Scale</i>)
IRLSSG	Grupo Internacional de Estudos em Síndrome das Pernas Inquietas (<i>International Restless Legs Syndrome Study Group</i>)
LAI	Inibição aferente de longa latência (<i>Long-latency afferent inhibition</i>)
MD	Difusividade média (<i>Mean diffusivity</i>)
MRI	Imagem por ressonância magnética (<i>Magnetic resonance imaging</i>)
PET	Tomografia por emissão de pósitrons (<i>Positron emission tomography</i>)
PLM	Movimentos periódicos dos membros (<i>Periodic limb movement</i>)
RD	Difusividade radial (<i>Radial diffusivity</i>)
ROC	Curva da característica de operação do receptor (<i>Receiver operating characteristic curve</i>)
ROI	Região-de-interesse (<i>Region of interest</i>)
rsfMRI	Modalidade em que a fMRI é adquirida durante o estado de repouso cerebral (<i>Resting state functional magnetic resonance imaging</i>)
rTMS	Estimulação magnética transcraniana repetitiva (<i>Repetitive transcranial magnetic stimulation</i>)
SAI	Inibição aferente de curta latência (<i>Short-latency afferent inhibition</i>)
SGPP	Sistema Gestor de Projetos de Pesquisa
SNR	Razão sinal-ruído (<i>Signal-to-noise ratio</i>)
SPECT	Tomografia computadorizada por emissão de fóton único (<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i>)
SPI	Síndrome das pernas inquietas/Doença de Willis-Ekbom
SPI _{lm}	Subgrupo de portadores de SPI com intensidade leve a moderada
SPI _{mg}	Subgrupo de portadores de SPI com intensidade grave a muito grave
SPI _{tot}	Grupo de todos os portadores de SPI, independentemente da gravidade
SPM	Mapeamento Paramétrico Estatístico de Processamento de Neuroimagem (<i>Software Statistical Parametric Mapping</i>)
T	Tesla, a unidade de medida para densidade de fluxo magnético
T1	Constante de tempo que descreve a recuperação da componente de magnetização transversa
T2	Constante de tempo que descreve a recuperação da componente de magnetização longitudinal

TBSS	Estatística espacial baseada em tratos (<i>Tract based spatial statistics</i>)
TCE	Trato corticoespinal
TFCE	Correção aprimorada de cluster livre de limiar (<i>Threshold-free cluster enhancement</i>)
TE	Tempo ao eco (<i>Time of echo</i>)
TMS	Estimulação magnética transcraniana (<i>Transcranial magnetic stimulation</i>)
TR	Tempo de repetição (<i>Time of repetition</i>)
VBM	Morfometria baseadas em voxel (<i>Voxel based morphometry</i>)
<i>Voxel</i>	Elemento de volume (<i>Volume element</i>)
$\alpha 2\delta$	Subunidade do complexo que forma os canais de cálcio dependentes de voltagem
λ_1	Maior autovalor (<i>eigenvalue</i>), representando o coeficiente aparente de difusão ao longo de uma determinada direção ou fibra
λ_2 ou λ_3	Coeficientes aparentes de difusão perpendiculares à fibra
ω_0	Frequência de precessão de <i>spin</i> , parte da equação de Larmor

Resumo

Introdução: A síndrome das pernas inquietas, também conhecida como doença de Willis-Ekbom, tem como causas sugeridas a deficiência central de ferro, a perda da modulação inibitória das vias motoras centrais descendentes, mudanças estruturais no córtex somatossensorial, conectividade anormal entre áreas motoras e sensoriais, bem como anormalidades na micro-organização da substância branca. **Objetivos:** Neste estudo, comparamos as métricas de imagem por tensor de difusão entre sujeitos com síndrome das pernas inquietas primária e controles. **Métodos:** Métricas de imagem por tensor de difusão foram avaliadas em 38 indivíduos com síndrome das pernas inquietas (14 com sintomas leves ou moderados, 24 com sintomas graves ou muito graves) e 24 controles saudáveis, com idade e sexo comparáveis, por meio de análises com Estatística Espacial Baseada em Tratos (*Tract based spatial statistics*, TBSS), região de interesse e tractografia probabilística. As regiões de interesse foram o trato corticoespinal ao nível do pedúnculo cerebral; os pedúnculos cerebelares superior, médio e inferior, bem como as áreas que englobam *clusters* para os quais foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos na análise exploratória de cérebro inteiro por estatística espacial baseada em tratos. Análises de subgrupos foram feitas de acordo com a gravidade dos sintomas da síndrome das pernas inquietas. Para a análise baseada em tractografia, os tratos de interesse foram o trato corticoespinal e a radiação talâmica posterior. Também exploramos associações entre resultados significativos e a gravidade dos sintomas com a correlação de Spearman. **Resultados:** Nossos resultados, obtidos a partir do TBSS, mostraram diminuição da difusividade axial na radiação talâmica posterior esquerda no grupo de portadores da síndrome das pernas inquietas. Em indivíduos com síndrome das pernas inquietas grave, a difusividade axial estava reduzida na coroa radiada posterior esquerda. Houve uma correlação significativa, inversa, entre a gravidade dos sintomas da síndrome das pernas inquietas. Por sua vez, a análise baseada em regiões de interesse mostrou aumento de difusividade radial nos pedúnculos cerebelares superiores de indivíduos com síndrome das pernas inquietas. Por fim, a tractografia não revelou diferenças entre grupos ou subgrupos. **Conclusões:** Nossos resultados são consistentes com mudanças sutis na organização microestrutural da substância branca, principalmente em indivíduos com síndrome das pernas inquietas

com sintomas mais graves, em áreas relacionadas à integração multissensorial ou sensório-motora.

Descritores: Síndrome das pernas inquietas; Imagem de tensor de difusão

1 INTRODUÇÃO

A síndrome das pernas inquietas (SPI), também conhecida como doença de Willis-Ekbom, é um distúrbio sensório-motor neurológico potencialmente incapacitante, caracterizado por desejo de mover os membros (principalmente as pernas) associado a sensações desagradáveis, as quais geralmente começam ou pioram durante o repouso. Este desconforto é aliviado temporariamente pelo movimento do membro afetado. Os sintomas aflitivos afetam a qualidade de vida e representam uma sobrecarga econômica substancial para a sociedade.⁽¹⁾

Mecanismos subjacentes à SPI ainda não são completamente compreendidos. Sugere-se que esta condição possa ser causada por deficiência de ferro no cérebro;⁽²⁾ por disfunção dopaminérgica;⁽³⁻⁷⁾ perda da modulação inibitória sobre as vias motoras descendentes;⁽⁸⁻¹⁰⁾ mudanças estruturais no córtex motor primário,⁽¹¹⁾ no córtex somatossensorial⁽¹²⁾ e no tálamo;⁽¹³⁾ alterações funcionais no tálamo⁽¹³⁻¹⁶⁾ e no cerebelo;⁽¹⁷⁾ conectividade anormal entre áreas motoras e sensoriais;^(18,19) bem como anormalidades diversas na micro-organização da substância branca.⁽¹⁴⁾

Embora diversas teorias fisiopatológicas tenham sido propostas, déficits no processamento sensorial central^(20,21) e de integração sensório-motora⁽²²⁻²⁴⁾ têm ganhado destaque como causas potenciais da SPI. Os córtices sensoriais e motores primários estão altamente interconectados⁽²⁵⁾ e alterações estruturais ou funcionais nas projeções aferentes ou eferentes dessas áreas podem estar envolvidas na síndrome. O trato corticoespinal, em particular, exerce controle descendente das funções nociceptivas e motoras, além da modulação da plasticidade de longa duração dos circuitos da medula espinal.⁽²⁶⁾

Além disso, estudos têm tradicionalmente descrito baixos níveis no sistema nervoso central das proteínas responsáveis pelo armazenamento e transporte de ferro, assim como redução na expressão de proteínas integrais de mielina em pacientes de SPI, sugerindo déficits em mielinização provocado pela redução de ferro central.⁽²⁾

A técnica de imagem por tensor de difusão (DTI – *diffusion tensor imaging*) é um método útil para a avaliação da micro-organização da substância branca.⁽²⁷⁾ Trata-se de uma estratégia não-invasiva que modela a difusão de moléculas

de água por meio do tensor, um construto matemático.⁽²⁸⁾ A partir do tensor, podem ser estimadas métricas como a anisotropia fracionada (FA – *fractional anisotropy*), difusividade axial (AD – *axial diffusivity*), difusividade média (MD – *mean diffusivity*) e difusividade radial (RD – *radial diffusivity*), para descrever indiretamente propriedades da substância branca. Em geral, a FA é mais sensível a alterações inespecíficas da substância branca, enquanto a diminuição de AD pode indicar lesão axonal. MD é uma medida inversa aproximada de densidade de membrana e o aumento de RD pode refletir des- ou demielinização, bem como alterações no diâmetro ou densidade axonal.^(29,30) Desse modo, pode-se quantificar o coeficiente de difusão relativo das moléculas de água em diferentes direções, em cada elemento de volume (*voxel – voxel element*) da imagem adquirida, permitindo inferências sobre a organização, compactação e grau de mielinização das fibras que compõem os tratos.⁽²⁸⁾

Nos tratos de substância branca, a difusão das moléculas é mais restrita perpendicularmente do que paralelamente às fronteiras de sua microestrutura. Esse fenômeno é denominado difusão anisotrópica. É possível descrever a direção do movimento das moléculas de água no interior dos tecidos por meio de mapas anisotrópicos. Nesses mapas, a direção principal estimada para cada *voxel* é codificada em cores. A DTI também permite visualizar de forma não-invasiva a substância branca através da técnica de tractografia, a qual possibilita o rastreamento de feixes de modo individual.⁽²⁷⁾

A avaliação de imagens de DTI adquiridas de portadores de diferentes gravidades de SPI pode ser uma ferramenta útil na elucidação da neurobiologia subjacente à SPI e, possivelmente, na identificação de marcadores de vulnerabilidade a esta condição.^(28,31) Entretanto, os resultados dos escassos estudos prévios de DTI na SPI são heterogêneos (Tabela 1). Em geral, os principais resultados apontam para o envolvimento de estruturas relacionadas à função sensorial ou motora, bem como à integração sensório-motora.^(32,33)

As inconsistências nos resultados obtidos entre os estudos podem ser atribuídas a amostras pequenas, além de diferentes parâmetros de aquisição ou métodos distintos de pós-processamento.^(34–36)

Entre as estratégias de pós-processamento, até agora, apenas análises de exploração de cérebro-inteiro (*whole-brain analysis*), como a Estatística Espacial baseada em tratos (TBSS – *tract-based spatial statistics*)⁽³⁷⁾ e a Morfometria Baseada em *Voxel* (VBM – *Voxel-based morphometry*)⁽³⁸⁾ – haviam sido adotadas na

comparação da substância branca entre indivíduos com SPI e controles. O TBSS é considerado mais robusto do que o VBM,^(34,39–41) mas pode ser menos sensível para detectar diferenças sutis entre grupos nas áreas corticais próximas da substância branca,⁽⁴²⁾ quando comparado a métodos baseados na análise de região-de-interesse (ROI – *region of interest*),⁽⁴³⁾ tais como as regiões selecionadas com base em atlas ou obtidas por tractografia probabilística. Por outro lado, os tratos adjacentes nem sempre são separáveis, especialmente nas áreas de cruzamento de fibras, e a tractografia probabilística^(27,44,45) pode fornecer informações complementares ao permitir a extração de parâmetros quantitativos de DTI de tratos isolados.

Tabela 1. Revisão dos estudos de imagem por tensor de difusão na síndrome das pernas inquietas

Estudo/Ano	Tamanho amostral (SPI e controles)	Características dos sujeitos portadores de SPI	Técnicas de processamento (software)	Aquisição DWI	Processamento e análise estatística	Resultados
Unrath et al.(2008) ⁽³²⁾	45/30	Sexo (H/M): 13/32 (71% mulheres), Idade (anos): 59,9 ± 10,2 Duração da doença (anos): 21,6 ± 18,7, Escala IRLSS: 28,1 ± 6,6 (grave a muito grave), História familiar positiva em 14 (31,1%), 37 (82,2%) em tratamento dopaminérgico e 3 (0,06%) com opioides. PLM presente em 40 (88,9%).	DTI-VBA (TIFT).	Scanner: 1,5T, Direções de gradiente: 12 (800 s/mm ²) e 1 B0, Tamanho do voxel: 1,5 mm ³ , Repetições: 4.	Pré-processamento padrão, exceto que as imagens foram normalizadas para um <i>template</i> especificamente criado com base no scanner e na sequência. Teste estatístico: teste t de Student; P <0,05 corrigido para múltiplas comparações com FDR. Análise restrita a FA.	Várias áreas subcorticais de FA reduzido bilateralmente, perto dos córtices motor e somatossensorial primário e secundários, do tálamo direito (núcleo ventral póstero-lateral), em fibras motoras de projeção e adjacentes à cápsula externa anterior esquerda.
Rizzo et al.(2012) ⁽⁴⁶⁾	20/20	Sexo (H/M): 7/13 (65% mulheres), Idade (anos): 50 ± 9, Duração da doença (anos): 10 ± 9, Escala IRLSS: 22 ± 7 (moderado a grave), História familiar positiva em 8 (40%), 8 (40%) SPI em tratamento dopaminérgico, <i>Washout</i> : 2 semanas.	DTI-VBA (SPM 8) e TBSS (FSL).	Scanner: 1,5 T, Direções de gradiente: 6 (900 s/mm ²) e 1 B0.	Pré-processamento padrão. TBSS (com parâmetros padrão). Testes estatísticos: GLM com sexo, idade e tratamento como covariáveis e uma regressão linear entre métricas de DTI e IRLSS, idade de início dos sintomas e duração da doença. P < 0,05 (corrigido e <u>não-corrigido</u> para múltiplas comparações). Análise completa (FA, AD, MD e	TBSS: Nenhum resultado significativo em todas as análises com P <0,05 corrigido para múltiplas comparações. VBA-DTI: Com P <0,001 não corrigido, diminuição de FA e aumento de RD em substância branca no cerebelo em indivíduos SPI; correlação de MD e AD com IRLSS em WM em região sensorial-motora esquerda e esplênio do corpo caloso; e entre MD, AD e RD com a duração da

continua...

...continuação

Chang et al.(2014) ⁽⁴⁷⁾	22/22	Sexo (H/M): 3/19 (86,4% mulheres), Idade (anos): 54,5 ± 14,6, Duração da doença (anos): 10,8 ± 8,9, Escala IRLSS: 25,5 ± 5,8 (moderado a muito grave), História familiar positiva não mencionada, 4 (18,2%) SPI em tratamento dopaminérgico.	DTI-VBA (SPM 5).	Scanner 3,0T, Direções de gradiente: 15 (1000 s/mm ²) e 1 B0, 2 repetições. Tamanho do voxel: 2 mm ³	RD). Pré-processamento padrão, exceto que as imagens DWI foram co-registradas com imagens estruturais (T1). <i>Smoothing</i> (suavização) foi aplicada com kernel gaussiano (8 mm) nas imagens paramétricas. Os testes estatísticos: teste t de Student; P > 0,05 corrigido para múltiplas comparações com FWE, controlando para sexo. Regressão entre métricas de DTI, gravidade e duração da doença. Análises restritas a FA, AD e RD.	doença em WM pré-frontal direita. VBM: FA diminui, juntamente com aumento de AD e RD, no genu do corpo caloso e WM frontal adjacente ao giro frontal inferior (Brodmann 10) em indivíduos SPI. Correlações negativas entre a versão coreana da IRLSS e FA extraído de WM frontal adjacente ao giro frontal inferior. Correlação positiva entre esta mesma escala e AD da mesma região.
Belke et al.(2015) ⁽³³⁾	12/12	Sexo (H/M): 3/9 (75% mulheres), Idade (anos): 58,5 ± 8,35 Duração da doença (anos): 12,1 ± 8,74, Escala IRLSS não mencionado (6 moderados e 6 graves), História familiar positiva em 4 (33%), 8 (66%) pacientes em tratamento dopaminérgico.	DTI-VBA (FSL) e TBSS (FSL).	Scanner: 1,5 T, Direções de gradiente: 30 (1000 s/mm ²) e 5 B0, sem repetição, Tamanho do voxel: 2 mm ³	Pré-processamento padrão. TBSS (configuração padrão, com exceção de um passo adicional de suavização (6 mm) aplicada ao esqueleto com software desenvolvido pelo grupo de pesquisa. Os testes estatísticos para TBSS foram rodados no AFNI (12.000 permutações, P <0,01), uso de covariáveis	DTI-VBA: sem alterações. TBSS: aumento e diminuição de FA em várias áreas sub-corticais bilateralmente, principalmente em região temporal, bem como na cápsula interna direita, ponte e o cerebelo direito. Algumas dessas alterações foram acompanhadas de aumento tanto em RD como em AD.

continua...

...continuação

Lindemann et al.(2016) ⁽⁴⁸⁾	25/25	Sexo (H/M): 8/17 (68% mulheres), Idade (anos): 63,2 ± 10,3 Duração da doença (anos): 11,6 ± 9,5, Escala IRLSS: 27 ± 9 (moderado a muito grave), História familiar positiva não mencionada, 23 (92%) SPI em tratamento dopaminérgico, <i>Washout</i> : de 6h a 24h.	DTI-VBA (TIFT)	Scanner: 1,5 T, Direções de gradiente: 30 (800 s/mm ²) e 2 B0, Repetições: 2 Tamanho do voxel: 2,5 mm ³	no modelo GLM não mencionado. Análises restritas a FA, AD e RD. Pré-processamento padrão. <i>Smoothing</i> (suavização) foi aplicada com kernel gaussiano (8 mm) nas imagens paramétricas. Teste estatístico: teste t de Student; P < 0,05 corrigido para comparações múltiplas com FDR. Análise restrita a FA.	FA diminuído no mesencéfalo em dois <i>clusters</i> na substância negra em SPI. Porém, as alterações não se correlacionaram com a duração da doença.
Zhuo et al.(2017) ⁽⁴⁹⁾	32/26	Sexo (H/M): 13/22 (68,7% mulheres), Idade (anos): 51,83 ± 16,48, Duração da doença (anos): 15,78 ± 14,61 Escala IRLSS: 24,53 ± 6,71 (moderado a muito grave), História familiar positiva em 13 (37%), Todos pacientes sem uso prévio de medicação para SPI (<i>drug naïve</i>).	TBSS (FSL).	Scanner: 3,0 T com 8 canais de bobina, Direções de gradiente: 15 (1000 s/mm ²) e 1 B0.	Pré-processamento padrão. TBSS com configuração padrão, exceto para o limiar definido como "muito menor" do que 0,2 para o esqueleto médio, conforme descrição. Testes estatísticos: TBSS- <i>Randomise</i> (número de permutações não mencionado, uso de covariáveis no modelo GLM não relatado). Análise restrita a FA e MD.	TBSS: nenhuma diferença significativa entre grupos.

continua...

...continuação

Nosso estudo (2020) ⁽⁵⁰⁾	38/24 15 leve a moderado (4 leve, 11 moderado) 23 grave a muito grave (15 grave, 8 muito grave)	Sexo (H/M): 9/29 (76,3% mulheres), Idade (anos): 46,51 ± 13,75 Duração da doença (anos): 19,65 ± 15,11 Escala IRLSS: 21,86 ± 8,63 História familiar positiva: 71% tratamento dopaminérgico: 6 (15,78%), PLM presente em 33 (86%), <i>Washout</i> : 1 semana.	TBSS, ROI e tractografia (FSL - 5.0.10).	Scanner: 3,0 T com 32 canais de bobina, Direções de gradiente: 30 (1000s/mm ²) e 5 B0, Repetição: 1, Tamanho do voxel: 2 mm ³	Pré-processamento padrão, incluindo passos adicionais como rotação dos <i>bvec</i> . TBSS com configuração padrão. Análise por TBSS, ROI e tractografia para FA, AD, MD e RD. Testes estatísticos: TBSS- <i>Randomise</i> (P <0,05 corrigido com TFCE, 10.000 permutações, modelo GLM com sexo e idade como covariáveis de confundimento). Análises foram realizadas entre grupos SPI e controles e também entre subgrupos leve-a-moderado, grave-a-muito-grave e controles. Análise da média global obtida dos esqueletos gerados no TBSS foi realizada para cada métrica. Correlações <i>post-hoc</i> entre métricas DTI (de análises significativas) e IRLSS.	TBSS: diminuição de AD na radiação talâmica posterior esquerda no grupo de portadores de SPI. Em indivíduos com SPI grave a muito grave, AD estava reduzido na coroa radiada posterior esquerda. Houve uma correlação significativa, inversa, entre AD e a gravidade dos sintomas da SPI. Nenhuma diferença na análise global. ROI: aumento de RD nos pedúnculos cerebelares superiores de indivíduos com SPI grave a muito grave. Tractografia: nenhuma diferença entre grupos ou subgrupos.
-------------------------------------	---	---	--	--	--	---

H: homens; M: mulheres; IRLSS: Escala Internacional de Gravidade da Síndrome das Pernas Inquietas; VBA: análises baseadas em voxel; DWI: imagem ponderada em difusão (*diffusion weighted image*) DTI: imagem por tensor de difusão (*diffusion Tensor Imaging*); SPM: mapeamento paramétrico estatístico; FSL: FMRIB's Software Library; TBSS: estatística espacial baseada em tratos (*tract based spatial statistics*); GM: substância cinzenta; WM: substância branca; FA: anisotropia fracionada; AD: difusividade axial; MD: difusividade média; RD: difusividade radial; PLM: movimentos periódicos dos membros (*periodic limb movement*); SD: desvio-padrão. TIFT: *tensor imaging and fiber tracking*. Pré-processamento padrão: procedimentos de correção de corrente de Foucault e de movimento de cabeça. ROI: região-de-interesse (*region of interest*); FDR: taxa de falsas descobertas (*false discovery-rate*); FWE: taxa de erro da família dos testes (*family-wise error*); MRI: imagem por ressonância magnética (*magnetic resonance imaging*). *Washout*: período sem uso de medicação anterior à participação na pesquisa. BVEC: tábua de codificação das direções de gradiente.

Neste estudo, comparamos as métricas de DTI em tratos supostamente envolvidos na patogênese da SPI, entre indivíduos com essa condição e controles com idade e sexo comparáveis aos dos pacientes, com (1) análise exploratória e robusta de cérebro total usando TBSS; (2) análises de ROI baseadas em atlas de tratos escolhidos com base em resultados de estudos anteriores; (3) tractografia probabilística e (4) análise de correlação de resultados significativos com a gravidade dos sintomas.

Nossa hipótese foi que estas múltiplas abordagens revelariam mudanças na substância branca em áreas associadas à função sensorial, motora ou à integração sensório-motora, principalmente nos indivíduos com a forma mais grave de SPI em comparação com controles.

1.1 Objetivos

1. Testar a hipótese de que existem diferenças significativas na microestrutura de tratos relacionados a vias sensitivas, motoras e de integração sensório-motora, avaliados indiretamente por análises de imagem por tensor de difusão, comparando-se indivíduos portadores de síndrome das pernas inquietas e controles;

2. Analisar se tais alterações serão mais pronunciadas em portadores com síndrome das pernas inquietas com sintomas graves a muito graves do que naqueles com a forma leve a moderada de síndrome das pernas inquietas;

3. Correlacionar possíveis alterações encontradas com a Escala Internacional de Gravidade da Síndrome das Pernas Inquietas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Síndrome das pernas inquietas/doença de Willis-Ekbom

2.1.1 Histórico, definições e impacto

A SPI, também conhecida como Doença de Willis-Ekbom, é uma condição neurológica descrita pela primeira vez, em 1672, por Thomas Willis - médico e anatomista britânico – como uma inquietação que hoje é denominada de acatisia. Foi apenas em 1944 que Karl-Axel Ekbom⁽⁵¹⁾ completou a definição do que hoje conhecemos por SPI, ao descrevê-la como uma disfunção sensório-motora, na qual seus portadores relatam uma sensação de desconforto nas pernas, associada a uma necessidade irresistível de movimentá-las. A movimentação das pernas traz alívio aos sintomas, os quais têm uma evidente flutuação circadiana, com início geralmente no período noturno e melhora significativa no período matutino e vespertino, independentemente da atividade.⁽⁵²⁾

Critérios diagnósticos propostos em 2003 pelo Grupo Internacional de Estudos em Síndrome das Pernas Inquietas (IRLSSG – *International Restless Legs Syndrome Study Group*), ao serem aplicados na população em geral, mostram prevalência de 3,9% a 14,3%.⁽⁵²⁻⁵⁴⁾ Embora tenha sido identificado aumento da prevalência e agravamento dos sintomas com a idade, o início da sintomatologia varia e pode ocorrer na infância.⁽⁵⁵⁾ Em um terço dos pacientes com SPI grave, os sintomas iniciam-se antes dos 20 anos, ainda que o diagnóstico preciso de SPI possa ser definido apenas mais tarde.⁽⁵⁶⁾ Um estudo mais recente mostrou que a prevalência desta condição em todo o mundo varia de 1 a 11,6%, sendo as mulheres e os idosos os mais afetados.^(57,58) No Brasil, dados epidemiológicos de uma cidade de pequeno porte no interior paulista revelaram prevalência de 6,4%, com maior proporção entre mulheres (aproximadamente o dobro da prevalência em relação aos homens).^(53,59)

A causa desta predileção fenotípica da SPI pelo sexo feminino ainda não foi elucidada. Parece haver relação entre o sexo feminino e início dos sintomas mais precoce, assim como se sugere uma influência dos fatores genéticos ambientais (isto é, hormonais) e mitocondriais.⁽⁶⁰⁾ Por outro lado, estudos sobre qualidade de vida relacionada à saúde na SPI não mostraram diferenças entre homens e mulheres.^(61,62)

Existem duas formas etiológicas de SPI: a idiopática (ou primária) e a secundária. A idiopática se apresenta mais precocemente, acomete indivíduos adultos jovens e se mantém durante a vida. Especula-se que a forma de início precoce da SPI primária possua componente genético claro, dado que frequentemente há associação familiar (variando entre 40 e 60%), com provável herança autossômica dominante de penetrância variável.⁽⁶³⁾ Já a SPI de início tardio teria etiologia pouco clara, sugerindo que um ou mais endofenótipos possam existir dentro desta condição.⁽⁶⁰⁾

Por sua vez, as formas secundárias são mais comuns em idosos e estão associadas a condições⁽⁶⁴⁾ como deficiência de ferro, gestação, insuficiência renal crônica, neuropatias periféricas, doença vascular periférica, distúrbios hormonais e metabólicos. Além disso, os sintomas podem ser exacerbados ou podem ocorrer secundariamente ao uso de algumas drogas, tais como inibidores seletivos da receptação de serotonina,⁽⁶⁵⁾ antidepressivos tricíclicos,⁽⁶⁶⁾ antagonistas dopaminérgicos,⁽⁶⁷⁾ lítio⁽⁶⁸⁾ e cafeína.⁽⁶⁹⁾

O diagnóstico de SPI baseia-se na anamnese, com base nos critérios diagnósticos propostos pelo IRLSSG em 2003,⁽⁵²⁾ descritos abaixo:

Critérios diagnósticos para SPI de acordo com o IRLSSG:⁽⁵²⁾

1. Urgência em movimentar os membros, geralmente associado a parestesia ou disestesia, sensações que ocorrem espontaneamente, durante o despertar, na “profundidade das extremidades” e não superficialmente na pele;
2. Sintomas pioram ou estão presentes somente no repouso;
3. Sintomas melhoras ou aliviam com os movimentos das partes afetadas;
4. Sintomas pioram no fim do dia ou à noite.

Critérios de suporte:

1. Movimentos periódicos dos membros durante o sono e movimentos involuntários em vigília e em repouso;
2. História familiar: algumas vezes presente e sugere herança autossômica dominante;
3. Melhora com uso de agonistas dopaminérgicos.

Estes critérios foram revisados em 2014 (Anexo 1).⁽⁶⁶⁾ Mesmo após avaliação especializada, exames complementares podem ser necessários para a correta exclusão de condições mimetizadoras de SPI⁽⁷⁰⁾ como o teste de imobilização, polissonografia e mensuração de níveis de ferro no sangue.⁽⁵⁹⁾

A presença de movimentos periódicos dos membros (PLM – *periodic limb movement*), durante o sono ou em vigília, ocorre em mais de 80% dos pacientes com SPI e também pode corroborar o diagnóstico desta condição.^(59,71) Entretanto, a PLM parece ser mais frequente em homens.⁽⁷²⁾ Estudos têm apontado que PLM é fator prognóstico para incidentes cardiovasculares e maior mortalidade.⁽⁷³⁾ Mesmo movimentos de membros de intervalo curto (<10s), que não se caracterizam como PLM, levam a maior ativação cardíaca nos portadores de SPI durante o sono.⁽⁷⁴⁾

Adicionalmente, acredita-se que a ativação adrenérgica, que ocorre imediatamente antes do movimento de pernas, possa ser responsável pela maior taxa de morbidade cardiovascular dentre portadores de SPI.⁽⁷⁴⁾ Recentemente, um estudo de coorte prospectivo⁽⁷⁵⁾ avaliou casos de incidentes cardiovasculares (ex.: infarto do miocárdio, angina, acidente vascular cerebral, fibrilação atrial e insuficiência cardíaca) em 24.199 portadores de SPI (68,9% em tratamento). Por meio de modelo de risco proporcional de Cox, confirmaram que a SPI é associada a maior risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (taxa de risco ajustada de 1,26; 95% IC 1,20 – 1,32), mesmo ajustando para idade, sexo, residência, consumo de álcool, obesidade, presença de doença pulmonar obstrutiva crônica (um substituto para tabagismo), depressão, apneia obstrutiva do sono, insônia, diabetes, hipertensão, neuropatia periférica, artrite, anemia por deficiência de ferro, doença de Parkinson, doença renal crônica, uso de antiplaquetários, anticoagulantes, estatinas, tratamentos anti-hipertensivos e hipoglicemiantes. Entretanto, menor risco de doença cardiovascular foi observado para a maioria dos diferentes tratamentos preconizados para a SPI (agonistas dopaminérgicos, anticonvulsivantes, benzodiazepínicos ou opioides), sugerindo que o tratamento para os sintomas de SPI diminuem seu potencial prejudicial.⁽⁷⁵⁾

Os sintomas de SPI podem ocasionar insônia (inicial e de manutenção), fragmentação do sono e sonolência excessiva diurna.^(76,77) Interessantemente, um estudo com eletroencefalograma (EEG) verificou redução na densidade dos fusos rápido e lento do sono - feixes de atividade elétrica sincronizada – sugerindo disfunção nas células inibitórias do núcleo reticular talâmico e na via tálamo-

cortical.⁽⁷⁸⁾ A má qualidade do sono ao longo do tempo pode ser associada a sintomas depressivos,⁽⁶²⁾ por meio de efeitos negativos causados por fadiga, insônia, sonolência excessiva diurna e privação do sono crônica, os quais são fatores de risco reconhecidamente independentes para a depressão. Portanto, não é possível concluir que haja uma via neurobiológica comum para a depressão e a SPI.

A qualidade de vida de portadores de SPI com sintomas de intensidades moderada a grave é reduzida de forma substancial, sendo semelhante à de doenças crônicas como osteoartrite, depressão, diabetes, insuficiência cardíaca crônica, artrite reumatoide e polineuropatias.^(61,62,79) Quando avaliada a qualidade de vida relacionada com saúde (por meio da escala Euroqol 5D3L) dentre 519 portadores de SPI, 84% relataram dor e 51% e ansiedade/depressão.⁽⁶²⁾ Embora os sintomas da SPI geralmente não sejam descritos como dolorosos, suas manifestações sensoriais compartilham semelhanças com sensações de dor crônica. A SPI ocorre com frequência em portadores de dor crônica e de condições neuropáticas, mas na SPI idiopática se supõe que os sintomas de percepção sensorial sejam causados por prejuízo no processamento somatossensorial central e não por neuropatias.⁽⁸⁰⁾ Estudos também têm apontado para associação entre enxaqueca e SPI, com influência genética,⁽⁸¹⁾ provavelmente causada por desequilíbrio da homeostase de ferro e do sistema dopaminérgico.⁽⁸²⁻⁸⁴⁾

Os sintomas sensório-motores característicos da SPI também podem surgir após ataque isquêmico transitório e acidentes vasculares cerebrais (AVC).⁽⁸⁵⁾ As principais localizações de lesões vasculares nos casos descritos são: tálamo,⁽⁸⁶⁻⁸⁸⁾ fibras ponto-cerebelares,⁽⁸⁶⁾ núcleos da base e coroa radiada.⁽⁸⁷⁾

Tratamentos propostos para a SPI incluem desde atividade física até o tratamento diário com agentes dopaminérgicos, administrados antes do início dos sintomas. Comprovou-se que estas intervenções terapêuticas reduzem os sintomas sensitivos e motores.^(89,90) Entretanto eventos adversos podem ocorrer, tais como: cefaleia, náuseas, edema de membros inferiores, sonolência, entre outros. Além disso, o uso crônico de agonistas dopaminérgicos pode levar à tolerância e ao fenômeno de “*aumentação*”,⁽⁵⁹⁾ ou seja, exacerbação da intensidade dos sintomas ou antecipação de seu horário de início.⁽⁹¹⁻⁹³⁾ Tal fenômeno está relacionado principalmente ao uso de agentes dopaminérgicos e chega a atingir até 60% dos pacientes tratados com levodopa.⁽⁹⁴⁾ Por isso, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas é altamente desejável e, para tal, a compreensão da fisiopatologia da SPI é crucial.

2.1.2 Teorias fisiopatológicas

2.1.2.1 Excitabilidade cortical e periférica

Ainda é incerta a origem dos sintomas descritos na SPI. Várias hipóteses fisiopatológicas foram propostas, tais como anomalias na modulação de centros inibitórios medulares sobre a movimentação dos membros inferiores durante o sono.⁽⁹⁵⁾ Também se propõe que na SPI ocorra hiperexcitabilidade dos circuitos motores centrais, o que pode ser averiguado por uma técnica não invasiva, a estimulação magnética transcraniana (*Transcranial Magnetic Stimulation*, TMS).^(95,96) De forma geral, os estudos com TMS mostraram que há alteração na excitabilidade cortical nos portadores de SPI,⁽¹⁰⁾ principalmente em medidas de atividade gabaérgica, tais como o período silente cortical e a inibição intracortical.^(97,98) Tratamentos com agonistas dopaminérgicos ou levodopa são capazes de regular estas medidas de inibição em pacientes com SPI, assim como na doença de Parkinson,^(99–102) sugerindo que uma disfunção dopaminérgica possa estar por trás da fisiopatologia da SPI.

Dados já publicados do nosso grupo de pesquisa⁽¹⁰³⁾ mostraram que a inibição intracortical estava reduzida no grupo de portadores de SPI (n=34) em relação aos controles (n=24), denotando maior excitabilidade do córtex motor primário, avaliada por TMS. A análise da curva da característica de operação do receptor (ROC – *receiver operating characteristic curve*) revelou que inibição intracortical acima de 35,05% predizia SPI, com sensibilidade de 66,7% e especificidade de 86,9%. Estes dados sugerem que a maior excitabilidade cortical motora está presente mesmo nas formas mais leves da SPI.

2.1.2.2 Disfunção na integração sensório-motora

A integração sensório-motora pode ser definida como a estreita integração dos sistemas sensoriais e motores necessários para o planejamento e execução de movimentos precisos. Distúrbios do movimento, tais como a doença de Parkinson, distonia, síndrome de Tourette, acatisia e a própria SPI eram tradicionalmente considerados como transtornos provocados por prejuízo no controle motor, predominantemente por disfunção de núcleos da base.⁽¹⁰⁴⁾ Entretanto, há

evidências de que diversos distúrbios motores podem estar associados à disfunções na integração sensório-motora, como no caso da doença de Parkinson (ex. problemas de propriocepção), doença de Huntington e na distonia focal.⁽¹⁰⁵⁾ Inclusive, entre os distúrbios hipercinéticos, cabe ressaltar que há semelhanças entre a SPI, os transtornos de tique e a acatisia, dado que os tiques são precedidos por desejo premonitório ou sensação perturbadora que leva o paciente a executá-los, aliviando temporariamente a sensação desconfortável, semelhante aos sintomas relatados na SPI.^(106,107) A noção de que tais distúrbios são meramente motores tem sido revisada em função do crescente reconhecimento de sintomas comportamentais, psiquiátricos, autonômicos e outros sintomas não-motores nestas condições.⁽¹⁰⁴⁾

Todo movimento produz ativação de receptores periféricos (proprioceptivos e cutâneos), gerando informação sensorial que é retransmitida ao sistema nervoso central. Na trajetória ascendente do sistema sensório-motor, o *feedback* somatossensorial durante o controle do movimento é codificado pelos mecanorreceptores (isto é, fusos musculares e órgãos tendinosos de Golgi), transmitidos por sinapses nos núcleos da coluna dorsal no tronco encefálico (núcleo cuneiforme para braços e grácil, para as pernas) e, finalmente, atinge o córtex somatossensorial através da via somatossensorial tálamo-cortical. Os núcleos da base, o cerebelo, o tálamo e suas conexões, juntamente com possíveis alterações nas aferências sensoriais, parecem desempenhar papel fundamental na integração sensório-motora anormal especulada nos distúrbios de movimento.⁽¹⁰⁰⁾

Dentre as regiões cerebrais que potencialmente modulam a integração sensório-motora, também destacamos o trato corticoespinhal (TCE), cuja projeção descendente desempenha papel importante no comando motor, resultando no controle direto e indireto dos interneurônios pré-motores da medula espinhal, bem como dos motoneurônios. Paralelamente ao TCE, existem múltiplas vias indiretas, incluindo vias corticobulbospinais e tratos de TCE que partem de córtices motores secundários (ex.: área pré-motora). Entretanto, o TCE também está envolvido em modulação seletiva e complexa do *feedback* sensorial. Um sistema descendente como o TCE tem papel importante na produção de inibição pré-sináptica de aferências sensoriais, que se dá por modulação direta dos interneurônios envolvidos no *feedback* sensorial. Além disso, um conjunto de neurônios do trato espinocerebelar dorsal, responsável por receber estímulos proprioceptivos-sensoriais, também é ativado pelo TCE.⁽¹⁰⁸⁾ Em particular, existem razões para acreditar que anormalidades nos axônios

do TCE possam levar a sintomas da SPI. Este trato também exerce controle descendente sobre as funções nociceptiva e motora, além de modular a plasticidade de longo prazo dos circuitos da medula espinhal.⁽¹⁰⁶⁾

Uma abordagem eficiente para se estudar a integração sensório-motora é a combinação de estimulação nervosa periférica com potenciais evocados motores proveniente do córtex motor primário contralateral. Esta função tem sido estudada de forma não-invasiva por meio da TMS, por meio de estudos com paradigmas de teste de condicionamento bem estabelecidos, tais como a chamada inibição aferente de curta latência (SAI – *Short-latency afferent inhibition*) ou longa latência (LAI – *Long-latency afferent inhibition*). Em particular, o SAI avalia o rápido efeito inibitório de uma estimulação elétrica periférica, fornecida aproximadamente 20 milissegundos (e 200ms para o SAI) antes da estimulação elétrica promovida pela TMS sobre o córtex motor primário contralateral. A magnitude dessa inibição fornece correlato neurofisiológico da eficiência da rápida integração sensório-motora. Acredita-se que a entrada sensorial exerça seus efeitos inibitórios sobre os neurônios corticoespinhais através de circuitos intracorticais GABAérgicos, modulado por circuitos dopaminérgicos e colinérgicos. Estudos que se utilizaram destas abordagens para investigação da integração sensório-motora na SPI produziram resultados inconsistentes entre si. Rizzo et al., por exemplo, verificaram que a SAI estava deficiente em pacientes com SPI não tratada, a qual foi normalizada após o tratamento dopaminérgico;⁽²⁴⁾ no entanto, Bocquillon et al. não encontraram diferença na SAI entre pacientes e controles saudáveis.⁽²²⁾ Por sua vez, nenhuma diferença na LAI foi encontrada no estudo de Rizzo, enquanto uma falta de facilitação induzida por estímulo (outra abordagem para estudo da integração sensório-motora) foi encontrada no estudo de Bocquillon et al.⁽²²⁾ Recentemente, Lin et al. verificaram que a LAI estava significativamente diminuída, sugerindo integração sensório-motora prejudicada em pacientes com SPI e que esta perturbação pode ter origem em nível cortical⁽²³⁾ ou nas projeções talamocorticais. A última hipótese é corroborada por estudos de lesão que demonstraram acentuada redução ou perda de SAI em pacientes com AVC talâmico unilateral⁽¹⁰⁹⁾ ou bilateral.⁽¹¹⁰⁾

Tanto a estimulação magnética transcraniana repetitiva (rTMS) excitatória,⁽¹⁹⁾ quanto a inibitória⁽¹¹¹⁾ do córtex motor primário, de onde a maioria dos axônios do TCE se originam,⁽¹¹²⁾ têm sido propostas para o alívio dos sintomas da SPI, pelo menos em pacientes sem tratamento medicamentoso prévio (*drug-naïve*). Além

disso, a rTMS inibitória do córtex somatossensorial primário foi recentemente proposta como estratégia terapêutica para a síndrome.⁽¹¹³⁾

2.1.2.3 Disfunção do metabolismo de ferro

A fim de identificar os correlatos morfológicos da fisiopatologia no sistema nervoso central *in vivo*, estudos de ressonância magnética mostraram diminuições locais de ferro em: estriado direito e globo pálido interno em portadores da forma de início precoce da SPI,⁽¹¹⁴⁾ diminuição na substância negra,^(115–117) no tálamo e núcleo caudado.⁽¹¹⁸⁾ Porém, já foi especulado que esta redução de ferro ocorre apenas em portadores da SPI idiopática e de início precoce dos sintomas.⁽¹¹⁵⁾

A deficiência de ferro pode estar associada à hipomielinização, como verificado em animais^(119–122) e humanos.⁽¹²³⁾ Estudos com pacientes de SPI^(124–126) descreveram baixos níveis de ferritina e transferrina, proteínas responsáveis pelo armazenamento e transporte de ferro para os tecidos, respectivamente. Connor et al. revelaram, em estudo *post-mortem*, por meio de análise de *western blot* de mielina isolada de 11 pacientes de SPI, que a expressão de proteínas integrais de mielina estava significativamente reduzida em aproximadamente 25% em relação aos controles comparáveis em idade, sugerindo déficits em mielinização provocado pela redução de ferro central.⁽¹²⁴⁾

Apesar dos portadores de SPI primária possuírem níveis séricos de ferro geralmente normais, o tratamento por meio da administração intravenosa de ferro é objeto de ensaios clínicos com resultados não homogêneos, permanecendo em aberto o motivo pelo qual a resposta terapêutica é eficaz apenas em parte dos pacientes.^(2,127) Em geral, a associação entre ferritina sérica e SPI não é linear, porém, baixas concentrações de ferritina sérica parecem ser fator de risco relevante para a SPI.⁽²⁾

Além disso, por meio de exame do líquido cefalorraquidiano, foi observado^(125,126) que, em portadores de SPI, os valores de ferro e ferritina foram menores. Também encontraram correlação positiva entre ferritina sérica e concentração de ferritina no líquido, tanto em portadores de SPI como em controles, porém, com menor inclinação da linha de regressão para o grupo SPI, sugerindo que a baixa concentração de ferro no cérebro na SPI primária possa ser causada pela

disfunção do transporte de ferro sérico para o sistema nervoso central.⁽¹²⁶⁾ Especula-se que a influência do ferro na fisiopatologia da SPI se dê por meio de regulação epigenética.⁽²⁾

Modelos animais têm sido especificamente desenvolvidos para investigação da fisiopatologia da SPI, incluindo estudos com intervenções farmacológicas (uso de antagonistas dopaminérgicos); lesões na medula espinhal ou em núcleos de neurônios dopaminérgicos no diencéfalo (A11);^(6,128) genéticas e de deficiência de ferro.⁽¹²⁷⁾ A deficiência de ferro no cérebro durante o período pós-desmame, em ratos ou camundongos, produzem alterações no sistema dopaminérgico que se assemelham àsquelas encontradas na SPI, principalmente em relação à redução da densidade do subtipo 2 do receptor de dopamina (D2) no estriado e ao aumento da atividade da tirosina hidroxilase no mesencéfalo.⁽⁵⁾ Uma limitação destes modelos é que, apesar de permitirem estudar, por exemplo, a relação causal entre a deficiência central de ferro e disfunção dopaminérgica, nem todos produzem fenótipo comportamental típico, como a movimentação exacerbada de membros. Ainda que não apresentem distúrbios motores, camundongos com deficiência de ferro no cérebro mostraram aumento circadiano na vigília, durante períodos específicos que correspondem a antes do sono e no momento do início do sono.^(74,129) Parece promissor o uso de um novo modelo de camundongo transgênico, que foi desenvolvido com base nos genes de risco identificados para SPI,⁽¹³⁰⁾ pois ele exhibe o comportamento fenotípico, tanto circadiano, como biológico.⁽¹³¹⁾

Recentemente, resultados preliminares de estudo conduzido na Universidade de Stanford apontaram supercrescimento bacteriano no intestino delgado de portadores de SPI. Tal disbiose do intestino parece moderar a variabilidade observada de ferro sérico entre pacientes, sugerindo que a deficiência de ferro possa ser secundária à inflamação intestinal.⁽¹³²⁾

2.1.2.4 Teoria da ativação da via de hipóxia

Ao descrever a SPI, Ekbom alegou, em 1945, que os sintomas de SPI eram causados por circulação prejudicada nos pequenos vasos das extremidades, o que levava a hipóxia local.⁽¹³³⁾ Décadas depois, Anderson et al. demonstraram, por meio de exames de fluxometria por laser doppler e termografia, comprometimento

microvascular e hipóxia local nas pernas de pacientes com SPI em comparação com controles.⁽¹³⁴⁾

Apesar de portadores de SPI primária não apresentarem sintomas de hipóxia, como cianose ou dispneia, um estudo⁽¹³⁵⁾ revelou aumento significativo do fator de transcrição da via de hipóxia na substância negra em pacientes de SPI em relação a controles. Também já foram verificadas alterações de marcadores periféricos de hipóxia em linfócitos e em parâmetros fisiológicos, como no fluxo sanguíneo da artéria femoral, frequência cardíaca e respiratória.⁽²⁾ Portadores de SPI também demonstram alterações no perfil proteômico no líquido que foram consistentes com o esperado para deficiência de ferro e hipóxia.⁽²⁾

Sabe-se também que o ferro age como co-fator na regulação da via do fator induzido por hipóxia (*hypoxia inducible factor*) e que a deficiência de ferro aumenta a transcrição de fatores que ativam tal via,⁽²⁾ porém mais estudos são necessários para elucidar tal interação e sua importância para a fisiopatologia da SPI. Cabe ressaltar que hipóxia noturna, particularmente, é um sintoma que ocorre na apneia obstrutiva do sono, distúrbio do sono que pode cursar com SPI.⁽¹³⁶⁾

2.1.2.5 Disfunção dopaminérgica

A SPI é tratada principalmente com levodopa e agonistas dopaminérgicos que têm como alvo os subtipos inibitórios de receptores de dopamina D3 e D2. O sucesso inicial dessa terapia levou a uma série de investigações dos receptores de dopamina pré- e pós-sinápticos^(4,137–142) e à ideia de um estado hipodopaminérgico como a origem mecanicista subjacente à SPI. Porém, alguns estudos têm sugerido que tal conceito simplificado de função reduzida de dopamina como base para se explicar a gênese dos sintomas de SPI não explica acuradamente outros aspectos clínicos, como o fenômeno de “aumentação” e a acatisia -consequências do uso crônico de agonistas dopaminérgicos – ou mesmo a influência circadiana do tratamento sobre os sintomas.⁽¹⁴³⁾

Além disso, estudos com tomografia por emissão de pósitrons (PET – *positron emission tomography*) e tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT – *single photon emission computed tomography*) mostraram resultados heterogêneos, sendo que alguns não constataram alterações no sistema

dopaminérgico.^(138,141) Esta ausência de alterações também é corroborada por resultados normais de estudos histopatológicos que examinam a substância negra e os neurônios da região A11,⁽⁶⁾ cujas células, agrupadas no mesencéfalo próximo ao hipotálamo, são as únicas a fornecerem projeções dopaminérgicas à medula espinhal, além de projetarem-se para o córtex e sistema límbico.

Entretanto, Earley et al. verificaram que o líquido de portadores de SPI apresentava aumento da atividade da tirosina hidroxilase.⁽¹⁴⁴⁾ Já Allen et al. verificaram no líquido de pacientes aumento da 3-orto-metildopa, metabólito da dopamina, proporcional ao aumento do ácido homovanílico, metabólito de catecolaminas, sugerindo, portanto, aumento da síntese de dopamina, sua liberação e renovação (*turnover*). Os níveis de 3-orto-metildopa e ácido homovanílico no líquido estavam positivamente correlacionados com a gravidade da SPI e mostraram variação diurna com nadir noturno.⁽¹⁴⁵⁾ Connor et al. verificaram que, em amostras de putâmen e substância negra de indivíduos com SPI, havia aumento da tirosina hidroxilase (total e fosforilada) e que a diminuição de receptores dopaminérgicos D2 estava correlacionada com a gravidade da SPI diagnosticada antes da morte.⁽⁵⁾ Já um estudo com PET revelou consistentes diminuições no potencial de ligação do receptor D2 nos gânglios da base, provavelmente causada por aumento da dopamina na fenda sináptica.⁽¹⁴⁶⁾ Além disso, estas alterações nos receptores D2 também parecem estar presentes em regiões extra-estriatais (sub-regiões do tálamo, ínsula do lado esquerdo e córtex cingulado anterior).⁽⁴⁾

As evidências, até o momento, apoiam o conceito de estado pré-sináptico “hiper-dopaminérgico” com aumento da síntese, liberação de dopamina, acompanhada de progressiva diminuição da recaptação de dopamina, levando ao seu aumento na fenda sináptica e, por fim, a estado pós-sináptico “hipo-dopaminérgico”.^(143,147)

2.1.2.6 Interação do ferro e dopamina

Ao contrário da falta de evidência direta para a participação do sistema dopaminérgico, diversos estudos têm mostrado consistentemente uma insuficiência de ferro significativa em pacientes com SPI,^(115,116,125,126,148) com destaque para a redução na quantidade de ferro na substância negra.^(149,150) Em modelos

animais, deficiência de ferro está relacionada a exacerbação da função do sistema dopaminérgico.⁽⁵⁾

A relação ferro-dopamina tem sido estudada, principalmente, por meio de modelos celulares *in vitro* com diferentes graus de quelação de ferro e também com modelos animais *in vivo*, por meio de deficiência de ferro induzida por dieta.⁽¹⁴⁹⁾ Além disso, o ferro é cofator essencial da tirosina hidroxilase, que converte a tirosina em L-DOPA, ou seja, trata-se de uma enzima limitadora de taxa de produção de dopamina. De fato, verificou-se que animais alimentados com dieta pobre em ferro apresentam menor densidade de ligações do subtipo 1 do receptor de dopamina (D1) e de D2 no estriado em relação aos controles,⁽¹⁵¹⁾ sugerindo ligação entre a deficiência de ferro e a hipofunção do sistema dopaminérgico.

2.1.2.7 Hipótese glutamatérgica

Mecanismos glutamatérgicos parecem desempenhar papel na excitabilidade cortical verificada na SPI por técnicas como a TMS.^(8,10,113) Esta hipótese é também apoiada pela eficácia dos ligantes das subunidades $\alpha 2\delta$ dos canais de cálcio (gabapentina e pregabalina), localizados principalmente em terminais glutamatérgicos,⁽¹⁵²⁾ em tratar os sintomas de sono da SPI⁽¹⁵³⁾ e em alterar marcadores de inibição intracortical.⁽¹⁵⁴⁾ A chamada hipótese hiperglutamatérgica também é corroborada por estudo de Allen et al., com espectroscopia de próton por ressonância, que identificou aumento nos níveis de glutamato e glutamina em região talâmica de pacientes de SPI, sugerindo relação com sintomas durante o sono.⁽¹⁴⁾ Enquanto o sistema dopaminérgico parece estar relacionado principalmente aos déficits na integração sensório-motora, o glutamato pode estar envolvido nos componentes de hiperexcitabilidade e do sono.^(14,155)

Recentemente, uma droga antiepiléptica (perampanel), antagonista seletivo do receptor pós-sináptico de glutamato do tipo AMPA, alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico, parte da família de receptores ionotrópicos de glutamato (AMPA-R), foi proposta como alternativa aos tratamentos dopaminérgicos.⁽¹⁵⁶⁾ Sabe-se que receptores dopaminérgicos modulam a sinalização glutamatérgica em neurônios espinhosos médios do estriado e que a ativação de receptores D2 diminuem as respostas dependentes de AMPA-R.⁽¹⁵⁷⁾ Dado o papel crítico dos receptores D2 nos

efeitos terapêuticos dos agonistas dopaminérgicos na SPI,⁽¹⁵³⁾ é concebível que a sua estimulação possa levar, a longo prazo, à redução das respostas do AMPA-R. Portanto, é possível que o bloqueio direto de AMPA-R, por um antagonista como perampanel, possa diminuir sintomas sensoriais e motores, como sugerido por Garcia-Borreguero et al.⁽¹⁵⁶⁾ Se confirmado por futuros estudos controlados, o perampanel pode se tornar uma alternativa promissora aos tratamentos dopaminérgicos existentes.

2.1.2.8 Hipótese de disfunção adenosinérgica

Novas evidências vêm sugerindo que alterações no sistema de adenosina também podem estar associadas à fisiopatologia da SPI. A adenosina é o principal fator endógeno promotor do sono, além de ser poderoso modulador da neurotransmissão de glutamato e dopamina.⁽¹⁵⁵⁾

Existem dois subtipos principais de receptores de adenosina difundidos no cérebro: receptores A1 (A1R) e A2 (A2R). A1R estão difundidos no cérebro, enquanto A2R estão concentrados no estriado⁽¹⁵⁸⁾ e são encontrados tanto na forma pré-sináptica, como pós-sináptica.

Tanto a deficiência de ferro no cérebro em roedores, quanto a quelação de ferro em células em cultura, influenciam significativamente a regulação funcional de A1R e A2R,^(159,160) reduzindo, por exemplo, A1R no córtex e estriado.⁽¹⁶⁰⁾ Quiroz et al. avaliaram que ratos com deficiência de ferro central tiveram aumento da expressão de A2R no estriado, tanto pós, como pré-sinápticamente. No estriado, A2R pré-sinápticos estão localizados em terminais glutamatérgicos em contato com neurônios gabaérgicos. A função destes receptores foi verificada por meio da habilidade de seu antagonista (antagonista A2R) no bloqueio da atividade motora induzida por estimulação elétrica cortical.⁽¹⁶⁰⁾ Tal resultado sugere que o aumento pré-sináptico do A2R estriatal poderia estar envolvido nas alterações da integração sensório-motora na SPI, representando um novo alvo terapêutico para este distúrbio.^(155,160)

2.1.2.9 Hipótese genética e de alterações no desenvolvimento

No início dos estudos genéticos em SPI, pensava-se que se tratava de distúrbio monogênico clássico em famílias, no entanto, estes estudos não conseguiram revelar com exatidão os genes relacionados à condição.⁽¹⁶¹⁾ Quando os estudos de associação genômica ampla, com grandes amostras, tornaram-se viáveis, as primeiras variantes genéticas de risco para a SPI puderam ser identificadas.⁽¹⁶²⁾ Variantes genéticas detectadas por esta técnica são variantes comuns que, individualmente, conferem apenas pequeno aumento no risco de doença. As variantes de risco para SPI atualmente conhecidas são seis *loci* genômicos (MEIS1, BTBD9, MAP2K5 / SKOR1, PTPRD e TOX3), mas variantes genéticas raras também são importantes contribuintes para o desenvolvimento da condição.⁽¹⁶¹⁾

O *locus* MEIS1, o mais forte fator de risco para SPI – com razão de chance em torno de 2,7 – representa apenas uma pequena, mas importante parte da suscetibilidade genética para SPI.⁽¹⁶¹⁾ Evidências apontam para um papel essencial de MEIS1 no desenvolvimento e regulação da homeostase de vários órgãos,⁽¹⁶³⁾ Interessantemente, Spieler et al. verificaram *in vivo* e *in vitro* que um polimorfismo de nucleotídeo único neste *locus* levou a alterações no desenvolvimento embrionário dos núcleos da base de camundongo geneticamente modificado, o que corrobora com a hipótese de que a SPI primária pode ser causada por alterações no desenvolvimento do cérebro,⁽¹⁶⁴⁾ as quais, possivelmente, podem ser avaliadas por estudos de neuroimagem não invasivos em portadores de SPI. Cabe ressaltar que MEIS1 também regula a expressão de ferritina,⁽¹⁶⁵⁾ corroborando com a hipótese de alteração no metabolismo de ferro.

Embora o número conhecido de variantes de risco genético ainda seja limitado, estas recentes descobertas têm sido indispensáveis em termos de decifrar a fisiopatologia subjacente da SPI, fornecendo os pontos de partida moleculares para o desenvolvimento de modelos animais e estudos *in vitro* direcionados para investigação mais aprofundada de seus mecanismos fisiopatológicos. Além disso, estas variantes de risco genético são também ferramentas úteis para se desvendar a complexidade fenotípica observada na SPI. A identificação de variantes genéticas associadas à presença de PLM, por exemplo, sugerem endofenótipo para SPI, ajudando a verificar fatores de predisposição individuais para a

condição. Além disso, alguns *loci* (MAP2K5 / SKOR1 e TOX3) também parecem ser mais relevantes para sintomas sensitivos do que motores na SPI.⁽¹⁶¹⁾

2.1.2.10 Alterações estruturais e funcionais

Uma das principais observações dos estudos *postmortem* é que os sintomas da SPI não parecem estar associados a processos neurodegenerativos clássicos. Apesar da hipótese da disfunção dopaminérgica, por exemplo, não há perda perceptível de neurônios da tirosina hidroxilase na substância negra como relatado na doença de Parkinson.^(2,166)

Esta ausência de evidência para processos neurodegenerativos é parcialmente corroborada por estudos de neuroimagem estruturais, cujos resultados apontam para alterações sutis e difusas, com destaque para as seguintes alterações volumétricas em regiões de substância cinzenta: aumento em região dorsal talâmica bilateral;⁽¹³⁾ aumento no hipocampo e giro orbitofrontal;⁽¹⁶⁷⁾ diminuição em região sensorio-motora primária;^(11,168) diminuição em hipocampo esquerdo, lobo parietal, córtex frontal medial, região lateral do lobo temporal e cerebelo;⁽¹⁶⁹⁾ diminuição no tálamo direito.⁽¹⁷⁰⁾

Os resultados supramencionados foram obtidos por meio de uma técnica relativamente antiga, denominada morfometria baseada em *voxel* (*voxel-based morphometry*, VBM), criticada por certos autores.^(34,39-41) Mais recentemente, Lee et al.⁽¹²⁾ reportaram redução de espessura cortical em giro pós-central bilateral detectada com uma técnica mais sofisticada de morfometria baseada em superfície (*surface-based morphometry*, SBA), via *software Freesurfer*, o qual melhora a correspondência de regiões corticais homólogas entre sujeitos, permitindo delimitação mais precisa entre regiões corticais. Outra vantagem dos métodos de análise SBA sobre VBM é a redução substancial da variabilidade anatômica residual entre sujeitos.⁽¹⁷¹⁻¹⁷³⁾

A maioria desses estudos não incluiu medida de volume intracraniano total como covariável (procedimento recomendado, já que esta medida está associada positivamente com volume de regiões cerebrais específicas),⁽¹⁷⁴⁾ nem corrigiu suas análises para comparações múltiplas (com exceção do estudo de Hornyak et al.⁽¹⁷⁵⁾). De fato, esses resultados podem representar falsos positivos, pois os dados foram processados com uma versão mais antiga do *software* de Mapeamento

Paramétrico Estatístico de Processamento de Neuroimagem (SPM – *Software Statistical Parametric Mapping*), que não possuía o algoritmo DARTEL,⁽¹⁷⁶⁾ técnica otimizada para normalização espacial.⁽¹⁷⁷⁾ Alguns estudos também não revelaram qualquer alteração em substância cinzenta em portadores de SPI,^(46,114,178,179) incluindo a análise feita por nosso grupo de pesquisa, via *Freesurfer*, em 31 portadores de SPI e 23 controles, com idade e sexo comparáveis.⁽¹⁰³⁾

Já nos poucos estudos (Tabela 1) que focaram na análise da substância branca na SPI, os principais resultados apontam para o envolvimento de estruturas relacionadas à função sensorial ou motora, bem como à integração sensório-motora: diminuição bilateral de FA na substância branca adjacente aos córtices motor primário e somatossensorial, assim como no tálamo direito;⁽³²⁾ alterações em FA, AD e RD na cápsula interna direita, ponte e hemisfério cerebelar direito.⁽³³⁾ Por outro lado, outros estudos não relataram diferenças nas métricas de DTI na SPI, especialmente quando os resultados foram corrigidos para comparações múltiplas.^(46,49)

Por sua vez, estudos de imagem de ressonância magnética funcional (*functional magnetic resonance*, fMRI) revelaram alterações em cerebelo e tálamo,⁽¹⁷⁾ córtex sensório-motor,⁽¹⁸⁰⁾ conectividade tálamo-cortical anormal,⁽¹⁶⁾ ativações difusas em regiões corticais e subcorticais,^(114,181) sugerindo envolvimento principalmente de vias tálamocorticais e sensório-motoras, assim como do cerebelo na fisiopatologia da SPI.^(182,183) Recentemente, um estudo com magnetoencefalografia – exame que mede o campo magnético do cérebro a partir das correntes iônicas que fluem nos dendritos dos neurônios durante a transmissão sináptica – verificou aumento da excitabilidade do córtex sensório-motor.⁽¹⁸⁴⁾

Nos últimos anos, alguns estudos também avaliaram alterações em padrões de conectividade funcional na SPI, utilizando-se de uma modalidade em que a fMRI é adquirida durante o estado de repouso cerebral (rsfMRI – *resting state functional magnetic resonance imaging*). Por exemplo, Gorges et al. verificaram alterações em redes funcionais na SPI, associadas ao controle da atenção a estímulos sensoriais, incluindo regiões como o núcleo ventral pósterolateral do tálamo e o pulvinar. O padrão de alterações na conectividade funcional foi positivamente correlacionado com o aumento da gravidade dos sintomas de SPI.⁽¹⁸⁵⁾

Foco da maior parte dos estudos de conectividade, a rede neural de modo padrão (DMN – *default mode network*) é definida por um conjunto de regiões cerebrais (normalmente, o córtex pré-frontal medial ventral, lóbulo parietal inferior,

córtex temporal lateral, córtex pré-frontal medial dorsal e a formação hipocampal), funcionalmente conectadas com o córtex cingulado posterior durante rsfMRI.⁽¹⁸⁶⁾ A DMN reflete estado cerebral que ignora os estímulos sensoriais externos e, ao invés disso, foca no processamento de informações internas sem interromper o estado de repouso. Portanto, estudos de rsfMRI usualmente observam aumento de atividade da DMN quando o indivíduo não está focado em estímulos do mundo exterior (isto é, em repouso ou na inatividade), exatamente quando os sintomas de SPI costumam ser desencadeados. Como resultado, os pesquisadores verificaram que, nos portadores de SPI, o lobo parietal superior direito, a área motora suplementar direita e o tálamo esquerdo (área ventral póstero-lateral) – áreas relacionadas à circuitaria sensório-motora – estavam funcionalmente mais conectados às estruturas pertencentes à DMN, quando comparados aos controles. Por outro lado, os autores também reportaram redução na conectividade funcional da DMN em regiões mediais do cérebro, incluindo o córtex cingulado posterior esquerdo, o giro orbito-frontal direito, pré-cuneo esquerdo e giro subcaloso, propondo que respostas aumentadas à estimulação sensorial podem estar associadas aos sintomas sensoriais que constituem as bases clínicas para a SPI. Por sua vez, sabe-se, também, que o sistema dopaminérgico modula a DMN, sugerindo que tal alteração poderia estar relacionada à disfunção nas vias dopaminérgicas.⁽¹⁸⁶⁾

Por fim, Liu et al.⁽¹⁹⁾ também verificaram, por rsfMRI, alterações na conectividade funcional da circuitaria cerebelar-talâmica e diminuição de conectividade funcional nas sensório-motoras. Estes mesmos autores já haviam identificado, em estudo anterior,⁽¹⁹⁾ padrões alterados de atividades funcionais no córtex sensório-motor e em regiões de processamento visual durante períodos assintomáticos. Interessantemente, dois estudos anteriores com fMRI já tinham encontrado atividade cerebelar e talâmica associada a desconforto sensorial e/ou movimentos periódicos dos membros em portadores de SPI.^(17,114)

2.2 Imagem ponderada em difusão

A MRI possui grande versatilidade quanto à sua capacidade de avaliar os diferentes tecidos do cérebro, sendo de grande valia no estudo da neuroanatomia e importante aliada no diagnóstico de doenças neurológicas. Dentre

seus variados tipos de aquisição, a imagem ponderada em difusão (DWI – *diffusion weighted image*) tem despertado interesse não apenas da comunidade científica, mas também do público em geral, por suas atrativas possibilidades de pós-processamento que levam à sofisticadas representações dos tratos de substância branca.

A sequência de imagem por ressonância magnética (RM) para DWI depende do uso intensivo de gradientes, o que deixava a aquisição lenta e susceptível a ruídos e artefatos de movimentação de cabeça. No início dos anos 90, com o mais fácil acesso à rápida sequência de pulso eco-planar (EPI – *echo-planar imaging*), a DWI passou a ser usada clinicamente, inicialmente como coadjuvante no diagnóstico de AVC.⁽²⁷⁾

Estruturas celulares, subcelulares, extracelulares e moléculas maiores (como colágeno) impedem, até certo grau, o movimento das moléculas de água por meio do tecido. Como resultado, a velocidade de difusão é menor no tecido, do que no líquido, por exemplo. Em particular, certos tecidos como a substância branca cerebral possuem estrutura de tecido altamente organizada que leva à predominância de uma única direção de difusão. Os axônios revestidos por mielina podem ser considerados barreiras à difusão das moléculas de água. Em certas condições também ocorre restrição da difusão, como no caso de edemas, tumores e AVC, visualizados por aumento da intensidade de sinal.

Para sensibilizar a imagem à difusão, tipicamente aplica-se um par de pulsos de gradientes de alta amplitude. Quando *spins* se difundem ao longo do gradiente de campo magnético, ocorre acumulação de fase nos *spins* em movimento que excede os *spins* estacionários. A acumulação de fase, por sua vez, leva à diminuição de sinal. Esta perda de sinal é proporcional à força do gradiente e ao tempo que ela é aplicada aos *spins* em difusão. A amplitude do gradiente de campo magnético e a velocidade com que os *spins* estão se movendo vai determinar a quantidade de sinal perdido. Para tal, aquisições de EPI ultrarrápidas são comumente empregadas. Dado que a duração do gradiente de campo magnético deve ser breve, a amplitude de gradiente é o parâmetro que governa o grau da perda de sinal decorrente da difusão.⁽¹⁸⁷⁾ A duração, amplitude e intervalo entre os dois gradientes é chamado de "b-valor" (*b value*), escalar que reflete o grau de difusão, indicado por s/mm^2 e descrito pela fórmula $b = \gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$, onde G é a magnitude, δ a duração e Δ o intervalo de tempo. Aumentar o *b value* fará a imagem mais sensível a distâncias menores de

difusão. Porém, cabe ressaltar que aumentar o *b-value* também leva à diminuição de relação sinal-ruído.

2.3 Imagem por tensor de difusão

Em todas as temperaturas acima do zero absoluto, efeitos termodinâmicos fazem com que moléculas se movimentem de forma aleatória pelo ambiente. Este fenômeno é denominado de movimento browniano. Quando a difusão das moléculas ocorre de forma mais homogênea, com menor restrição e sem direção preferencial de deslocamento (por exemplo, no líquido, urina e bile), chamamos de difusão isotrópica, representando-a graficamente por uma esfera. No tecido, a estrutura restringe a trajetória das moléculas de água. Esta difusividade que ocorre em direções específicas é denominada de difusão anisotrópica. A substância branca, em especial, possui estrutura altamente ordenada que facilita a difusão ao longo de uma única direção e que restringe a difusão em demais direções, tendo, portanto, alta anisotropia. Cabe ressaltar que a anisotropia não descreve a direção absoluta da difusão, apenas o grau com que a difusão ocorre preferencialmente ao longo de uma única direção.

A análise do grau de anisotropia nos permite especular, de forma indireta, a integridade e organização da citoarquitetura de fibras compostas por tratos de substância branca e de seu estado de mielinização, sendo particularmente útil para detectar alterações na organização tecidual das fibras axonais, as quais podem até mesmo preceder mudanças volumétricas.⁽¹⁸⁸⁾ Para obtermos informação acurada da direção da difusão, precisamos de uma série de imagens, cada uma sensibilizada para uma direção específica. Para a correta caracterização da difusão, faz-se necessário adquiri-la em diferentes direções (mínimo de 6), para a criação de modelo matemático de difusão, no espaço tridimensional (3D). Quanto mais imagens adquiridas, melhor poderemos determinar de forma acurada a direção absoluta da difusão.

O método mais simples e comumente adotado para modelarmos matematicamente a difusividade - por não necessitar de grande número de direções ou múltiplos *b value* (*multi-shell acquisitions*) – denomina-se DTI, proveniente de pós-processamento de sequências DWI.

No DTI, a difusão total é modelada para cada *voxel* como uma elipsoide 3D, definido por meio de constructo matemático chamado de tensor.⁽¹⁸⁹⁾ Por

meio do tensor, podemos discutir a direção preferencial da difusão e a homogeneidade de direção dentro de um *voxel*. O tensor é constituído por autovetores (*eigenvectors*) e autovalores (*eigenvalues*) que caracterizam, respectivamente, a direção e a intensidade do movimento de difusão (Figura 1B). A direção preferencial da difusão em um dado *voxel* é a orientação do eixo mais longo da elipsoide, chamado de autovetor principal. Ao determinar o principal autovetor para cada *voxel*, podemos descrever a direção preferencial da difusão, geralmente exibido em imagem codificada por cores (Figura 1E). Comumente, podemos descrever um tensor usando 3 vetores, um ao longo do seu comprimento e dois ortogonais a isto e a cada um. Num caso idealizado, onde a difusão está presente apenas ao longo de uma dimensão, a elipsoide se tornará uma linha.

Por outro lado, quando na presença de restrições, a difusão pode apresentar direção preferencial, geralmente paralela aos obstáculos, sendo denominada de anisotrópica. Da mesma forma, se a difusividade é inteiramente aleatória, como no líquido, a elipsoide será representada como esfera. Portanto, a elipsoide provê uma forma de descrever a homogeneidade da direção de difusão dentro do *voxel*, ou seja, sua anisotropia. O grau de anisotropia em cada *voxel* é descrito por parâmetro chamado de FA, calculado a partir dos autovalores ($\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$), conforme fórmula abaixo:

$$FA = \sqrt{\frac{1}{2} \frac{\sqrt{(\lambda_1 - \lambda_2)^2 + (\lambda_2 - \lambda_3)^2 + (\lambda_3 - \lambda_1)^2}}{\sqrt{\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2}}}$$

O FA vai de 0, onde é uma esfera, até 1, onde a elipsoide vira uma linha. Altos valores de FA, como em estruturas de substância branca (ex. corpo caloso), podem refletir alto grau de anisotropia. Já na substância cinzenta e líquido teremos baixos valores de FA. Valores de FA podem ser codificados por cores, as quais representam a direção do autovetor principal, enquanto a intensidade representa a magnitude de FA.^(30,189)

Fonte: Adaptado de Mori S, Zhang J. Principles of diffusion tensor imaging and its applications to basic neuroscience research. Neuron. 2006;51(5):527–39.⁽²⁸⁾

Figura 1. Modelo para estimativa do tensor - A partir da medida obtida da difusão da água em diferentes eixos (A), estima-se o formato e orientação do tensor, aqui representado como uma elipsoide (B), cujo eixo maior representa a direção principal da difusão e, portanto, da orientação do trato (C). Um mapa de anisotropia (D) é gerado a partir deste modelo, em que regiões escuras são isotrópicas (elipsoide esférica) e regiões claras são anisotrópicas (elipsoide alongada). A informação de orientação é convertida para cor (F). Ao combinarmos intensidade da anisotropia (D) e cor (F), obtemos um mapa de FA codificado por cor (E)

Como foi dito, a partir do tensor de difusão, extraem-se as direções principais (autovetores) de difusão da água e suas magnitudes (autovalores). A partir dessas informações, calcula-se não apenas o FA, como também índices escalares complementares: AD, MD e RD.⁽¹⁹⁰⁾ O FA, como vimos, é o índice mais comumente utilizado e que determina a forma do tensor, sendo que quanto mais próximo de 1, maior tende ser a anisotropia do tecido avaliado. Sua interpretação pode ser complementada com informações de MD ($(\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3)/3$) e RD ($(\lambda_2 + \lambda_3)/2$), que costumam estar aumentados, enquanto FA diminui, em processos dis- ou desmielinizantes.⁽²⁹⁾ Regiões de valores altos de FA e baixos de MD podem indicar substância branca saudável ou altamente organizada. A medida de RD indica o grau em que a água se difunde numa direção que é perpendicular ao trato axonal. Dados de estudos experimentais com animais de laboratório sugerem que maior RD pode ser causada

por excessiva densidade de empacotamento axonal e/ou fraca mielinização.⁽¹⁹¹⁾ Já o AD (λ_1) tende a estar diminuído no caso de lesão axonal.^(27,188)

Por meio do DTI, avaliamos um tipo de restrição à difusão relacionada ao meio extracelular (*hindered diffusion*), ao passo que aquisições mais sofisticadas – como a imagem de difusão de alta resolução angular (HARDI – *high angular resolution diffusion coefficient*), que se utilizam de modelos mais complexos do que o tensor, conseguem avaliar também a restrição intra-axonal (*restricted diffusion*).⁽³⁰⁾ Outra técnica relativamente nova é a imagem por curtose de difusão (DKI – *diffusional kurtosis imaging*), a qual caracteriza o comportamento não-gaussiano de difusão da água em tecidos neurais. Acredita-se que a difusão não-gaussiana provenha de barreiras de difusão, como membranas celulares e organelas, e é, portanto, considerada como marcador para a integridade microestrutural do tecido. Com o DKI, tanto a difusão aparente como a curtose de difusão aparente são quantificadas. Em contraste com as métricas convencionais de DTI, a DKI não se limita a ambientes anisotrópicos e, assim, permite a quantificação da integridade microestrutural da substância cinzenta e branca, mesmo na presença de fibras cruzadas. Vale ressaltar que, devido à inclusão de efeitos não gaussianos, as estimativas dos índices de difusão derivados de DKI serão geralmente mais acuradas do que as obtidas com DTI convencional.⁽¹⁹²⁾

Menos utilizadas, as imagens espectrais baseadas em difusão (*diffusion basis spectrum*) possibilitam modelar células e edema / espaço extracelular como tensores de difusão isotrópica. Com esta técnica, foi possível capturar, com precisão, a gravidade da lesão axonal, desmielinização e inflamação em tratos da substância branca de modelos de camundongos de desmielinização do sistema nervoso central.⁽¹⁹³⁾

Independentemente do modelo de estimativa do tensor utilizado, cabe ressaltar que os mapas de DTI não refletem conexões funcionais ou sinápticas.

2.3.1 Significado das métricas de Imagem por tensor de difusão

A mielina, na medida em que suas camadas hidrofóbicas impedem que a água se mova perpendicularmente aos tratos axonais, impõe uma direção de difusão preferencial ao longo das fibras. Neste contexto, o DTI se torna uma ferramenta

importante em investigações clínicas de doenças mielínicas, incluindo leucodistrofias e esclerose múltipla (EM). Os distúrbios dismielinizantes são caracterizados por anormalidades na mielinização, tais como bainhas de mielina incompletas ou irregulares, enquanto a desmielinização assume a forma de ruptura da mielina formada anteriormente, como ocorre na EM.⁽¹⁹⁴⁾

Estudos prévios examinaram o potencial de AD e RD para detectar, diferencialmente, mielina e anormalidades nos axônios em camundongos transgênicos⁽²⁹⁾ – em que o gene da proteína básica de mielina está mutado – e no nervo óptico de modelo de isquemia retiniana.⁽¹⁹⁵⁾ Especificamente, estes estudos demonstraram que o dano axonal leva a diminuição acentuada de AD e a reduções modestas – muitas vezes insignificantes – de RD, enquanto a desmielinização aumenta RD sem alterar o AD. Estes resultados de DTI foram ainda validados com análises imuno-histoquímicas, apoiando que AD e RD são promissores marcadores específicos de danos axonais e mielínicos, respectivamente.⁽¹⁹⁶⁾

Em camundongos tratados com cuprizona - substância neurotóxica que leva à desmielinização em algumas semanas - Song et al. demonstraram que a extensão do aumento do RD refletiu a gravidade da desmielinização no corpo caloso, confirmado por meio de análise histológica. Com a progressão da remielinização, RD diminuiu.⁽¹⁹⁶⁾ As alterações de RD foram específicas para o curso do tempo das alterações na integridade da mielina, distintas da lesão axonal. Portanto, RD parece oferecer avaliação específica da desmielinização e remielinização, distinta do dano axonal agudo.⁽¹⁹⁶⁾ Apesar de AD e RD poderem quantificar, simultaneamente, a lesão axonal e desmielinização coexistentes em alguns tecidos, a técnica de DTI torna-se imprecisa na presença de inflamação, perda de tecido e de fibras de cruzamento.⁽¹⁹³⁾

Por sua vez, o MD foi avaliado num estudo focado na análise da degeneração Walleriana (degeneração de fibras de substância branca secundária e que ocorre à distância da lesão primária) de vias motoras descendentes de pacientes com pequenos infartos lacunares crônicos, mais especificamente da parte posterior da cápsula interna. MD estava moderadamente aumentado nas regiões afetadas, possibilitando diferenciar entre lesão primária e secundária.⁽¹⁹⁷⁾

Apesar da mielina ser classicamente atribuída como fonte primária de anisotropia, ela não é necessariamente o único fator. Mesmo um axônio desmielinizado pode conferir anisotropia à difusão de água. Como já mencionado, quanto maior a densidade axonal, ou quanto maior a mielinização dos axônios, maior a

anisotropia da difusão. Entretanto, além dessas contribuições microscópicas, a homogeneidade de orientação axonal dentro de um *voxel* tem um grande impacto na anisotropia. Dessa forma, quanto maior a heterogeneidade na orientação, menor tende a ser a anisotropia. Portanto, deve-se sempre ter em mente que baixos valores de FA podem também ocorrer em substância branca saudável, se houver heterogeneidade na orientação macroscópica. Por exemplo, do ponto de vista microscópico (nível celular), regiões corticais deveriam apresentar alta anisotropia. Porém, fatores macroscópicos (ex.: cruzamento de fibras em nível de *voxel*) se sobrepõem a fatores microscópicos na determinação da anisotropia por DTI, em função de limitações do modelo de tensor. Isso também significa que a anisotropia de difusão depende da resolução da imagem: quanto maior a resolução, menor a heterogeneidade de orientação e menor o efeito de volume parcial (por exemplo, na presença de mistura de substância branca com substância cinzenta em um mesmo *voxel*).⁽²⁸⁾

A idade e o sexo também são fatores de influência nas métricas de DTI. Um estudo verificou, numa amostra de 857 sujeitos saudáveis que, conforme a idade aumentava, FA diminuía, enquanto AD e RD aumentavam. A correlação entre idade e AD global, no entanto, foi fraca. A análise também revelou muitas regiões onde FA, AD ou RD diferiram entre homens e mulheres; no entanto, nenhuma região mostrou interação significativa entre idade e sexo.⁽¹⁹⁸⁾

2.3.2 Controle de qualidade e pré-processamento de imagens por tensor de difusão

Apesar do alto entusiasmo da comunidade neurocientífica quanto à técnica de DTI, a qualidade da imagem de difusão é geralmente pobre e sujeita a diversos artefatos (ex. perda de sinal; distorções geométricas provocadas por correntes parasitas de Foucault induzidas (*eddy-current*); artefatos de vibração sistemática; artefatos de *ghosting* provocados por correção incorreta de supressão de gordura, entre outras), quando comparada às aquisições estruturais (ex.: sequência pesada em T1). Por isso, a utilização cuidadosa de estratégias de pré-processamento é altamente recomendada, de forma a corrigir as distorções e ruídos dos dados que possam levar a falsos-positivos e impactar na reprodutibilidade dos estudos.^(35,190,199)

Um problema característico das sequências de EPI são as correntes parasitas de Foucault (*eddy currents*), que se originam da rápida transição de polaridade dos gradientes de direção. Estas variações do campo magnético induzem correntes elétricas em superfícies condutoras do corpo do indivíduo e nas próprias bobinas do equipamento, levando a distorções geométricas e a erros nas estimativas de valores de difusão. Por ser tão comum, geralmente, a correção de *eddy current* é um dos passos mais comuns aplicados no pré-processamento de dado de DTI.

Além disso, o movimento de cabeça leva, muitas vezes, a alterações na intensidade do sinal e a artefatos fantasma. Na maior parte das vezes, é possível corrigi-los por meio de registro do tipo linear (corpo-rígido) dos volumes com base em uma referência (geralmente o primeiro volume adquirido). Entretanto, existem movimentos de origem involuntária, provenientes de vibração do aparelho de MRI ou de sinais periféricos, como respiração e batimento cardíaco, que não são usualmente corrigidos.⁽²⁰⁰⁾

As EPI também são muito suscetíveis a artefatos de susceptibilidade magnética, ou seja, áreas de interface tecido-ar, como ossos ou cavidades sinusais, os quais afetam pontualmente a homogeneidade do campo magnético, prejudicando a codificação espacial da imagem final. Diversas formas já foram propostas para sua correção, tais como a utilização de imagens T1 para registro não-linear dos volumes DWI, função implementada em diversas ferramentas como FSL-FNIRT, ExploreDTI e MRTRIX;^(201–203) uso do *Field Mapping* – aquisição especial para obtenção do mapa da intensidade do campo magnético, o qual é estimado pela diferença de fase entre imagens adquiridas com tempos de eco diferentes;⁽²⁰⁴⁾ demais procedimentos mais sofisticados, como a ferramenta *TOP-UP* do FMRIB's Software Library (FSL),^(205,206) que se utiliza de duas imagens adquiridas com polaridades de fase opostas (por ex.: uma no eixo anteroposterior e outra no pósterio anterior), de forma que o campo magnético possa ser estimado e as distorções removidas.

2.3.3 Pós-processamento de Imagem por tensor de difusão

Finda as etapas de pré-processamento, os tensores são, então, estimados a partir do padrão de difusão do tecido, produzindo mapas FA, AD, MD e RD (Figura 2A). Estes mapas podem ser processados de diversas maneiras, como por

meio de análises baseadas em *voxel* (VBA – *voxel-based analysis*) ou pelo delineamento de ROI. O método VBA explora o cérebro todo (*whole-brain analysis*) em busca de alterações entre grupos.⁽³⁷⁾

A mais conhecida abordagem VBA é a primeira proposta para a quantificação de volumes (volumetria) de substância branca e cinzenta chama-se morfometria baseada em *voxel* (VBM – *Voxel based morphometry*).⁽³⁸⁾ Este método tradicional tem caído em desuso por suas limitações, principalmente em relação ao risco de falsos positivos, gerados em função do grau de suavização das imagens,⁽³⁷⁾ e à falta de acurácia no alinhamento durante a etapa de registro entre imagens de diferentes indivíduos para fins de comparação.

Procurando contornar estas questões, Smith et al. propuseram novo método automatizado, denominado de TBSS, implementado no *software* FSL.⁽³⁷⁾ Este método se diferencia dos demais ao criar um esqueleto médio da amostra, ou seja, um *template* de alinhamento padrão dos tratos comuns a todos os sujeitos, para onde os valores de FA, MD, RD e AD são projetados. Restringir a análise aos tratos do esqueleto médio diminui o número de comparações, aumentando o poder estatístico.

Por fim, a análise por ROI permite a delimitação *a priori* de áreas a serem analisadas, o que pode ser feito de forma manual ou por meio de máscaras extraídas de atlas, aumentando a sensibilidade da análise para detectar diferenças sutis.⁽⁴³⁾

2.3.3.1 Tractografia

A tractografia é uma forma de representação não-invasiva e 3D do percurso das fibras de tratos de substância branca que depende de pós-processamento do DTI, permitindo a visualização 3D do percurso das fibras de tratos de substância branca, por meio de sua estimativa e representação.^(27,44,45) A representação visual permite a seleção de regiões que, mais provavelmente, representam tratos ou feixes e, a partir disso, os parâmetros quantitativos podem ser obtidos para análise, fornecendo informações complementares à análise baseada em ROI.

A representação visual dos tratos é construída a partir de diversos algoritmos disponíveis, os quais podem ser determinísticos, probabilísticos ou globais.

Como forma de facilitar a visualização das direções preferenciais dos tratos, esta informação é geralmente codificada por cores: vermelho, verde e azul representam os eixos cartesianos X (eixo láterolateral), Y (craniocaudal) e Z (anteroposterior), respectivamente.

Ao calcularmos a direção principal do tensor (λ_1), obtemos a direção média da fibra axonal dentro do *voxel*. Quanto maior o número de direções de gradientes de difusão, melhor a resolução da tractografia e mais correta será a estimativa de fibras de passagem (*crossing fibers*). Por outro lado, a aquisição de mais gradientes aumenta o tempo da aquisição no exame MRI e também torna o processamento mais demorado e custoso em relação ao processamento computacional.⁽³⁰⁾

Por meio da representação 3D da tractografia (Figura 2B), é possível criar mapas de conectividade cerebral.⁽⁴⁵⁾ O conceito essencial de tractografia é que, se começarmos em um único *voxel* (chamado *seed voxel*) e identificarmos o seu principal autovetor (λ_1 , a direção de difusão principal), poderemos examinar todos os *voxels* ao redor e, assim, identificar um caminho contínuo de alinhamento dos principais autovetores enquanto o algoritmo escaneia a amostra. A tractografia também pode ser realizada adotando seleção *a priori* de pontos – origem (*seed*) e alvo (*target*) – que podem estar conectados por uma via de substância branca. O algoritmo de tractografia irá determinar se, de fato, um caminho contínuo de difusão conecta estas duas localizações. Esta abordagem pode, então, ser usada para determinar a existência de conectividade entre estas duas regiões cerebrais.

A tractografia oferece análise a nível individual. No entanto, através da comparação entre grupos de pacientes e de indivíduos saudáveis em uma variedade de condições, a conectividade do cérebro pode ser estudada por meio de métricas extraídas de tratos isolados, em detalhe, oferecendo *insights* sobre determinada condição.^(27,30) Como limitações da técnica, destacamos que a tractografia pode produzir resultados falso-positivos e falso-negativos, devido à presença de múltiplas direções de fibra dentro de um *voxel* ou, ainda, como resultado de efeito de volume parcial presente na substância branca do cérebro.

Figura 2. Exemplos de Imagem por Tensor de Difusão (DTI) e Tractografia – (A) Típico mapa de anisotropia fracionada (FA) com codificação da direção preferencial por cores obtido após processamento DTI. (B) Resultado de tractografia determinística

2.4 Estudos de imagem por tensor de difusão em síndrome das pernas inquietas

Dentre os poucos estudos de neuroimagem estrutural em portadores de SPI, apenas seis investigaram alterações na substância branca. Relatou-se a redução de FA bilateralmente em múltiplas áreas subcorticais e de regiões próximas aos córtices motor primário e somatossensorial,⁽³²⁾ no tálamo direito⁽³²⁾ e no joelho do corpo caloso.⁽⁴⁷⁾ Foram também descritos aumentos ou reduções de FA e RD em áreas subcorticais bilaterais, regiões temporais, ponte e cerebelo, sugerindo processo de mielinização alterado.⁽³³⁾ Entretanto, dois estudos não encontraram diferenças significativas de FA e outras métricas de DTI, após correção para múltiplas comparações.^(46,49) Para análise detalhada da literatura, vide tabela 1.

As razões para tamanha heterogeneidade dos resultados nos poucos estudos de DTI realizados podem estar relacionadas a diferentes questões metodológicas: gravidade da SPI pouco caracterizada, protocolos de aquisição de imagem de baixa resolução, processamento distintos, assim como tamanho amostral insuficiente. Além disso, a maior parte destes estudos não levaram em consideração variáveis clínicas relevantes que, poderão, potencialmente, serem correlacionadas com os resultados da análise de DTI, tais como: histórico familiar de SPI, gravidade e duração da doença, além da mensuração do nível de ferritina.

De modo geral, os estudos prévios de neuroimagem em SPI foram realizados em pacientes medicados ou com história prévia de tratamento

medicamentoso, tornando-se difícil excluir completamente potenciais efeitos confundidores de medicação em alguns dos resultados relatados.

É possível que mesmo alterações estruturais sutis nos tratos cerebrais se traduzam em correlatos funcionais importantes, desempenhando papel crucial no desenvolvimento da sintomatologia sensório-motora. Neste sentido, a técnica de DTI é aliada na investigação dos mecanismos subjacentes à SPI. O estudo dos tratos de substância branca tem potencial para gerar marcadores de neuroimagem para as formas leve e moderada da condição, auxiliando no diagnóstico precoce e na avaliação de tratamentos mais eficazes. O aumento no conhecimento sobre a neurobiologia subjacente à SPI fornecerá informações úteis para permitir, futuramente, intervenções que previnam os danos pessoais, sociais e ocupacionais decorrentes do desenvolvimento da SPI.

3 MÉTODOS

3.1 Participantes

O estudo recrutou voluntários no período de novembro de 2013 e agosto de 2015. Portadores de SPI primária foram recrutados via anúncios em plataformas digitais (*site* do Hospital Israelita Albert Einstein e redes sociais) e, também, presencialmente em ambulatório especializado de Medicina do Sono do Departamento de Neurologia da Universidade Federal de São Paulo. Voluntários saudáveis com idade e sexo comparáveis aos dos portadores de SPI foram recrutados entre colaboradores do hospital, contatos pessoais dos pesquisadores e parentes não consanguíneos dos pacientes incluídos. Todos os participantes do estudo passaram por entrevista presencial com médico especialista em Medicina do Sono (Dr. Samir C. Magalhães).

3.1.1 Critérios de elegibilidade

Para portadores de SPI, os critérios de inclusão foram: idade entre 18 e 70 anos; SPI na forma primária, diagnosticada conforme critérios do IRLSSG⁽⁵²⁾ e nunca ter tratado ou estar sem tratamento específico para SPI na última semana. Critérios de exclusão para indivíduos com SPI foram: histórico de outras doenças neurológicas - exceto insônia associada à SPI – ou dados clínicos sugestivos de causas secundárias de SPI, como histórico de deficiência de ferro, insuficiência renal crônica, polineuropatias, doenças da tireoide, deficiências de vitamina B12 e ácido fólico.^(59,207)

Para os controles, os critérios de inclusão foram: idade entre 18 e 70 anos, sexo e preferência manual comparáveis aos do Grupo SPI; ausência de condições neurológicas definidas por anamnese (Apêndice 1) e exame físico. Critérios de exclusão para os controles foram: história pessoal ou familiar de sintomas de SPI ou de comorbidades neurológicas (cefaleia, polineuropatia ou outra doença neurológica referida pelo paciente).

Foram critérios de exclusão para ambos os grupos (SPI e controles): presença de contraindicações para TMS e MRI (Anexo 2) (ex.: uso de marca-passo cardíaco, equipamentos eletrônicos implantados, como bombas no subcutâneo para administração de medicações, placas metálicas no couro cabeludo, objetos metálicos nos olhos ou no crânio); antecedente de epilepsia;⁽²⁰⁸⁾ uso de medicamentos que influenciam a excitabilidade cortical, medida por TMS, nas últimas duas semanas que antecederam o estudo (ex. betabloqueadores, bloqueadores de canais de cálcio, antidepressivos, anticonvulsivantes)⁽²⁰⁹⁾ e alterações estruturais na MRI de crânio (ex. AVC silencioso e malformações da transição crânio-cervical, como a síndrome de Arnold-Chiari).

3.1.2 Características dos participantes

Os participantes passaram por entrevista estruturada na qual foram avaliadas as seguintes características: idade, sexo, cor e preferência manual (lateralidade) pelo inventário de Edinburgh (Anexo 3).⁽²¹⁰⁾

Para os portadores de SPI, também foram avaliados: presença de história familiar de SPI, região sintomática do corpo, tratamentos prévios e presença do fenômeno de “aumentação”. A gravidade dos sintomas foi avaliada pela Escala de gravidade de sintomas de síndrome das pernas inquietas do IRLSSG (IRLSS – *International Restless Legs Syndrome Group*),⁽⁵²⁾ validada em português.⁽²¹¹⁾ A escala possui 10 questões referentes aos sintomas de SPI experienciados na última semana. Sua pontuação varia de 0 a 40 e, quanto maior a intensidade de sintomas, maior o valor total. A partir deste total, quatro grupos de gravidade dos sintomas são determinados: leve (0-10), moderada (11-20), grave (21-30) e muito grave (31-40) (Anexo 4).

A sonolência diurna excessiva foi aferida pela Escala de Sonolência de Epworth na sua versão em português,^(212,213) cujas questões avaliam a chance de vir a “cochilar” em determinadas situações, considerando a última semana (Anexo 5). Sua pontuação varia entre 0 e 24 (valores maiores indicam maior sonolência).

A qualidade de vida em portadores de SPI foi avaliada pelo Questionário de Qualidade de Vida para Síndrome das Pernas Inquietas⁽⁶¹⁾ (Anexo 6),

cujas pontuações variam de 0 a 100, com valores maiores associados à melhor qualidade de vida.

3.2 Desenho experimental

Desenho transversal, com análise de sequência de DTI de 41 portadores de SPI e 28 controles submetidos a MRI de encéfalo no Hospital Israelita Albert Einstein. Indivíduos portadores de SPI que já fizessem uso de medicações para controle da condição passaram por um período, no mínimo de 1 semana, de suspensão da droga (*wash-out*) em função do protocolo de TMS. Tal procedimento foi previamente autorizado pelo conselho de ética e consta no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 7).

A aquisição das imagens por MRI foi realizada, preferencialmente, no mesmo dia do experimento de TMS, no período da tarde.

3.2.1 Desfechos esperados

O desfecho primário deste estudo foi a análise exploratória para comparação das métricas de DTI (FA, AD, MD e RD), extraídas da substância branca cerebral, analisadas por TBSS, em controles e no grupo de todos os portadores de SPI, independentemente da gravidade dos sintomas (SPI_{tot}).

Desfechos secundários foram comparações entre:

1. Métricas obtidas por TBSS em controles e em subgrupos de SPI: portadores de SPI com intensidade leve a moderada (SPI_{lm}) e grave a muito grave (SPI_{mg});
2. Métricas obtidas em ROI no grupo controle e no grupo SPI, assim como no grupo controle e nos subgrupos de SPI;
3. Métricas obtidas em tratos-de-interesse (Tractografia) no grupo controle e no grupo SPI, assim como no grupo controle e nos subgrupos de SPI.

3.2.2 Protocolo de aquisição de imagens de ressonância magnética

As sequências foram obtidas por meio de exame de MRI realizado em equipamento de 3,0 T (Tim Trio – 102 canais de radiofrequência, Siemens Medical Systems, Erlangen, Alemanha) e bobina receptora de cabeça de 32 canais.

Para o estudo de DTI, os parâmetros da sequência de EPI foram: 60 cortes axiais angulados pelas comissuras anterior e posterior, com espessura de 2,0mm e espaçamento entre fatias de 2,2mm, campo de visão (FOV – *field-of-view*) de 260mm², força de gradiente de 45mT/m e 200 T/m/s, matriz de aquisição de 128 x 128 (*voxel* isotrópico de 2mm³), tempo de repetição (TR – *time of repetition*) de 6900ms, tempo ao eco (TE – *time of echo*) de 77ms, 1 repetição, saturação de gordura, 30 direções de gradientes não-colineares com *b value* de 1000s/mm² e 5 imagens b₀. Não se utilizou método de aquisição paralela. Tempo de aquisição total de 04:29s.

3.2.3 Processamento das sequências de imagem por tensor de difusão

Dado que a qualidade da imagem de difusão é geralmente pobre comparada às imagens estruturais de alta resolução (imagem T1), torna-se altamente recomendada a utilização cuidadosa de estratégias de pré-processamentos destes dados, de forma a corrigir suas distorções e ruídos que podem levar a falsos-positivos e impactar na reprodutibilidade dos estudos.⁽³⁵⁾ Por isso, todas as sequências de DTI passaram por cuidadoso controle de qualidade, aumentando a confiabilidade e a sensibilidade da análise.

O protocolo de processamento utilizado neste trabalho não estava disponível na instituição e foi desenvolvido especificamente para este projeto, incluindo a confecção de passo-a-passo ilustrativo (Apêndice 2).

3.2.4 Pré-processamento

Tanto o pré-processamento, como a análise dos dados de DTI foram realizados por meio de ferramentas do *software* FSL 5.0.10 (FMRIB *Software Library*, <http://www.fmrib.ox.ac.uk/fsl/>). O controle de qualidade foi feito, a cada etapa, quando

as imagens eram visualmente conferidas quanto à presença de irregularidades e/ou artefatos (ex.: movimento de cabeça ou *spikes*). Inicialmente, as imagens *DICOM* foram convertidas em arquivos *Nifti* através do programa *MRIConvert*. Com base na conferência de imagem FLAIR e da imagem ponderada em T1, por um neurorradiologista experiente (Eajr), participantes com anomalias estruturais relevantes foram excluídos.

Inicialmente, com a ferramenta *Brain Extraction* (BET),⁽²¹⁴⁾ uma máscara binária possibilitou a extração da caixa craniana em relação ao primeiro volume b0, tendo sido aplicada a todas as imagens da sequência.

De forma a corrigir distorções ocasionadas pelas correntes parasitas de Foucault (*eddy currents*) – geradas pela rápida mudança dos gradientes de direção – utilizamos a ferramenta *Eddy Current Correction*, parte da FMRIB Diffusion Toolbox do FSL (FDT; FMRIB Center, Universidade de Oxford, Reino Unido), alinhando toda a sequência de DTI à primeira imagem b0 de referência, por meio de registro rígido, para a correção de movimentos de cabeça.^(203,215)

O movimento da cabeça (translação e rotação) foi calculado com base em *script* disponível gratuitamente.⁽²¹⁶⁾ Depois disso, a tábua de codificação das direções de gradiente (BVEC – *gradient vector direction table*), correspondente de cada sujeito, foi rodado de acordo com tal correção de movimento, de forma a preservar a precisão das informações de orientação.⁽²¹⁷⁾

Em seguida, os tensores de difusão foram estimados para cada *voxel* (DTIFIT). Para melhorar a precisão, adotamos o método dos mínimos quadrados lineares ponderados (*weighted linear least-squares*).^(199,218)

Finalmente, mapas FA, AD, MD e RD foram gerados e inspecionados visualmente, por uma última vez, para artefatos (ex. queda de sinal, distorção geométrica, ruído e movimento brusco da cabeça) para avaliar a necessidade de exclusão de dados da análise. Por fim, procedemos à análise via método TBSS, por ROI e de tractografia probabilística, conforme descrito a seguir.

3.2.5 Análise por estatística espacial baseada em tratos

A análise exploratória, a nível de *voxel*, no cérebro todo, foi conduzida com a ferramenta TBSS do FSL.⁽³⁷⁾ Primeiramente, os mapas de FA foram

escalados para intervalo de intensidade entre 0 e 1, o que remove possíveis ruídos. O modelo FMRIB58_FA (1mm isotrópico) foi usado como *template* para o registro não-linear (-T *flag*) do mapa FA de cada sujeito. Os mapas de FA foram, subsequentemente, processados pelo TBSS de forma a criar um “esqueleto” da representação de tratos de substância branca médio para cada indivíduo. Tais imagens “esqueletonizadas” de cada sujeito foram geradas por meio da projeção dos valores máximos de FA próximos ao centro do trato da substância branca sobre o esqueleto médio, de maneira que cada *voxel* do esqueleto assumisse o valor máximo de FA da região vizinha. Estes esqueletos médios são, então, limiarizados (excluindo $FA \leq 0,2$), afim de focar apenas nos principais feixes de fibras, menos suscetíveis à variabilidade interindividual.⁽³⁷⁾ As transformações exatas derivadas do registro não linear de mapas FA para o espaço padrão foram aplicadas também aos mapas de difusividade AD, MD e RD.

Considerando os resultados discrepantes de estudos anteriores (Tabela 1) e para verificar se os marcadores de microestrutura da substância branca poderiam estar difusamente alterados na SPI, também realizamos análise de nível global, considerando a média dos *voxels* de todo o esqueleto médio (com $FA \geq 0,2$) para cada métrica extraída do tensor, conforme já realizado em outros estudos.^(206,219,220)

3.2.6 Análise por região de interesse

Como segundo passo, extraímos média das métricas de DTI por meio de ROIs, potencialmente implicadas na fisiopatologia da SPI e relatadas em pesquisas anteriores: TCE no nível do pedúnculo cerebral;⁽³²⁾ pedúnculos cerebelares superior, médio e inferior.^(33,47) Além disso, conferimos ROIs em regiões significativas na análise exploratória de TBSS.

De forma a evitar viés, foram criadas máscaras de ROI específicas (FSLVIEW do FSL 5.0.10) com base no atlas de substância branca JHU ICBM-DTI-81,⁽²²¹⁾ disponível na ferramenta *FSLVIEW* do FSL. Os valores médios de FA, AD, MD e RD dos sujeitos em cada grupo foram extraídos de mapas de difusão normalizados (isto é, registrados no espaço padrão FMRIB58_FA), para fins de comparação entre grupos.

3.2.7 Tractografia

Análises de tractografia probabilística foram realizadas por meio de scripts do FSL (AutoPtx v0.1.1),⁽²²²⁾ disponíveis gratuitamente (<http://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslwiki/AutoPtx>). Este procedimento melhora a replicabilidade pelo uso de um conjunto padrão de máscaras (inicial = *seed*, alvo = *target* e de exclusão), com base nas melhores práticas recomendadas para a tractografia.^(223–226)

Primeiramente, o *script* AutoPtx executa a ferramenta BEDPOSTx (sigla para *Bayesian Estimation of Diffusion Parameters Obtained using Sampling Techniques*), que aplica modelo bayesianos para estimar até três orientações de fibras por *voxel*. Em seguida, o rastreamento probabilístico (1000 iterações) é realizado no espaço nativo com o PROBTRACKx.^(227,228)

Todos os tratos foram verificados visualmente para garantir sua existência e completude. Para contabilizar a variabilidade entre indivíduos, as imagens de densidade de trato foram divididas pelo número total de número de linhas de fibras amostradas a partir de sua máscara *seed*. Em seguida, todos os tratos foram limitados em 5% para remover conexões improváveis, sendo convertidos em máscara binária usando o comando *fslmaths*. Estas máscaras de trato foram, então, transformadas não linearmente do espaço de difusão nativo para o espaço padrão (FMRIB58_FA_1mm), usando a deformação inversa com a interpolação de vizinho mais próximo (*nearest neighbor interpolation*). Finalmente, aplicamos o comando *fslstats* para derivar a média das métricas FA, AD, MD e RD para cada trato, bilateralmente. Com base em estudos anteriores (Tabela 1) e em resultados de TBSS, dois tratos de interesse foram reconstruídos: TCE (do giro pré-central ao pedúnculo cerebral) e radiação talâmica posterior.

3.3 Análise estatística

3.3.1 Análise estatística da amostra

Variáveis categóricas foram descritas por números absolutos e frequências. Variáveis quantitativas foram descritas por médias e desvios-padrão ou medianas e intervalo interquartil.

A classificação do grupo dos portadores de SPI foi feita de acordo com a graduação da escala IRLSS, sendo que indivíduos com valores entre 0 e 20 foram considerados como portadores da forma leve a moderada (SPI_{lm}). Aqueles com valores de IRLSS entre 21 e 40 pontos foram incluídos no grupo de graves a muito graves (SPI_{mg}).

Dados demográficos e variáveis clínicas entre os grupos SPI_{lm} , SPI_{mg} e controles foram comparados com ANOVA *one-way*, teste de Kruskal-Wallis ou teste exato de Fisher, de acordo com a natureza e distribuição dos dados. Quando comparados dados demográficos e clínicos entre os grupos SPI_{lm} e SPI_{mg} , foram utilizados teste *t* de Student, teste de Mann-Whitney ou teste exato de Fisher, a depender da natureza e distribuição dos dados. A distribuição das variáveis numéricas foi estudada por histogramas e *boxplots* e foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

O coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para avaliar as associações entre a escala IRLSS e as métricas derivadas de DTI de cada cluster (TBSS), ROI ou trato que produzisse resultados significativos ($p \leq 0,05$ corrigido para o número de comparações).

As análises estatísticas deste estudo foram realizadas usando o *software* SPSS 17.0 (SPSS Inc. 2008. SPSS Statistics for Windows, Version 17.0. Chicago: SPSS Inc.).

3.3.2 Desfecho primário: estatística espacial baseada em tratos

Um procedimento de inferência não paramétrico (*Randomise* do FSL, teste baseado na permutação de Monte Carlo) foi usado para comparações entre grupos: SPI_{tot} *versus* controles; SPI_{lm} *versus* SPI_{mg} *versus* controles) com 10.000 permutações em mapas estatísticos não suavizados. Idade e sexo foram utilizados como covariáveis para evitar efeitos de confundimento. Os resultados dos testes de permutação foram corrigidos para comparações múltiplas por meio da taxa de erro da família dos testes (FWE – *family-wise error*), considerando valor- $p < 0,05$ e usando parâmetros-padrão de correção aprimorada de cluster livre de limiar (TFCE – *threshold-free cluster enhancement*), o procedimento mais sensível disponível no TBSS e que tem maior controle do erro TIPO II. Os *clusters* significativos ($p \leq 0,05$) foram sobrepostos

ao esqueleto médio normalizado. O recurso de preenchimento do TBSS foi aplicado a todos os mapas de significância para facilitar a exibição dos resultados. Mudanças no nível global (valores médios extraídos do esqueleto da substância branca média) para cada métrica foram analisadas usando modelo linear geral (GLM), controlando para idade e gênero. O atlas de tratos de substância branca – JHU (*John Hopkins University*) - foi usado para observar as diferenças detectadas por TBSS nas diferentes estruturas anatômicas no espaço padrão.

3.3.3 Desfechos secundários: análises de região-de-interesse e tractografia

As medidas extraídas de cada ROI e trato-de-interesse aqui apresentadas são a média de ambos os hemisférios cerebrais. A análise de variância multivariada (MANOVA) foi realizada para examinar o efeito do grupo (SPI_{tot} versus controles) ou subgrupos de acordo com a gravidade e controles (SPI_{lm} versus SPI_{mg} versus controles) em FA, AD, MD e RD extraídas de cada ROI ou trato, considerando idade e gênero como covariáveis de controle. Valores- $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos e submetidos à correção de Bonferroni para comparações múltiplas.

3.4 Aspectos éticos

O comitê de ética do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa do Albert Einstein aprovou o estudo sob o número SGPP 2527-15 e CAAE 54069516.4.0000.0071. Todos os voluntários concordaram em participar e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 7). Todos os dados foram obtidos de acordo com os requerimentos do comitê de ética e com as recomendações estabelecidas na Declaração de Helsinki (1964), conforme emenda de Tóquio (1975), Veneza (1983) e Hong-Kong (1989).

4 RESULTADOS

4.1 Características da amostra final

Duzentos e oitenta e quatro indivíduos foram triados por meio digital ou presencial. A figura 3 mostra o fluxo de recrutamento e inclusão de portadores de SPI e de controles.

Foram adquiridas imagens de difusão para análise de DTI de 41 indivíduos portadores de SPI. Dois foram excluídos por apresentarem alterações estruturais: no primeiro paciente foi encontrado infarto lacunar em ponte, o segundo apresentou infarto lacunar em cerebelo e o terceiro por movimentação excessiva de cabeça que gerou artefatos na imagem.

Foram adquiridas 28 imagens de difusão no grupo controle. Dois sujeitos foram excluídos por artefatos de imagem causados por excesso de movimento de cabeça e outros 2, por terem descoberto, após a inclusão no estudo, que possuíam parentes de primeiro grau com histórico de SPI. Portanto, foram analisadas as imagens de 38 portadores de SPI e 24 controles.

DWI: Imagem de difusão; SPI: Síndrome das Pernas Inquietas / Doença de Willis-Ekbom; RM: Exame de Imagem por Ressonância Magnética. *Outras razões: impossibilidade de participar do estudo em função da distância ao local da pesquisa e falta de tempo para participar do protocolo; uso de drogas que interferiram na excitabilidade cortical ou contraindicações ao exame de estimulação magnética transcraniana.

Figura 3. Fluxograma de recrutamento e inclusão no estudo

4.2 Características demográficas e clínicas dos participantes

Dados demográficos participantes estão apresentados na tabela 2. A tabela 3 mostra as características clínicas dos portadores de SPI, agrupados por gravidade.

Tabela 2. Características demográficas de indivíduos controles e portadores da síndrome das pernas inquietas/doença de Willis-Ekbom, de acordo com a gravidade

	Controle (n=24)	SPI leve a moderada (n=14)	SPI grave a muito grave (n=24)	Valor-p
Idade – Média (DP)	43,9 (11,5)	42,9 (15,7)	48,6 (12,3)	0,31 ¹
Sexo – Feminino	20 (83,3%)	12 (85,7%)	17 (70,8%)	0,56 ²
Inventário de Oldfield – Mediana (intervalo)	-83,3 (-100,0; -33,3)	-79,2 (-100,0; 41,7)	-83,3 (-100,0; 75,0)	0,71 ³
Escala de Sonolência de Epworth – Média (DP)	7,1 (3,1)	9,9 (5,0)	10,8 (4,7)	0,013¹
Movimento de cabeça – Média (SD)	1,40 (0,38)	1,40 (0,45)	1,40 (0,35)	0,99 ¹

Valor-p¹: ANOVA de uma via; valor-p²: teste exato de Fisher; valor-p³: teste de Kruskal-Wallis; DP: desvio-padrão; SPI: síndrome das pernas inquietas / doença de Willis-Ekbom. Em negrito, destaque para valor-p significativo (<0,05).

Tabela 3. Características clínicas dos indivíduos com síndrome das pernas inquietas/doença de Willis-Ekbom

	SPI leve a moderada (n=14)	SPI grave a muito grave (n=24)	Valor-p
Idade de início dos sintomas (anos) – Mediana (intervalo)	27,5 (4,0; 60,0)	20,0 (6,0; 55,0)	0,345 ¹
Tempo de progressão da doença (anos) – Mediana (intervalo)	8,0 (1,0; 65,0)	25,5 (1,0; 45,0)	0,006¹
História familiar positiva para SPI – Sim, n(%)	11 (78,6)	16 (66,7)	0,488 ²
Frequência dos sintomas da SPI			<0,001²
≤1x / ano > 1x / mês, n(%)	2 (14,3)	0 (0,0)	
≤1x / mês > 1x / semana, n(%)	7 (50,0)	2 (8,3)	
≥ 1x / semana, n(%)	5 (35,7)	22 (91,7)	
Horário de início dos sintomas			0,032²
após 21h, n(%)	10 (71,4)	10 (41,7)	
após 18h, n(%)	4 (28,6)	5 (20,8)	
antes de 18h, n(%)	0 (0,0)	9 (37,5)	
mais do que uma região (além de pernas), n(%)	2 (14,3)	7 (29,2)	0,438 ²
Escala Internacional de Gravidade (IRLSS) graduação (pontuação total)			
leve (0 a 10), n(%)	4 (28,6)	0 (0,0)	
moderado (11 a 20), n(%)	10 (71,4)	0 (0,0)	
grave (21 a 30), n(%)	0 (0,0)	14 (58,3)	
muito grave (31 a 40), n(%)	0 (0,0)	10 (41,7)	
Questionário de qualidade de vida para Síndrome das pernas inquietas (QOL) – Mediana (intervalo)	76,0 (15,8)	56,7 (14,0)	<0,001³

Valor-p¹: teste de Mann-Whitney; valor-p²: Teste exato de Fisher; valor-p³: teste *t* de Student. SPI: síndrome das pernas inquietas/doença de Willis-Ekbom. Em negrito, destaque para valor-p corrigido (<0,05).

Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos controle e os subgrupos de indivíduos com SPI quanto a idade, sexo, preferência manual ou movimento de cabeça. Os portadores de SPI apresentaram valores maiores na escala de sonolência de Epworth, indicando maior sonolência diurna. Todos os portadores de SPI reportaram sintomas bilaterais nos membros inferiores. Dentre os portadores de SPI, apenas seis estavam em tratamento medicamentoso para SPI (pramipexole, 0,125 – 1,0mg).

4.3 Desfecho principal: estatística espacial baseada em tratamentos

A análise TBSS revelou valores de AD significativamente mais baixos em indivíduos com SPI em comparação com controles (p=0,05 corrigido para

comparações múltiplas; Figura 4) na radiação talâmica posterior esquerda, conforme o atlas JHU *White-matter*.⁽²²¹⁾

AD: difusividade axial; TBSS: estatística espacial baseada em tratos; SPI: síndrome das pernas inquietas/doença de Willis-Ekbom. SPI_{tot}: grupo composto por todos os portadores de SPI, independentemente da gravidade dos sintomas. SPI_{mg}: subgrupo composto por indivíduos portadores das formas grave a muito grave de SPI. E: lado esquerdo do cérebro. $p=0,05$ corrigido.

Figura 4. Resultados da análise de estatística espacial baseada em tratos – Clusters significativos, no que se refere à comparação entre: (A) SPI_{tot} e controles, diminuição de difusividade axial em sujeitos com síndrome das pernas inquietas, em cluster na radiação talâmica posterior esquerda; (B) sujeitos e controle

A figura 5 mostra diagrama de caixa (mediana $\pm$ erro padrão) dos valores de AD extraídos desse *cluster* significativo nos grupos controles e SPI_{tot}. Não foram encontradas diferenças significativas nas medidas de FA, MD ou RD ($p>0,050$). Estes valores AD não se correlacionaram significativamente com a escala IRLSS ($p>0,050$).

TBSS: estatística espacial baseada em tratos; SPI: síndrome das pernas inquietas/doença de Willis-Ekbom. SPI_{tot}: grupo que contém todos os indivíduos portadores de SPI, independentemente da gravidade. Valores são exibidos como mediana $\pm$ erro padrão.

Figura 5. Gráfico de diagrama de caixa (*boxplot*) dos valores da difusividade axial extraídos do cluster significativo revelado na análise de estatística espacial baseada em tratos entre controles e o grupo de todos os portadores de Síndrome das pernas inquietas – A localização do cluster corresponde à radiação talâmica posterior esquerda. O quadro inferior apresenta o mesmo *boxplot* ampliado para facilitar a visualização

A análise de subgrupo (SPI_{mg} *versus* controles) mostrou que AD foi significativamente menor em SPI_{mg} em um pequeno *cluster* adjacente à coroa radiada posterior esquerda (atlas ICBM-DTI-81) ($p=0,05$ corrigido para comparações múltiplas; Figura 5B). Não houve diferença na análise de subgrupo entre controles e SPI_{lm}.

A figura 6A mostra diagrama de caixa (mediana $\pm$ erro padrão) dos valores de AD extraídos deste *cluster* significativo em todos os indivíduos, entre os grupos de controles e SPI_{mg}. Estes valores AD foram correlacionados negativamente com a escala IRLSS ($\rho=-0,64$, $p=0,006$ corrigido para 3 comparações, Figura 6B). Novamente, não foram encontradas diferenças significativas em FA, MD ou RD ($p>0,050$).

TBSS: estatística espacial baseada em tratos; SPI: síndrome das pernas inquietas/doença de Willis-Ekbom; IRLSS: Escala Internacional de Classificação da Gravidade dos Sintomas de SPI; SPI_{mg}: subgrupo composto por indivíduos portadores das formas grave a muito grave de SPI.

Figura 6. Diagrama de caixa (*boxplot*) dos valores da difusividade axial extraídos do cluster significativo revelado na análise de estatística espacial baseada em tratos entre controles e portadores das formas grave a muito grave de síndrome das pernas inquietas – (A) Valores de difusividade axial extraídos do cluster significativo revelado na análise de estatística espacial baseada em tratos entre controles e portadores das formas grave a muito grave de síndrome das pernas inquietas – (A) Valores de difusividade axial extraídos do cluster significativo revelado na análise de estatística espacial baseada em tratos entre controles e portadores das formas grave a muito grave de síndrome das pernas inquietas grave, correspondendo à coroa radiada posterior esquerda. O quadro inferior apresenta o mesmo *boxplot* ampliado para facilitar a visualização. Valores são exibidos como mediana $\pm$ erro padrão. (B) Gráfico de dispersão mostra correlação significativa entre os valores de difusividade axial em portadores das formas grave a muito grave de síndrome das pernas inquietas e a escala de gravidade de sintomas de síndrome das pernas inquietas do Grupo Internacional de Estudos em Síndrome das Pernas Inquietas

Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (SPI_{tot} *versus* controles) nos valores globais de FA, AD, MD ou RD, obtidos do esqueleto médio de cérebro total. Da mesma forma, não houve diferenças estatisticamente significativas para métricas globais entre controles e subgrupos de indivíduos com SPI, de acordo com a gravidade dos sintomas.

4.4 Desfechos secundários

4.4.1 Análise baseada em região de interesse

A figura 7 mostra todas as ROIs incluídas para análise neste estudo.

Figura 7. Localizações anatômicas das seis regiões de interesse corticais e subcorticais alvo deste estudo

A tabela suplementar 1 (Apêndice 3) mostra os resultados completos da análise de ROI. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre o grupo de indivíduos portadores de todos os níveis de gravidade da SPI e controles, após a correção para comparações múltiplas. Além disso, a avaliação *post-hoc* da radiação talâmica posterior não mostrou diferenças significativas entre SPI e controles.

A análise de subgrupo (Tabela 4) revelou aumento de RD no pedúnculo cerebelar superior bilateralmente em SPI_{mg}. No subgrupo SPI_{lm}, FA estava aumentado nos pedúnculos cerebelares inferiores (média $\pm$ DP; $0,45 \pm 2,4$) em relação aos controles ($0,45 \pm 0,02$), porém não houve diferença estatística significativa após correção para múltiplas comparações ($p=0,14$).

Tabela 4. Quadro-resumo das métricas de imagem por tensor de difusão extraídas de regiões de interesse que geraram valores-p (não corrigidos) inferiores a 0,05 nas comparações *post-hoc* de subgrupos

	Controles	SPI _{mg}	Variação	Valor-p	Valor-p	D de Cohen
	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	percentual		corrigido	
FA						
Coroa radiada posterior	4,3E-01 $\pm$ 2,5E-02	4,2E-01 $\pm$ 1,9E-02	-3,6%	0,01	0,06	-0,7
Pedúnculo cerebelar superior	5,1E-01 $\pm$ 2,2E-02	5,1E-01 $\pm$ 2,7E-02	-0,9%	0,03	0,18	-0,2
Pedúnculo cerebelar inferior	4,5E-01 $\pm$ 2,3E-02	4,4E-01 $\pm$ 2,0E-02	-1,8%	0,05	0,32	-0,4
AD (m ² /s)						
Coroa radiada posterior	1,2E-03 $\pm$ 3,1E-05	1,2E-03 $\pm$ 3,4E-05	-1,8%	0,03	0,16	-0,7
MD (m ² /s)						
Pedúnculo cerebelar superior	1,1E-03 $\pm$ 6,7E-05	1,2E-03 $\pm$ 8,2E-05	4,2%	0,01	0,09	0,7
RD (m ² /s)						
Pedúnculo cerebelar superior	8,2E-04 $\pm$ 6,2E-05	8,6E-04 $\pm$ 8,2E-05	5,2%	0,01	0,05	0,6

Um GLM foi usado para comparar as médias de FA, AD, MD e RD entre os grupos, com idade e sexo como covariáveis de controle; valor-p se refere ao teste bicaudal. Em negrito, destaque para valor-p corrigido significativo ($<0,05$). Os valores percentuais de variação são em relação aos portadores de SPI em comparação aos controles. SPI_{mg}: SPI grave a muito grave; SPI_{lm}: SPI leve a moderada; GLM: Modelo Linear Geral; DP: desvio-padrão; FA: anisotropia fracionada; AD: difusividade axial; MD: difusividade média; RD: difusividade radial; ROI: região de interesse.

A figura 8 mostra diagrama de caixa (mediana $\pm$ erro padrão) dos valores de RD extraídos desta ROI em todos os indivíduos, agrupados entre controles e SPI_{mg}.

ROI: região de interesse; SPI: síndrome das pernas inquietas/doença de Willis-Ekbom; SPI_{mg}: subgrupo composto por indivíduos portadores das formas grave a muito de SPI. * $p < 0,05$. GLM controlado para idade e sexo. GLM: modelo linear geral. Valores são exibidos como mediana $\pm$ erro padrão.

Figura 8. Diagrama de caixa (*boxplot*) dos valores da difusividade radial (RD) extraídos da ROI correspondente ao pedúnculo cerebelar superior entre controles e SPI_{mg} – O quadro inferior apresenta o mesmo *boxplot* ampliado para facilitar a visualização

4.4.2 Tractografia

A figura 9 mostra os tratos de interesse incluídos na análise. Os resultados para todos os tratos estão descritos na tabela suplementar 2 (Apêndice 4). Nenhuma das diferenças alcançou significância estatística após a correção para comparações múltiplas. Análises adicionais de subgrupo não revelaram diferenças significativas entre grupos.

E: hemisfério esquerdo.

Figura 9. Os dois tratos de interesse no espaço padrão (FMRIB58_FA) reconstruídos via tractografia probabilística em sujeito representativo da amostra

5 DISCUSSÃO

De forma geral, nossos resultados evidenciam mudanças sutis na substância branca, mais proeminentes nos sujeitos portadores de SPI com sintomas mais graves, em áreas relacionadas à integração multissensorial ou sensorio-motora, em comparação aos controles. Esses resultados apoiam a hipótese de integração defeituosa dessas redes, levantada por estudos anteriores.^(19,229) Além disso, reforçam a premissa de estudos recentes de que o foco nessas redes com estratégias de neuromodulação, como a rTMS,^(19,111,113) possam vir a melhorar os sintomas da SPI, particularmente em pacientes que apresentam resposta insatisfatória ao tratamento medicamentoso.⁽¹¹¹⁾ Entretanto, ainda precisa ser determinado se essas alterações refletem disfunção primária, mecanismos compensatórios ou plasticidade prejudicial.

Este trabalho trouxe informações novas em relação a estudos anteriores, ao fornecer avaliação completa das métricas de DTI (FA, AD, MD e RD) e tirar proveito da melhor razão sinal-ruído (SNR – *signal-to-noise ratio*) disponível com equipamento de MRI de 3.0-T e bobina de cabeça de 32 canais.^(36,230) Maior SNR diminui a incerteza na estimativa de métricas derivadas de DTI.^(36,231) Além disso, o número de direções (30) oferece maior resolução e acurácia na detecção de diferenças entre grupos.⁽²³²⁾ Este estudo foi o primeiro a aplicar análise de ROI, bem como análises baseadas em tractografia, em uma das maiores amostras de indivíduos portadores de SPI com diferentes níveis de gravidade (leve, moderada e grave). Outros pontos fortes deste projeto foram a seleção de indivíduos por neurologista especialista em medicina do sono e o uso dos critérios estabelecidos pelo IRLSSG.

Como perspectivas futuras, sugere-se a utilização de protocolos de aquisição com maior número de direções de gradiente para o uso de modelos mais sofisticados para estimativa da difusividade. Estudos futuros em SPI também poderão se beneficiar da análise conjunta de DTI com exames de MRI multimodais, tais como as sequências específicas que permitam quantificar alterações de ferro (ex. imagem ponderada em suscetibilidade magnética), detecção de alterações de mielina (ex. imagem quantitativa T1/T2), assim como alterações de conectividade funcional (ex. rsfMRI).

5.1 Análise exploratória de cérebro inteiro com estatística espacial baseada em tratos

Os principais resultados da análise com TBSS foram a diminuição de AD na radiação talâmica posterior esquerda no grupo SPI_{tot} em comparação com controles. Já no subgrupo SPI_{mg} , AD estava reduzido na coroa radiada posterior esquerda. Houve correlação significativa, inversa, entre AD e a gravidade dos sintomas da SPI. Não verificamos qualquer diferença significativa na análise global da substância branca.

Até agora, apenas três estudos haviam avaliado a substância branca na SPI com TBSS. Nossos resultados de diminuição de AD na radiação talâmica posterior esquerda no grupo SPI e na coroa radiada posterior esquerda no subgrupo de pacientes com sintomas mais graves contrastam com a ausência de diferença significativa relatada anteriormente por Rizzo et al. e Zhuo et al.^(49,233) Seus resultados podem ser parcialmente explicados pelo menor número de direções de gradiente (maior variabilidade nas métricas estimadas a partir do tensor⁽²³⁴⁾) destes estudos – Rizzo et al., 6 direções e Zhuo et al., 15 direções,^(46,49) *versus* 30 (o presente estudo⁽⁵⁰⁾) – e pela restrição das análises às métricas FA e MD.⁽⁴⁹⁾

Por outro lado, Belke et al.⁽³³⁾ relataram em grupo de pacientes com SPI (6 moderado e 6 grave) uma variedade de mudanças nas métricas de DTI usando TBSS (para descrição detalhada, ver Tabela 1). Cabe ressaltar que os autores suavizaram os *voxels* ao longo do esqueleto e optaram por método de limiar baseado em *cluster* (*cluster-based thresholding method*) não ortodoxo (no lugar do TFCE). O procedimento de “esqueletização” (*skeletonization*) no TBSS descarta a necessidade de suavização espacial e, portanto, reduz o risco de falsos positivos.^(37,39) Além disso, estes autores utilizaram ferramenta para análise estatística (AFNI AlphaSim) que reconhecidamente contém *bug* que aumenta a taxa de falsos positivos.⁽²³⁵⁾ O perfil de alterações (maior FA, acompanhados de maiores RD e AD) encontrado neste estudo também pode refletir a falta de controle para covariáveis como sexo e idade, em contraste com os métodos utilizados no presente estudo e em trabalhos anteriores.^(46,47) Notavelmente, não encontramos *clusters* significativos no TBSS quando os dados foram reanalisados sem controle para gênero e idade (dados não mostrados).

5.1.1 Radiação talâmica posterior: relevância funcional e envolvimento na síndrome das pernas inquietas e em outras condições

Nosso estudo revelou, pela primeira vez – com base na revisão da literatura - diminuição significativa de AD na radiação talâmica posterior esquerda em indivíduos com SPI em comparação com controles, sugerindo dano axonal.⁽²³⁶⁾ A radiação talâmica posterior transmite informações sensoriais periféricas do grupo de núcleos látero-posteriores do tálamo (o núcleo geniculado lateral e pulvinar) para áreas occipitais e parietais posteriores.^(237–239)

Curiosamente, Etgen et al. reportaram que a densidade de substância cinzenta, mensurada por VBM, estava aumentada no pulvinar bilateral em indivíduos com SPI grave.⁽¹³⁾ O pulvinar é relé de alta ordem densamente conectado com os córtices sensório-motores primários,⁽²⁴⁰⁾ envolvidos na integração sensorial multimodal^(241,242) e modulação de redes de controle de atenção e sensório-motora.^(243,244)

Estudos de fMRI reportaram aumento de atividade no tálamo contralateral associada à sensação de desconforto na perna ^(17,114) em portadores de SPI em relação a controles. Foram também descritos aumento dos níveis de glutamato (medidos no tálamo direito via espectroscopia por RM)⁽¹⁴⁾ e diminuição dos níveis de ferro avaliada bilateralmente em regiões talâmicas por meio de ultrassonografia transcraniana e sequência de ressonância magnética ponderada em T2.⁽²⁴⁵⁾

Unrath & Kassubek relataram um estudo de caso, no qual sintomas de SPI surgiram após AVC isquêmico lacunar no tálamo esquerdo. O exame de MRI evidenciou que a lesão estava localizada principalmente no núcleo ventral lateral, relacionado à modulação da função motora. Além disso, a representação visual por tractografia sugeriu comprometimento das conexões da substância branca entre o tronco cerebral, o tálamo e o córtex, dentro da área lesionada. De forma interessante, os sintomas sensório-motores reportados pelo paciente foram estritamente unilaterais e contralaterais à lesão. O paciente não apresentava história familiar de SPI ou comorbidades relevantes, além de apresentar medidas normais de velocidade de condução nervosa e estado normal de ferro.⁽⁸⁸⁾ Juntos, esses resultados sugerem que anormalidades nas vias talamocorticais podem desempenhar papel relevante na patogênese da SPI.

Alterações de métricas de DTI na radiação talâmica posterior também já foram descritas em diversas condições, tais como hemiplegia congênita (redução de FA, aumento de MD, correlacionados aos déficits sensório-motores);⁽²⁴⁵⁾ síndrome de Tourette (redução de FA);⁽¹⁰¹⁾ neuropatia sensorial (redução de FA, correlacionado negativamente com a escala de gravidade da ataxia),⁽²⁴⁶⁾ entre outras.^(247–252)

Alterações nas métricas de DTI na radiação talâmica posterior também foram observadas em crianças e em adultos diagnosticados com transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (ADHD) no decorrer da infância – FA reduzido;⁽²⁴⁸⁾ AD aumentado em pacientes pediátricos com maiores transtornos de atenção⁽²⁵³⁾ e FA reduzido em adultos.⁽²⁵⁴⁾ Já foram descritas frequências maiores de sintomas de ADHD (27,6%) e de transtorno obsessivo-compulsivo (7,6%) em 105 portadores de SPI idiopática que em controles.⁽²⁵⁵⁾ Além disso, Chaddock-Heyman et al. verificaram correlação entre valores de DTI na radiação talâmica posterior e o desempenho em testes cognitivos, como em tarefas de controle inibitório em crianças (correlação positiva com FA e negativa com MD e RD).⁽²⁵⁶⁾

5.1.2 Coroa radiada posterior: relevância funcional e envolvimento na síndrome das pernas inquietas e em outras condições

Também pela primeira vez, a análise TBSS mostrou diminuição estatisticamente significativa de AD em pequeno *cluster* adjacente à coroa radiada posterior esquerda em indivíduos com SPI mais graves, em comparação com controles.

A coroa radiada consiste em mistura de tratos associativos e de projeção e sua parte posterior é conhecida por incluir vias descendentes, como o TCE.^(257–259)

Porém, fibras talamocorticais provenientes de núcleos somatossensoriais também são parte importante de sua composição,⁽²²¹⁾ reforçando que alterações nestas vias talamocorticais possam estar associadas aos sintomas sensório-motores subjacentes à síndrome.

A diminuição de AD na coroa radiada posterior esquerda em indivíduos com a forma grave de SPI foi correlacionada negativamente com a IRLSS,

sugerindo que o dano axonal nessa região contribui para a gravidade dos sintomas. Entretanto, o fato de não termos encontrado nenhum envolvimento da coroa radiada posterior na forma leve da SPI indica que a redução de AD possa ser consequência do progresso da doença.

Demais alterações de métricas de DTI já foram também descritas para a coroa radiada posterior nas seguintes condições: neuralgia idiopática do trigêmeo (redução de FA e aumentos de MD e RD);⁽²⁵⁹⁾ neuropatia sensorial (redução de FA na cora radiada posterior direita);⁽²⁴⁶⁾ transtorno de déficit de atenção (aumenta de RD e de AD);⁽²⁵³⁾ transtorno obsessivo-compulsivo (aumento de MD bilateralmente e de RD restrito ao lado direito),⁽²⁶⁰⁾ entre outras.^(261–263)

Recentemente, um estudo verificou que a integridade microestrutural da substância branca da coroa radiada posterior pode estar associada ao desempenho em testes de sustentação da atenção, acompanhados de aumento de FA ao longo do desenvolvimento.⁽²⁶⁴⁾

5.2 Análise por regiões de interesse

Relatamos em indivíduos com a forma mais grave de SPI aumento de RD nos pedúnculos cerebelares superiores, em comparação aos controles. Rizzo et al. também reportaram aumento de RD na substância branca cerebelar (próxima ao núcleo denteado direito) obtido por VBM (SPM8), porém tal resultado não sobreviveu à correção para múltiplas comparações, em contraste com nossos resultados.⁽⁴⁶⁾ Estas inconsistências podem, possivelmente, serem atribuídas à nossa maior amostra (38 *versus* 20 pacientes de SPI nas formas moderada a grave), maior SNR (3.0 T *versus* 1.5 T) e maior acurácia na estimativa do tensor de difusão (32 *versus* 6 direções de gradientes). Além disso, VBM é suscetível a problemas de registro inter-sujeitos.⁽³⁴⁾

Interessante notar que o aumento do RD encontrado no pedúnculo cerebelar superior em portadores de SPI permaneceu estatisticamente significativo após correções para comparações múltiplas de acordo com a análise ROI, mas não com a análise TBSS. Isso pode ser parcialmente explicado pelo fato de que o TBSS aplica correção mais conservadora para o erro do Tipo I, devido ao seu maior número de comparações entre múltiplos *voxels*. Apesar de não ter alcançado significância estatística ($p=0,06$ corrigida para comparações múltiplas), a redução de FA verificada

via TBSS na região delimitada como coroa radiada posterior corrobora a hipótese de anomalias em microestruturas axonais nesta área.

Em suma, as análises baseadas em TBSS e em ROI, juntas, fornecem informações complementares sobre a estrutura da substância branca.

5.2.1 Cerebelo: relevância funcional e envolvimento na SPI e em outras condições

O cerebelo desempenha papel importante na integração de entradas sensoriais multimodais.^(265,266)

Mais especificamente, o pedúnculo cerebelar superior contém majoritariamente fibras eferentes, originadas nos núcleos cerebelares (em especial, do núcleo denteado) e no trato aferente espinocerebelar anterior. Esta região também possui projeções para os neurônios do núcleo rubro, para as camadas profundas do colículo superior (onde decussa) e segue contralateralmente pelo tálamo (núcleo ventral lateral) e, então, para os córtices motor primário e pré-motor.⁽²⁶⁷⁾

A técnica de DTI permite identificar com facilidade a decussação do pedúnculo cerebelar superior: no mapa de FA codificado por cores, essa estrutura é representada por ponto vermelho no mesencéfalo ventral (convencionalmente, vermelha denota fibras orientadas transversalmente). Um pequeno grupo de fibras também se projeta para os núcleos reticulares e vestibulares do tronco encefálico.⁽²⁶⁸⁾

Considerando que o cerebelo exerce um efeito facilitatório na excitabilidade do córtex motor primário,⁽²⁶⁹⁾ a conectividade interrompida entre o cerebelo e essas áreas poderia contribuir potencialmente para os sintomas da SPI. Curiosamente, foram encontradas altas taxas de SPI em indivíduos com malformação de Arnold-Chiari tipo 1 das tonsilas cerebelares,⁽²⁷⁰⁾ bem como em ataxias cerebelares.^(271–273)

Um estudo anterior descreveu redução do volume de substância cinzenta no cerebelo de indivíduos com SPI de sintomas moderados a graves (com VBM).⁽¹⁶⁹⁾ No entanto, dados publicados de nosso grupo de pesquisa,⁽¹⁰³⁾ cuja amostra é majoritariamente composta pelos mesmos participantes do presente trabalho, mostraram que a espessura cortical cerebelar não foi significativamente diferente entre portadores de SPI e controles. Portanto, é possível que alterações funcionais no

cerebelo possam estar relacionadas ao aumento de RD. Essa hipótese é corroborada pela presença de ativação cerebelar bilateral, verificada por fMRI, relatada em portadores de SPI com sintomas moderados a grave escaneados durante sensação de desconforto da perna.^(17,114) Além disso, foi descrita, também, forte correlação negativa entre os níveis de GABA no cerebelo e a gravidade da SPI.⁽²⁷⁴⁾

Embora vários aspectos do processamento perceptual e sensorial tenham sido relacionados à atividade cerebelar, nas duas últimas décadas estudos têm reconhecido e avançado na compreensão de sua atuação na integração de diferentes modalidades sensoriais.^(265,266)

A integração multissensorial ocorre cedo na ontogênese e é crítica em vários domínios perceptuais, cognitivos e sociais. Em experimento elegante e bem controlado, Ronconi et al. relataram caso raro de completa agenesia cerebelar sem quaisquer outras malformações cerebrais associadas.⁽²⁷⁵⁾ Este paciente também não possuía nenhum trato cerebelar, conforme avaliado por tractografia. Os autores verificaram, por meio da medida dos tempos de reação após a apresentação separada e combinada de estímulos visuais, auditivos e audiovisuais, claro comprometimento de integração multissensorial.⁽²⁷⁵⁾ Em um estudo de fMRI, a ativação cerebelar também foi verificada durante a aplicação de estímulos dolorosos nas mãos de indivíduos saudáveis.⁽²⁷⁶⁾

5.3 Análise por trato de interesse (tractografia)

Pela primeira vez a tractografia foi utilizada como técnica para estudo da substância branca em SPI. Não foram encontradas diferenças significativas na análise de tractografia entre controles e sujeitos portadores de SPI ou entre subgrupos. Apesar de termos procurado seguir as melhores práticas para controle de qualidade e processamento de DTI,^(35,43,199,217,277) o número de direções de gradiente adquiridas,⁽²⁸⁾ devido a restrições técnicas, pode ter sido insuficiente para detectar alterações sutis nos tratos-de-interesse, as quais talvez possam ser reveladas em futuros estudos por meio de aquisições mais sofisticadas a diminuição das incertezas em sua reconstrução com aquisições mais sofisticadas.

5.4 Limitações

Nosso desenho transversal não permite inferências sobre as relações causais entre os resultados da análise de DTI e SPI. Estudos longitudinais são recomendados para esclarecer esta questão intrigante. Finalmente, embora o tamanho da nossa amostra para SPI seja um dos maiores da literatura, pode ter sido insuficiente para detectar mudanças mais sutis ou localizadas. Além disso, a polissonografia de noite inteira não foi realizada sistematicamente. Entretanto, o critério diagnóstico⁽⁵⁹⁾ para SPI não requer a sua realização, exceto na suspeita de causas secundárias ou comorbidades do sono, que foram critérios de exclusão neste trabalho.

6 CONCLUSÕES

1. Na análise exploratória, encontramos diminuição de difusividade axial na radiação talâmica posterior esquerda no grupo de portadores de síndrome das pernas inquietas, em comparação com controles. Nos portadores das formas grave a muito grave de síndrome das pernas inquietas, a difusividade axial estava reduzida na coroa radiada posterior esquerda. Houve correlação significativa, inversa, entre a difusividade axial e a gravidade dos sintomas da Síndrome das pernas inquietas. Não verificamos qualquer diferença significativa na análise global da substância branca;

2. Na análise por região-de-interesse, encontramos aumento de difusividade radial nos pedúnculos cerebelares superiores no subgrupo composto por portadores de síndrome das pernas inquietas nas formas grave a muito grave. Não houve diferença significativa nas comparações entre controles e grupo de portadores de Síndrome das pernas inquietas (independentemente da gravidade) ou entre controles e portadores de síndrome das pernas inquietas nas formas leve a muito leve;

3. Na análise por tractografia, não encontramos quaisquer diferenças significativas nos tratos de interesse (trato corticoespinhal e radiação talâmica posterior), tanto na comparação entre controles e portadores de síndrome das pernas inquietas (independentemente da gravidade), como na comparação entre controles e portadores de síndrome das pernas inquietas leve-a-moderado e grave-a-muito-grave.

7 ANEXOS

Anexo 1. Critérios atualizados de diagnóstico para a síndrome das pernas inquietas/doença de Willis-Ekbom (SPI), publicados em 2014 pelo Grupo Internacional de Estudos de SPI

Critérios essenciais de diagnóstica da SPI

1. Um desejo de mover as pernas geralmente acompanhada ou sentida como causada por sensações desconfortáveis e desagradáveis nas pernas.

2. O desejo de mover as pernas e as sensações desagradáveis que a acompanham começam ou pioram durante os períodos de descanso ou inatividade, como ao deitar-se ou sentar-se.

3. O desejo de mover as pernas e quaisquer sensações desagradáveis acompanhantes são parcial ou totalmente aliviados pelo movimento, como caminhada ou alongamento, pelo menos enquanto a atividade continuar.

4. O desejo de mover as pernas e quaisquer sensações desagradáveis que durante o descanso ou a inatividade só ocorrem ou são piores ao anoitecer ou à noite.

A ocorrência das características acima não pode ser considerada apenas como sintomas primários para outra condição médica ou comportamental (Ex. mialgia, estase venosa, edema da perna, artrite, câibras nas pernas ou desconforto posicional).

Critérios de curso clínico

A. SPI crônica-persistente: os sintomas quando não tratados ocorrerão em média pelo menos duas vezes por semana no último ano.

B. SPI intermitente: os sintomas quando não tratados ocorrerão em média <2 / semana no último ano, com pelo menos cinco eventos ao longo da vida.

Obs.: Os critérios de curso clínico não se aplicam para casos pediátricos, nem para alguns casos especiais de SPI secundárias, como em caso de gravidez ou SPI induzida por drogas, em que a frequência dos sintomas pode ser alta, mas limitada à duração da condição provocativa.

Critérios para significância clínica

Os sintomas causam sofrimento significativo ou prejuízo nas áreas sociais, ocupacionais, educacionais ou outras áreas importantes pelo seu impacto no sono.

Fonte: Traduzido e adaptado de Allen RP, Picchietti DL, Garcia-Borreguero D, Ondo WG, Walters AS, Winkelman JW, et al.; International Restless Legs Syndrome Study Group. Restless legs syndrome/Willis-Ekbom disease diagnostic criteria: updated International Restless Legs Syndrome Study Group (IRLSSG) consensus criteria—history, rationale, description, and significance. Sleep Med. 2014;15(8):860–73.⁽⁵⁹⁾

Anexo 2. Questionário de avaliação – TMS/MRI

Nome: _____

Idade: _____

Alguma vez, você:

1) Teve alguma reação adversa à estimulação magnética transcraniana?

☐ Sim ☐ Não

2) Teve uma crise epiléptica?

☐ Sim ☐ Não

3) Teve traumatismo craniano?

☐ Sim ☐ Não

4) Foi submetido a neurocirurgia?

☐ Sim ☐ Não

5) Tem algum material metálico em sua cabeça (fora da boca) como "clipes" cirúrgicos, fragmento de projétil, soldagem ou metal?

☐ Sim ☐ Não

6) Tem algum equipamento implantado como marcapasso cardíaco, bomba de infusão, ou cateter intracardíaco?

☐ Sim ☐ Não

7) Está tomando alguma medicação?

☐ Sim ☐ Não

8) Tem dores de cabeça fortes ou frequentes?

☐ Sim ☐ Não

9) Já teve algum problema no cérebro?

☐ Sim ☐ Não

10) Já teve alguma doença que causou lesão cerebral?

☐ Sim ☐ Não

11) Se você é uma mulher em idade fértil e sexualmente ativa, você não está usando um método anticoncepcional confiável?

☐ Sim ☐ Não

12) Alguém na sua família tem história de epilepsia?

☐ Sim ☐ Não

13) Realizou um eletroencefalograma?

☐ Sim ☐ Não

14) Teve um acidente vascular cerebral?

☐ Sim ☐ Não

Data: _____

Anexo 3. Questionário de Preferência Manual (Inventário de Edinburgh)

Indique a preferência do uso das mãos nas seguintes atividades, colocando + na coluna apropriada. Quando a preferência for importante a ponto de você utilizar a **outra mão se somente for forçado, assinale ++**. Se não houver preferência por qualquer uma das mãos, assinale + nas duas colunas.

Algumas atividades requerem as duas mãos, neste caso, a questão é em relação à parte da atividade explicitada entre parênteses.

Tente responder todas as questões e somente deixe em branco caso você não tenha absolutamente nenhuma experiência com o objeto da tarefa descrita.

		Direita	Esquerda
1	Escrever		
2	Desenhar		
3	Arremessar		
4	Tesoura		
5	Escova de dente		
6	Faca (sem garfo)		
7	Colher/garfo		
8	Vassoura		
9	Acender um fósforo		
10	Abrir uma caixa (tampa)		
11	Qual o pé você usa para chutar?		
12	Qual o olho você usa, se forçado a usar somente um?		

I.L.	
------	--

Anexo 4. Escala Internacional de Graduação da Síndrome das Pernas Inquietas

Nome: _____

_____ Idade: _____

Data: ____/____/____

Médico: _____

Instruções

Responder às 10 questões que se seguem, escolhendo apenas uma das 5 alternativas após cada pergunta. A não ser que você receba outra orientação, ao responder cada questão, leve em consideração os seus sintomas da Síndrome das Pernas Inquietas que você apresentou principalmente na última semana.

1. Em geral, como você considera o desconforto da Síndrome das Pernas Inquietas nas suas pernas ou braços?

- (4) Muito intenso
- (3) Intenso
- (2) Moderada
- (1) Leve
- (0) Nenhum

2. Em geral, como você considera a necessidade de se mexer ou andar por causados seus sintomas da Síndrome das Pernas Inquietas?

- (4) Muito grande
- (3) Grande
- (2) Moderada
- (1) Pequena
- (0) Nenhuma

3. Em geral, quanto de alívio no desconforto das pernas ou braços você consegue ao andar?

- (4) Nenhum alívio
- (3) Pouco alívio
- (2) Alívio moderado
- (1) Alívio total ou quase total
- (0) Sem sintomas de síndrome das pernas inquietas, portanto a questão não se aplica

4. Em geral, qual a intensidade do seu distúrbio de sono por causa dos sintomas da Síndrome das Pernas Inquietas?

- (4) Muito intenso

- (3) Intenso
- (2) Moderado
- (1) Leve
- (0) Nenhum

5.Qual a intensidade do seu cansaço ou sonolência por causa dos sintomas da Síndrome das Pernas Inquietas?

- (4) Muito intenso(a)
- (3) Intenso(a)
- (2) Moderado(a)
- (1) Leve
- (0) Nenhum(a)

6.Em geral, qual a gravidade da sua Síndrome das Pernas Inquietas como um todo?

- (4) Muito grave
- (3) Grave
- (2) Moderada
- (1) Leve
- (0) Nenhuma

7.Com que frequência você tem sintomas da Síndrome das Pernas Inquietas?

- (4) De 6 a 7 dias por semana
- (3) De 4 a 5 dias por semana
- (2) De 2 a 3 dias por semana
- (1) 1 dia ou menos por semana
- (0) Nunca

8.Quando você tem sintomas da Síndrome das Pernas Inquietas, qual a duração dos sintomas num dia corriqueiro?

- (4) Dura 8hs ou mais nas 24hs do dia
- (3) Dura 3 a 8hs nas 24hs do dia
- (2) Dura 1 a 3hs nas 24hs do dia
- (1) Dura 1 hora ou menos nas 24hs do dia
- (0) Nenhuma duração

9.No geral, qual a intensidade do impacto dos seus sintomas da Síndrome das Pernas Inquietas na sua capacidade de realizar suas atividades diárias, como, por exemplo, atividades familiares, no seu lar, na sociedade, na escola ou na vida profissional?

- (4) Muito grande
- (3) Grande
- (2) Moderada

- (1) Pequena
- (0) Nenhuma

10. Qual a intensidade do seu distúrbio de humor por causa dos sintomas da Síndrome das Pernas Inquietas, por exemplo, raiva, depressão, tristeza, ansiedade, irritação?

- (4) Muito grande
- (3) Grande
- (2) Moderada
- (1) Pequena
- (0) Nenhuma

Pontuação Gravidade

00 a 10 Leve

11 a 20 Moderada

21 a 30 Grave

31 a 40 Muito Grave

Total: _____

Classificação:

Leve ☐ Moderada ☐ Grave ☐ Muito Grave ☐

*Translation and validation into the Brazilian Portuguese of the Restless Legs Syndrome Rating Scale of the International Restless Legs Syndrome Study Group. Tradução e validação para a língua portuguesa da escala internacional de graduação da síndrome das pernas inquietas do Grupo de Estudo Internacional da Síndrome das Pernas Inquietas.

Fonte: Traduzido e adaptado de Masuko AH; Carvalho LB; Machado MA; Moraes JF; Prado LB; Prado GF. Translation and validation into the Brazilian Portuguese of the restless legs syndrome rating scale of the International Restless Legs Syndrome Study Group. Arq Neuropsiquiatr. 2008;66(4):832-6.⁽²¹¹⁾

Anexo 5. Escala de Sonolência de Epworth

Qual possibilidade de você cochilar ou adormecer nas seguintes situações?

- 0 - nenhuma chance de cochilar
- 1 - pequena chance de cochilar
- 2 - moderada chance de cochilar
- 3 - alta chance de cochilar

Situações	Chance de cochilar (0 a 3)
1. Sentado e lendo	
2. Vendo televisão	
3. Sentado em lugar público sem atividades como sala de espera, cinema, teatro	
4. Como passageiro de carro, trem ou metrô andando por 1 hora sem parar	
5. Deitado para descansar a tarde	
6. Sentado e conversando com alguém	
7. Sentado após uma refeição sem álcool	
8. No carro parado por alguns minutos durante trânsito	
TOTAL	

Fonte: Adaptado de Bertolazi AN, Fagundes SC, Hoff LS, Pedro VD, Menna Barreto SS, Johns MW. Portuguese-language version of the Epworth sleepiness scale: validation for use in Brazil. J Bras Pneumol. 2009;35(9):877-83. English, Portuguese.⁽²¹³⁾
 Adaptado de Johns MW. A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale. Sleep. 1991;14(6):540-5.⁽²¹²⁾

Anexo 6. Questionário de Qualidade de Vida para Síndrome das Pernas Inquietas

Instruções: Este questionário nos ajudará a melhor entender o impacto da Síndrome das Pernas Inquietas (SPI) na sua vida no último mês (30 dias). Embora seus sintomas possam variar ao longo do tempo e possam ter piorado antes do tratamento, nós estamos apenas interessados no impacto da SPI na sua vida durante o último mês. Isto é muito importante.

Por favor marque somente uma resposta para cada pergunta.

1- Quão angustiante para você são suas pernas inquietas?

☐ Nada ☐ Bem pouco ☐ Um pouco ☐ Bastante ☐ Muito

2- Com que frequência nas últimas 4 semanas suas pernas inquietas atrapalharam sua rotina de atividades à noite?

☐ Nunca ☐ Poucas vezes ☐ Algumas vezes ☐ Muitas vezes ☐ Todas as vezes

3- Com que frequência nas últimas 4 semanas as pernas inquietas te impediram de comparecer em suas atividades sociais à noite?

☐ Nunca ☐ Poucas vezes ☐ Algumas vezes ☐ Muitas vezes ☐ Todas as vezes

4- Nas últimas 4 semanas quanto de problema você teve para acordar de manhã por causa das pernas inquietas?

☐ Nenhum ☐ Bem pouco ☐ Um pouco ☐ Bastante ☐ Muito

5- Nas últimas 4 semanas, com que frequência você se atrasou para o trabalho ou para seus primeiros compromissos do dia por causa das pernas inquietas?

☐ Nunca ☐ Poucas vezes ☐ Algumas vezes ☐ Muitas vezes ☐ Todas as vezes

6- Quantos dias nas últimas quatro semanas você se atrasou para o trabalho ou para seus primeiros compromissos do dia por causa das pernas inquietas?

Escreva em número de dias: ____

7- Com que frequência nas últimas 4 semanas você teve problemas para se concentrar durante a tarde?

☐ Nunca ☐ Poucas vezes ☐ Algumas vezes ☐ Muitas vezes ☐ Todas as vezes

8- Com que frequência nas últimas 4 semanas você teve problemas para se concentrar durante a noite?

☐ Nunca ☐ Poucas vezes ☐ Algumas vezes ☐ Muitas vezes ☐ Todas as vezes

9- Nas últimas 4 semanas, quanto a sua habilidade de tomar boas decisões foi afetada pelos seus problemas de sono?

☐ Nada ☐ Bem pouco ☐ Um pouco ☐ Bastante ☐ Muito

10- Com que frequência nas últimas 4 semanas você evitou fazer uma viagem que fosse demorar mais que duas horas?

† Nunca † Poucas vezes † Algumas vezes † Muitas vezes † Todas as vezes

11- Nas últimas 4 semanas, quanto interesse você teve em praticar atividade sexual?

† Nada † Bem pouco † Um pouco † Bastante † Muito

12- Quanto que as pernas inquietas atrapalharam ou reduziram suas atividades sexuais?

† Nada † Bem pouco † Um pouco † Bastante † Muito

13- Nas últimas 4 semanas, quanto suas pernas inquietas atrapalharam sua habilidade de realizar suas atividades diárias, por exemplo, atividades em família, em casa, social, escolar ou no trabalho?

† De maneira nenhuma † Bem pouco † Um pouco † Bastante † Muito

14- Você atualmente trabalha em período integral ou meio período (remunerado ou voluntário)?

† Sim – Se sim, por favor responda as perguntas 15 até 18

† Não, por causa de minha SPI – O questionário termina aqui.

† Não, devido a outras razões – O questionário termina aqui.

15- Com que frequência suas pernas inquietas tornaram difícil para você trabalhar um dia inteiro nas últimas 4 semanas?

† Nunca † Poucas vezes † Algumas vezes † Na maioria das vezes † Todas as vezes

16- Quantos dias, nas últimas 4 semanas, você trabalhou menos do que gostaria por causa das pernas inquietas?

Escreva em número de dias: ____

17- Em média, quantas horas você trabalhou nas últimas 4 semanas?

Escreva em número de horas por dia: ____

18- Nos dias em que você trabalhou menos do que gostaria, quantas horas a menos, em média, você trabalhou por causa das suas pernas inquietas?

Escreva em número de horas por dia ____

TOTAL: _____

Fonte: Traduzido e adaptado de Abetz L, Arbuckle R, Allen RP, Mavradi E, Kirsch J. The reliability, validity and responsiveness of the Restless Legs Syndrome Quality of Life questionnaire (RLSQoL) in a trial population. Health Qual Life Outcomes. 2005;3:79.⁽²⁷⁸⁾

Anexo 7. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Versão 4.0 (Data da versão: 18/08/2014)

Estimulação Magnética Transcraniana e Síndrome das pernas inquietas
Indivíduos portadores de Síndrome das pernas inquietas

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa sobre o que ocorre no cérebro de pessoas com síndromes das pernas inquietas. A responsável pela pesquisa é a Dra. Adriana Bastos Conforto. O pesquisador executante é o médico Samir Câmara Magalhães. Sua participação consiste no preenchimento de uma avaliação clínica com o pesquisador quanto a história dos sintomas da Síndrome das Pernas Inquietas. Será solicitado a você o preenchimento de questionários sobre a gravidade dos sintomas da doença, sobre sua preferência manual, sobre sua sonolência diurna e qualidade de vida. O exame de potencial evocado motor por estimulação magnética transcraniana com pulso único e pareado e a ressonância magnética da cabeça também serão realizados. No exame de potencial evocado motor por estimulação magnética transcraniana, um pulso magnético será administrado externamente na sua cabeça e seu cérebro será estimulado, sem que você perceba e sem dor. Quando isso acontecer, você ouvirá um ruído semelhante a um "clique", e vai ter a sensação de um toque rápido no couro cabeludo, onde o aparelho vai estar apoiado. Quando o aparelho for colocado próximo à parte do cérebro responsável pelo controle dos músculos, haverá rápidos movimentos nos seus músculos da mão, ou sensação de movimentos. A resposta nos músculos será registrada com pequenos eletrodos de superfície colocados sobre a pele da mão. Não serão utilizadas agulhas. Uma touca de natação será colocada em sua cabeça. O médico fará marcas nessa touca, para localizar as áreas a serem estimuladas. O exame poderá ser interrompido sempre que você desejar. A estimulação magnética pode causar discreto desconforto no couro cabeludo, onde o aparelho é colocado. A movimentação dos músculos do rosto ou mandíbula, que pode acontecer enquanto o médico está ajustando a melhor posição para estimulação, pode ser desconfortável, mas não dolorosa.

A ressonância magnética da cabeça é realizada para analisar a estrutura do cérebro. Neste exame, você será colocado deitado em um aparelho de forma cilíndrica (tubo) o qual gera um campo magnético, onde ondas de radiofrequência são enviadas aos tecidos no interior do corpo. Os "ecos" retornantes são então transformados em imagens das estruturas internas do corpo através de um computador. Não será utilizado contraste, nem será necessário acesso venoso para o exame. Em geral, o exame dura 30 minutos e você deverá tentar permanecer imóvel o máximo possível.

Apesar das imagens e dos testes destes experimentos não terem a finalidade de fazer diagnóstico, algumas vezes podem mostrar alterações. Caso isto aconteça, você será comunicado e orientado em como prosseguir.

Se você usar marca-passos ou bombas de infusão implantadas, ou placas de metal no crânio, ou objetos metálicos nos olhos ou crânio (por exemplo, após cirurgia no cérebro, ou acidente por arma de fogo), não poderá participar. Crises epiléticas são consideradas contraindicações relativas. Você preencherá um questionário para avaliação destas condições. Avise se você apresentar qualquer dessas contraindicações, pois neste caso o exame não poderá ser feito.

Para mulheres em idade fértil que não estejam fazendo uso de método anticoncepcional de forma regular e confiável, ou aquelas que tenham dúvidas quanto a possibilidade de gestação, será realizado, no dia do exame, a coleta de sangue periférico em uma veia para dosagem de Beta-hCG (teste de gravidez). O resultado será visto no mesmo dia e caso venha positivo, não será possível a participação no estudo.

Será solicitado a você que não faça o uso da medicação para o tratamento dos sintomas de síndrome das pernas inquietas por uma semana, essa medida tem como objetivo reduzir as alterações causadas pelo remédio no cérebro, para que possamos avaliar a doença de forma mais clara. A síndrome das pernas inquietas não tem tratamento que visa a cura. Dispomos apenas de tratamento para os sintomas. A suspensão da medicação pode levar ao aumento dos sintomas, porém estará restrita a uma semana e será supervisionada pelo médico pesquisador e médico executante, que em caso de dúvidas ou dificuldades com o proposto, poderão ser contatados para esclarecimentos e condutas.

Você não deverá ingerir álcool 48 horas antes do exame, pois o álcool altera o funcionamento do cérebro e isso pode interferir no exame.

A estimulação magnética transcraniana vem sendo utilizada desde 1985 nos Estados Unidos e na Europa, sem relatos de problemas sérios. No Brasil há vários estudos já realizados com este método e vem sendo utilizada, com uma técnica de estimulação repetitiva (diferente deste estudo), como tratamento em doenças como depressão e alucinações auditivas, com aprovação do Conselho Federal de Medicina. O equipamento que será utilizado é aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

O exame de estimulação magnética transcraniana pode apresentar alguns efeitos adversos. O efeito colateral mais comum é a ocorrência dor de cabeça leve. Isso se deve a contração repetida dos músculos que ficam abaixo da região da cabeça onde o aparelho toca. Em geral, a dor de cabeça melhora espontaneamente após alguns minutos a horas. Você poderá conversar com o médico que irá fazer seu exame e se estiver com muito incômodo devido à dor de cabeça o exame poderá ser interrompido e uma medicação analgésica pode ser prescrita pelo médico. Durante o exame você escutará o clique do

aparelho funcionando, este pequeno barulho pode incomodá-lo e causar desconforto, porém não há risco de perda de audição do modo que iremos fazer o exame. Serão usados protetores auriculares durante o exame.

O maior receio em relação a este exame é a ocorrência de crises epiléticas (convulsão). Porém, dentre milhares de pacientes que fizeram o exame no mundo inteiro, foram relatados casos de crises epiléticas apenas em pacientes com lesões cerebrais ou usando um tipo de estimulação magnética conhecida como repetitiva de alta frequência, que não será realizado em você. Apenas duas pessoas apresentaram crises de convulsão fazendo exame semelhante ao que será feito em você, ambas tinham problemas que aumentavam a chance de ter crises de convulsão. Em pessoas sem doenças neurológicas ou psiquiátricas, e em pessoas com Síndrome das Pernas Inquietas, nunca foram relatadas crises epiléticas com o tipo de exame ao qual você será submetido. Você será submetido a uma avaliação clínica e neurológica para verificar se não há nenhum problema para realização deste exame. Não há nenhum risco definido em longo prazo para pessoas que fazem o exame de estimulação magnética transcraniana. Não podemos garantir que você nunca venha a ter crises epiléticas (convulsão) na vida, mas a chance de isso ocorrer não depende de você fazer ou não este exame.

Este exame não será usado como um tipo de tratamento, e embora você não tenha benefícios diretos pela realização do exame, os resultados deste estudo serão importantes para elucidar o que ocorre no cérebro nas pessoas com síndrome das pernas inquietas. Esta informação nos ajudará a desenvolver a ciência e a perspectiva de novos mecanismos de tratamento e diagnóstico da síndrome das pernas inquietas.

O exame será sempre feito por um médico neurologista, supervisionado por uma médica neurologista. A qualquer momento desta pesquisa você poderá entrar em contato com os pesquisadores nos números abaixo, para esclarecimentos sobre o curso da pesquisa. A qualquer momento você poderá se recusar a participar ou retirar seu consentimento, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado neste Hospital.

As informações que possam identificá-lo serão retiradas, e codificadas de maneira a assegurar a garantia do sigilo e privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos nesta pesquisa.

Não haverá despesas na sua participação, nem riscos significativos, portanto não estão previstos ressarcimentos nem indenizações.

Em caso de dúvida relacionada a esta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Dr. Samir Câmara Magalhães, tel.(11) 98209-5400, ou Dra. Adriana Conforto, tel. (11) 2151-3727, ou Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein, tel.(11) 2151- 3729, cep@einstein.br.

Eu, _____,
após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar com o pesquisador responsável, para esclarecer todas as minhas dúvidas, acredito estar suficientemente informado, ficando claro para mim que minha participação é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem penalidades. Estou ciente também dos objetivos da pesquisa, dos procedimentos aos quais serei submetido, dos possíveis danos ou riscos deles provenientes e da garantia de confidencialidade e esclarecimentos sempre que desejar. Diante do exposto expresso minha concordância de espontânea vontade em participar deste estudo.

São Paulo, ____ de _____ de 20____.

Nome: _____

Assinatura: _____

Pesquisador: _____

Assinatura: _____

8 REFERÊNCIAS

1. Salas RE, Kwan AB. The real burden of restless legs syndrome: clinical and economic outcomes. *Am J Manag Care*. 2012;18(9 Suppl):S207-12.
2. Connor JR, Patton SM, Oexle K, Allen RP. Iron and restless legs syndrome: treatment, genetics and pathophysiology. *Sleep Med*. 2017;31:61–70.
3. Allen R. Dopamine and iron in the pathophysiology of restless legs syndrome (RLS). *Sleep Med*. 2004;5(4):385–91.
4. Cervenka S, Palhagen SE, Comley RA, Panagiotidis G, Cselenyi Z, Matthews JC, et al. Support for dopaminergic hypoactivity in restless legs syndrome: a PET study on D2-receptor binding. *Brain*. 2006;129(Pt 8):2017-28.
5. Connor JR, Wang XS, Allen RP, Beard JL, Wiesinger JA, Felt BT, et al. Altered dopaminergic profile in the putamen and substantia nigra in restless leg syndrome. *Brain*. 2009;132(Pt 9):2403–12.
6. Earley CJ, Allen RP, Connor JR, Ferrucci L, Troncoso J. The dopaminergic neurons of the A11 system in RLS autopsy brains appear normal. *Sleep Med*. 2009;10(10):1155–7.
7. Earley CJ, Kuwabara H, Wong DF, Gamaldo C, Salas RE, Brasic JR, et al. Increased synaptic dopamine in the putamen in restless legs syndrome. *Sleep (Basel)*. 2013;36(1):51–7.
8. Lanza G, Cantone M, Lanuzza B, Pennisi M, Bella R, Pennisi G, et al. Distinctive patterns of cortical excitability to transcranial magnetic stimulation in obstructive sleep apnea syndrome, restless legs syndrome, insomnia, and sleep deprivation. *Sleep Med Rev*. 2015;19:39-50.
9. Lanza G, Lanuzza B, Aricò D, Cantone M, Cosentino FI, Pennisi M, et al. Direct comparison of cortical excitability to transcranial magnetic stimulation in obstructive sleep apnea syndrome and restless legs syndrome. *Sleep Med*. 2015;16(1):138–42.
10. Magalhaes SC, Kaelin-Lang A, Sterr A, do Prado GF, Eckeli AL, Conforto AB. Transcranial magnetic stimulation for evaluation of motor cortical excitability in restless legs syndrome/Willis-Ekbom disease. *Sleep Med*. 2015;16(10):1265–73.
11. Unrath A, Juengling FD, Schork M, Kassubek J. Cortical grey matter alterations in idiopathic restless legs syndrome: an optimized voxel-based morphometry study. *Mov Disord*. 2007;22(12):1751–6.
12. Lee BY, Kim J, Connor JR, Podskalny GD, Ryu Y, Yang QX. Involvement of the central somatosensory system in restless legs syndrome: a neuroimaging study. *Neurology*. 2018;90(21):e1834–41.
13. Etgen T, Draganski B, Ilg C, Schroder M, Geisler P, Hajak G, et al. Bilateral thalamic gray matter changes in patients with restless legs syndrome. *Neuroimage*. 2005;24(4):1242–7.
14. Allen RP, Barker PB, Horská A, Earley CJ, Horska A. Thalamic glutamate/glutamine in restless legs syndrome: increased and related to disturbed sleep. *Neurology*. 2013;80(22):2028–34.
15. Coge J, Ribeiro E, de La Sayette V, Viader F. Complete recovery of restless legs syndrome after unilateral thalamic and tegmental infarction: a case report. *J Clin Neurosci*. 2017;44:229-30.

16. Ku J, Cho YW, Lee YS, Moon HJ, Chang H, Earley CJ, et al. Functional connectivity alternation of the thalamus in restless legs syndrome patients during the asymptomatic period: a resting-state connectivity study using functional magnetic resonance imaging. *Sleep Med.* 2014;15(3):289–94.
17. Bucher SF, Seelos KC, Oertel WH, Reiser M, Trenkwalder C. Cerebral generators involved in the pathogenesis of the restless legs syndrome. *Ann Neurol.* 1997;41(5):639–45.
18. Liu C, Wang J, Hou Y, Qi Z, Wang L, Zhan S, et al. Mapping the changed hubs and corresponding functional connectivity in idiopathic restless legs syndrome. *Sleep Med.* 2018;45:132–9.
19. Liu C, Dai Z, Zhang R, Zhang M, Hou Y, Qi Z, et al. Mapping intrinsic functional brain changes and repetitive transcranial magnetic stimulation neuromodulation in idiopathic restless legs syndrome: a resting-state functional magnetic resonance imaging study. *Sleep Med.* 2015;16(6):785–91.
20. Cho YW, Kang MS, Kim KT, Do SY, Lim JG, Lee SY, et al. Quantitative sensory test for primary restless legs syndrome/Willis-Ekbom disease using the current perception threshold test. *Sleep Med.* 2017;30:19–23.
21. Schattschneider J, Bode A, Wasner G, Binder A, Deuschl G, Baron R. Idiopathic restless legs syndrome: abnormalities in central somatosensory processing. *J Neurol.* 2004;251(8):977–82.
22. Bocquillon P, Charley-Monaca C, Houdayer E, Marques A, Kwiatkowski A, Derambure P, et al. Reduced afferent-induced facilitation of primary motor cortex excitability in restless legs syndrome. *Sleep Med.* 2017;30:31–5.
23. Lin Y, Wang Y, Zhan S, Ding Y, Hou Y, Wang L, et al. Impaired sensorimotor integration in restless legs syndrome. *Front Neurol.* 2018;9:568.
24. Rizzo V, Arico I, Liotta G, Ricciardi L, Mastroeni C, Morgante F, et al. Impairment of sensory-motor integration in patients affected by RLS. *J Neurol.* 2010;257(12):1979–85.
25. Rocco-Donovan M, Ramos RL, Giraldo S, Brumberg JC. Characteristics of synaptic connections between rodent primary somatosensory and motor cortices. *Somatosens Mot Res.* 2011;28(3-4):63-72.
26. Lemon RN. Descending pathways in motor control. *Annu Rev Neurosci.* 2008;31:195-218.
27. Johansen-Berg H, Behrens TE. *Diffusion MRI.* 2nd ed. Amsterdam: Elsevier; 2009.
28. Mori S, Zhang J. Principles of diffusion tensor imaging and its applications to basic neuroscience research. *Neuron.* 2006;51(5):527–39.
29. Song SK, Sun SW, Ramsbottom MJ, Chang C, Russell J, Cross AH. Dysmyelination revealed through MRI as increased radial (but unchanged axial) diffusion of water. *Neuroimage.* 2002;17(3):1429–36.
30. Van Hecke W, Emsell L, Sunaert S. *Diffusion tensor imaging: a practical handbook.* New York: Springer; 2015.
31. Engelhardt E, Moreira D, Alves G. A substância branca cerebral: dissecação virtual dos principais feixes: tratografia. *Rev Bras Neurol.* 2008;44(2):19–34.

32. Unrath A, Müller HP, Ludolph AC, Riecker A, Kassubek J. Cerebral white matter alterations in idiopathic restless legs syndrome, as measured by diffusion tensor imaging. *Mov Disord*. 2008;23(9):1250–5.
33. Belke M, Heverhagen JT, Keil B, Rosenow F, Oertel WH, Stiasny-Kolster K, et al. DTI and VBM reveal white matter changes without associated gray matter changes in patients with idiopathic restless legs syndrome. *Brain Behav*. 2015;5(9):e00327.
34. Bookstein FL. “Voxel-based morphometry” should not be used with imperfectly registered images. *Neuroimage*. 2001;14(6):1454–62.
35. 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.
36. Polders DL, Leemans A, Hendrikse J, Donahue MJ, Luijten PR, Hoogduin JM. Signal to noise ratio and uncertainty in diffusion tensor imaging at 1.5, 3.0, and 7.0 Tesla. *J Magn Reson Imaging*. 2011;33(6):1456–63.
37. 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.
38. Ashburner J, Friston KJ. Voxel-based morphometry—the methods. *Neuroimage*. 2000;11(6 Pt 1):805–21.
39. Davatzikos C. Why voxel-based morphometric analysis should be used with great caution when characterizing group differences. *Neuroimage*. 2004;23(1):17–20.
40. Jones DK, Symms MR, Cercignani M, Howard RJ. The effect of filter size on VBM analyses of DT-MRI data. *Neuroimage*. 2005;26(2):546–54.
41. Thacker NA. Tutorial : a critical analysis of voxel based morphometry (VBM) [Internet]. Manchester: Tina; 2003 [updated 2008 May 5; cited 2018 Apr 21]. Available from: <http://www.tina-vision.net/docs/memos/2003-011.pdf>
42. 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.
43. Cercignani M. Strategies for patient-control comparison of diffusion MR data. In: Jones DK. *Diffusion MRI: theory, methods and applications*. New York: Oxford University Press; 2011. p. 485–99.
44. Berman JI, Mukherjee P, Partridge SC, Miller SP, Ferriero DM, Barkovich AJ, et al. Quantitative diffusion tensor MRI fiber tractography of sensorimotor white matter development in premature infants. *Neuroimage*. 2005;27(4):862–71.
45. Jeurissen B, Descoteaux M, Mori S, Leemans A. Diffusion MRI fiber tractography of the brain. *NMR Biomed*. 2019;32(4):e3785.
46. Rizzo G, Manners D, Vetrugno R, Tonon C, Malucelli E, Plazzi G, et al. Combined brain voxel-based morphometry and diffusion tensor imaging study in idiopathic restless legs syndrome patients. *Eur J Neurol*. 2012;19(7):1045–9.
47. Chang Y, Paik JS, Lee HJ, Chang HW, Moon HJ, Allen RP, et al. Altered white matter integrity in primary restless legs syndrome patients: diffusion tensor imaging study. *Neurol Res*. 2014;36(8):769–74.

48. Lindemann K, Muller HP, Ludolph AC, Hornyak M, Kassubek J. Microstructure of the midbrain and cervical spinal cord in idiopathic restless legs syndrome: a diffusion tensor imaging study. *Sleep*. 2016;39(2):423–8.
49. Zhuo Y, Wu Y, Xu Y, Lu L, Li T, Wang X, et al. Combined resting state functional magnetic resonance imaging and diffusion tensor imaging study in patients with idiopathic restless legs syndrome. *Sleep Med*. 2017;38:96–103.
50. de Paiva JP, Magalhães SC, Moura LM, Sato JR, Amaro E Jr, Sterr A, et al. Sensorimotor white matter projections and disease severity in primary Restless Legs Syndrome/Willis-Ekbom disease: a multimodal DTI analysis. *Sleep Med*. 2020;73:106–16.
51. Ekbom KA. Restless legs syndrome. *Neurology*. 1960;10(9):868–73.
52. Allen RP, Picchietti D, Hening WA, Trenkwalder C, Walters AS, Montplaisi J; Restless Legs Syndrome Diagnosis and Epidemiology workshop at the National Institutes of Health; International Restless Legs Syndrome Study Group. Restless legs syndrome: diagnostic criteria, special considerations, and epidemiology. A report from the restless legs syndrome diagnosis and epidemiology workshop at the National Institutes of Health. *Sleep Med*. 2003;4(2):101–19.
53. Allen RP, Walters AS, Montplaisir J, Hening W, Myers A, Bell TJ, et al. Restless legs syndrome prevalence and impact: REST general population study. *Arch Intern Med*. 2005;165(11):1286–92.
54. Ohayon MM, O'Hara R, Vitiello MV. Epidemiology of restless legs syndrome: a synthesis of the literature. *Sleep Med Rev*. 2012;16(4):283–95.
55. Rothdach AJ, Trenkwalder C, Haberstock J, Keil U, Berger K. Prevalence and risk factors of RLS in an elderly population: the MEMO study. Memory and Morbidity in Augsburg Elderly. *Neurology*. 2000;54(5):1064–8.
56. Walters AS, LeBrocq C, Dhar A, Hening W, Rosen R, Allen RP, et al.; International Restless Legs Syndrome Study Group. Validation of the International Restless Legs Syndrome Study Group rating scale for restless legs syndrome. *Sleep Med*. 2003;4(2):121–32.
57. Eckeli AL, Gitai LL, Dach F, Ceretta H, Sander HH, Passos AD, et al. Prevalence of restless legs syndrome in the rural town of Cassia dos Coqueiros in Brazil. *Sleep Med*. 2011;12(8):762–7.
58. Koo YS, Kim SM, Lee C, Lee BU, Moon YJ, Cho YW, et al. Transcranial direct current stimulation on primary sensorimotor area has no effect in patients with drug-naïve restless legs syndrome: a proof-of-concept clinical trial. *Sleep Med*. 2015;16(2):280–7.
59. Allen RP, Picchietti DL, Garcia-Borreguero D, Ondo WG, Walters AS, Winkelmann JW, et al.; International Restless Legs Syndrome Study Group. Restless legs syndrome/Willis-Ekbom disease diagnostic criteria: updated International Restless Legs Syndrome Study Group (IRLSSG) consensus criteria—history, rationale, description, and significance. *Sleep Med*. 2014;15(8):860–73.
60. Hanson M, Honour M, Singleton A, Crawley A, Singleton A, Hardy J, et al. Analysis of familial and sporadic restless legs syndrome in age of onset, gender, and severity features. *J Neurol*. 2004;251(11):1398–401.
61. Abetz L, Allen R, Follet A, Washburn T, Earley C, Kirsch J, et al. Evaluating the quality of life of patients with restless legs syndrome. *Clin Ther*. 2004;26(6):925–35.

62. Happe S, Reese JP, Stiasny-Kolster K, Peglau I, Mayer G, Klotsche J, et al. Assessing health-related quality of life in patients with restless legs syndrome. *Sleep Med.* 2009;10(3):295–305.
63. Masuko A, Prado L, Prado G. Síndrome das pernas inquietas. *Rev Neurocienc.* 2004;12(01):18–20.
64. Szentkiralyi A, Volzke H, Hoffmann W, Trenkwalder C, Berger K. Multimorbidity and the risk of restless legs syndrome in 2 prospective cohort studies. *Neurology.* 2014;82(22):2026–33.
65. Bakshi R. Fluoxetine and restless legs syndrome. *J Neurol Sci.* 1996;142(1-2):151–2.
66. Garvey MJ, Tollefson GD. Occurrence of myoclonus in patients treated with cyclic antidepressants. *Arch Gen Psychiatry.* 1987;44(3):269–72.
67. Ward NG. Akathisia associated with droperidol during epidural anesthesia. *Anesthesiology.* 1989;71(5):786–7.
68. Terao T, Terao M, Yoshimura R, Abe K. Restless legs syndrome induced by lithium. *Biol Psychiatry.* 1991;30(11):1167–70.
69. Lutz EG. Restless legs, anxiety and caffeinism. *J Clin Psychiatry.* 1978;39(9):693–8.
70. Hening WA, Allen RP, Washburn M, Lesage SR, Earley CJ. The four diagnostic criteria for Restless Legs Syndrome are unable to exclude confounding conditions (“mimics”). *Sleep Med.* 2009;10(9):976–81.
71. Montplaisir J, Boucher S, Nicolas A, Lesperance P, Gosselin A, Rompre P, et al. Immobilization tests and periodic leg movements in sleep for the diagnosis of restless leg syndrome. *Mov Disord.* 1998;13(2):324–9.
72. Holzknecht E, Hochleitner M, Wenning GK, Högl B, Stefani A. Gender differences in clinical, laboratory and polysomnographic features of restless legs syndrome. *J Sleep Res.* 2019;e12875.
73. Kendzerska T, Kamra M, Murray BJ, Boulos MI. Incident cardiovascular events and death in individuals with restless legs syndrome or periodic limb movements in sleep: a systematic review. *Sleep.* 2017;40(3): pii: zsx013.
74. Ferri R, Rundo F, Silvani A, Zucconi M, Arico D, Bruni O, et al. Short-interval leg movements during sleep entail greater cardiac activation than periodic leg movements during sleep in restless legs syndrome patients. *J Sleep Res.* 2017;26(5):602–5.
75. Walters AS, Ba DM, Bagai K, Liu G, Ma C, Gao X. Treatment of restless legs syndrome lowers increased RLS - related cardiovascular risk [abstract]. *Sleep.* 2019;42(Suppl 1):A268.
76. Phillips B, Hening W, Britz P, Mannino D. Prevalence and correlates of restless legs syndrome: results from the 2005 National Sleep Foundation Poll. *Chest.* 2006;129(1):76–80.
77. Winkelman JW, Redline S, Baldwin CM, Resnick HE, Newman AB, Gottlieb DJ. Polysomnographic and health-related quality of life correlates of restless legs syndrome in the Sleep Heart Health Study. *Sleep.* 2009;32(6):772–8.
78. Cha K, Park J, Koo S, Kim T, Jun J, Byun J, et al. Thalamocortical dysfunction in patients with idiopathic restless legs syndrome (RLS) suggested by reduced sleep spindle activity. *Sleep.* 2018;41(Suppl 1):A248.

79. Kushida C, Martin M, Nikam P, Blaisdell B, Wallenstein G, Ferini-Strambi L, et al. Burden of restless legs syndrome on health-related quality of life. *Qual Life Res.* 2007;16(4):617–24.
80. Winkelman JW, Gagnon A, Clair AG. Sensory symptoms in restless legs syndrome: the enigma of pain. *Sleep Med.* 2013;14(10):934–42.
81. Fuh JL, Chung MY, Yao SC, Chen PK, Liao YC, Hsu CL, et al. Susceptible genes of restless legs syndrome in migraine. *Cephalalgia.* 2016;36(11):1028–37.
82. Yang FC, Lin TY, Chen HJ, Lee JT, Lin CC, Huang WY, et al. Increased risk of restless legs syndrome in patients with migraine: a nationwide population-based cohort study. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(5):e2646.
83. Sevindik MS, Demirci S, Goksan B, Ozge A, Savrun FK, Onur H, et al. Accompanying migrainous features in pediatric migraine patients with restless legs syndrome. *Neurol Sci.* 2017;38(9):1677–81.
84. Valente M, Janes F, Russo V, Fontana A, Travanut A, Sommaro M, et al. Prevalence of restless legs syndrome in migraine patients: a case-control study. analysis of risk factors for restless legs syndrome in migraine patients. *Headache.* 2017;57(7):1088–95.
85. Boulos MI, Wan A, Black SE, Lim AS, Swartz RH, Murray BJ. Restless legs syndrome after high risk TIA and minor stroke: association with reduced quality of life. *Sleep Med.* 2017;37:135–40.
86. Ruppert E, Bataillard M, Namer IJ, Tatu L, Hacquard A, Hugueny L, et al. Hyperdopaminergism in lenticulostriate stroke-related restless legs syndrome: an imaging study. *Sleep Med.* 2017;30:136–8.
87. Lee SJ, Kim JS, Song IU, An JY, Kim YI, Lee KS. Poststroke restless legs syndrome and lesion location: anatomical considerations. *Mov Disord.* 2009;24(1):77–84.
88. Unrath A, Kassubek J. Symptomatic restless leg syndrome after lacunar stroke: a lesion study. *Mov Disord.* 2006;21(11):2027–8.
89. Adler CH, Hauser RA, Sethi K, Caviness JN, Marlcor L, Anderson WM, et al. Ropinirole for restless legs syndrome: a placebo-controlled crossover trial. *Neurology.* 2004;62(8):1405–7.
90. Conti CF, de Oliveira MM, Andriolo RB, Saconato H, Atallah AN, Valbuza JS, et al. Levodopa for idiopathic restless legs syndrome: evidence-based review. *Mov Disord.* 2007;22(13):1943–51.
91. Chesson AL Jr, Wise M, Davila D, Johnson S, Littner M, Anderson WM, et al. Practice parameters for the treatment of restless legs syndrome and periodic limb movement disorder. An American Academy of Sleep Medicine report. Standards of Practice Committee of the American Academy of Sleep Medicine. *Sleep.* 1999;22(7):961–8.
92. Paulus W, Trenkwalder C. Less is more: pathophysiology of dopaminergic-therapy-related augmentation in restless legs syndrome. *Lancet Neurol.* 2006;5(10):878–86.
93. Hogl B, Garcia-Borreguero D, Trenkwalder C, Ferini-Strambi L, Hening W, Poewe W, et al. Efficacy and augmentation during 6 months of double-blind pramipexole for restless legs syndrome. *Sleep Med.* 2011;12(4):351–60.
94. Trenkwalder C, Collado Seidel V, Kazenwadel J, Wetter TC, Oertel W, Selzer R, et al. One-year treatment with standard and sustained-release levodopa: appropriate long-term treatment of restless legs syndrome? *Mov Disord.* 2003;18(10):1184–9.

95. Montplaisir J, Lorrain D, Godbout R. Restless legs syndrome and periodic leg movements in sleep: the primary role of dopaminergic mechanism. *Eur Neurol.* 1991;31(1):41–3.
96. Hallett M. Transcranial magnetic stimulation and the human brain. *Nature.* 2000;406(6792):147–50.
97. Tergau F, Wischer S, Paulus W. Motor system excitability in patients with restless legs syndrome. *Neurology.* 1999;52(5):1060–3.
98. Tyvaert L, Houdayer E, Devanne H, Bourriez JL, Derambure P, Monaca C. Cortical involvement in the sensory and motor symptoms of primary restless legs syndrome. *Sleep Med.* 2009;10(10):1090–6.
99. Priori A, Berardelli A, Inghilleri M, Accornero N, Manfredi M. Motor cortical inhibition and the dopaminergic system. Pharmacological changes in the silent period after transcranial brain stimulation in normal subjects, patients with Parkinson's disease and drug-induced parkinsonism. *Brain.* 1994;117(Pt 2):317–23.
100. Ridding MC, Inzelberg R, Rothwell JC. Changes in excitability of motor cortical circuitry in patients with Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 1995;37(2):181–8.
101. Kutukcu Y, Dogruer E, Yetkin S, Ozgen F, Vural O, Aydin H. Evaluation of periodic leg movements and associated transcranial magnetic stimulation parameters in restless legs syndrome. *Muscle Nerve.* 2006;33(1):133–7.
102. Nardone R, Ausserer H, Bratti A, Covi M, Lochner P, Marth R, et al. Cabergoline reverses cortical hyperexcitability in patients with restless legs syndrome. *Acta Neurol Scand.* 2006;114(4):244–9.
103. Magalhaes SC, Queiroz de Paiva JP, Kaelin-Lang A, Sterr A, Eckeli AL, Winkler AM, et al. Short-interval intracortical inhibition is decreased in restless legs syndrome across a range of severity. *Sleep Med.* 2019;62:34–42.
104. Patel N, Jankovic J, Hallett M. Sensory aspects of movement disorders. *Lancet Neurol.* 2014;13(1):100–12.
105. Abbruzzese G, Berardelli A. Sensorimotor integration in movement disorders. *Mov Disord.* 2003;18(3):231–40.
106. Neuner I, Kupriyanova Y, Stocker T, Huang R, Posnansky O, Schneider F, et al. White-matter abnormalities in Tourette syndrome extend beyond motor pathways. *Neuroimage.* 2010;51(3):1184–93.
107. Cortese S, Lecendreux M, Bernardina BD, Mouren MC, Sbarbati A, Konofal E. Attention-deficit/hyperactivity disorder, Tourette's syndrome, and restless legs syndrome: the iron hypothesis. *Med Hypotheses.* 2008;70(6):1128–32.
108. Moreno-Lopez Y, Olivares-Moreno R, Cordero-Erausquin M, Rojas-Piloni G. Sensorimotor integration by corticospinal system. *Front Neuroanat.* 2016;10:24.
109. Oliviero A, León AM, Holler I, Vila JF, Siebner HR, Della Marca G, et al. Reduced sensorimotor inhibition in the ipsilesional motor cortex in a patient with chronic stroke of the paramedian thalamus. *Clin Neurophysiol.* 2005;116(11):2592–8.
110. Nardone R, Bergmann J, Kronbichler M, De Blasi P, Caleri F, Tezzon F, et al. Functional involvement of the cerebral cortex following paramedian bithalamic infarction. *Neurocase.* 2010;16(4):286–92.

111. Lanza G, Lanuzza B, Aricò D, Cantone M, Cosentino FI, Bella R, et al. Impaired short-term plasticity in restless legs syndrome: a pilot rTMS study. *Sleep Med.* 2018;46:1–4.
112. Seo JP, Jang SH. Different characteristics of the corticospinal tract according to the cerebral origin: DTI study. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2013;34(7):1359–63.
113. Lanza G, Cantone M, Arico D, Lanuzza B, Cosentino FII, Paci D, et al. Clinical and electrophysiological impact of repetitive low-frequency transcranial magnetic stimulation on the sensory-motor network in patients with restless legs syndrome. *Ther Adv Neurol Disord.* 2018;11:1756286418759973.
114. Margariti PN, Astrakas LG, Tsouli SG, Hadjigeorgiou GM, Konitsiotis S, Argyropoulou MI. Investigation of unmedicated early onset restless legs syndrome by voxel-based morphometry, T2 relaxometry, and functional MR imaging during the night-time hours. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2012;33(4):667–72.
115. Earley CJ, B Barker P, Horska A, Allen RP. MRI-determined regional brain iron concentrations in early- and late-onset restless legs syndrome. *Sleep Med.* 2006;7(5):458–61.
116. Schmidauer C, Sojer M, Seppi K, Stockner H, Högl B, Biedermann B, et al. Transcranial ultrasound shows nigral hypoechogenicity in restless legs syndrome. *Ann Neurol.* 2005;58(4):630–4.
117. Moon HJ, Chang Y, Lee YS, Song HJ, Chang HW, Ku J, et al. T2 relaxometry using 3.0-tesla magnetic resonance imaging of the brain in early- and late-onset restless legs syndrome. *J Clin Neurol.* 2014;10(3):197–202.
118. Godau J, Schweitzer KJ, Liepelt I, Gerloff C, Berg D. Substantia nigra hypoechogenicity: definition and findings in restless legs syndrome. *Mov Disord.* 2007;22(2):187–92.
119. Yu GS, Steinkirchner TM, Rao GA, Larkin EC. Effect of prenatal iron deficiency on myelination in rat pups. *Am J Pathol.* 1986;125(3):620–4.
120. Beard J. Iron deficiency alters brain development and functioning. *J Nutr.* 2003;133(5 Suppl 1):1468S–72S.
121. Ortiz E, Pasquini JM, Thompson K, Felt B, Butkus G, Beard J, et al. Effect of manipulation of iron storage, transport, or availability on myelin composition and brain iron content in three different animal models. *J Neurosci Res.* 2004;77(5):681–9.
122. Badaracco ME, Ortiz EH, Soto EF, Connor J, Pasquini JM. Effect of transferrin on hypomyelination induced by iron deficiency. *J Neurosci Res.* 2008 Sep;86(12):2663–73.
123. Roncagliolo M, Garrido M, Walter T, Peirano P, Lozoff B. Evidence of altered central nervous system development in infants with iron deficiency anemia at 6 mo: delayed maturation of auditory brainstem responses. *Am J Clin Nutr.* 1998;68(3):683–90.
124. Connor JR, Ponnuru P, Lee BY, Podskalny GD, Alam S, Allen RP, et al. Postmortem and imaging based analyses reveal CNS decreased myelination in restless legs syndrome. *Sleep Med.* 2011;12(6):614–9.
125. Earley CJ, Connor JR, Beard JL, Clardy SL, Allen RP. Ferritin levels in the cerebrospinal fluid and restless legs syndrome: effects of different clinical phenotypes. *Sleep.* 2005;28(9):1069–75.
126. Mizuno S, Mihara T, Miyaoka T, Inagaki T, Horiguchi J. CSF iron, ferritin and transferrin levels in restless legs syndrome. *J Sleep Res.* 2005;14(1):43–7.

127. Grote L, Leissner L, Hedner J, Ulfberg J. A randomized, double-blind, placebo controlled, multi-center study of intravenous iron sucrose and placebo in the treatment of restless legs syndrome. *Mov Disord.* 2009;24(10):1445–52.
128. Ondo WG, He Y, Rajasekaran S, Le WD. Clinical correlates of 6-hydroxydopamine injections into A11 dopaminergic neurons in rats: a possible model for restless legs syndrome. *Mov Disord.* 2000;15(1):154–8.
129. Dean T Jr, Allen RP, O'Donnell CP, Earley CJ. The effects of dietary iron deprivation on murine circadian sleep architecture. *Sleep Med.* 2006;7(8):634–40.
130. Yang Q, Li L, Chen Q, Foldvary-Schaefer N, Ondo WG, Wang QK. Association studies of variants in MEIS1, BTBD9, and MAP2K5/SKOR1 with restless legs syndrome in a US population. *Sleep Med.* 2011;12(8):800–4.
131. Allen RP, Donelson NC, Jones BC, Li Y, Manconi M, Rye DB, et al. Animal models of RLS phenotypes. *Sleep Med.* 2017;31:23–8.
132. Blum DJ, During E, Barwick F, Davidenko P, Zeitzer JM. Restless leg syndrome: does it start with a gut feeling? *Sleep.* 2019;42(Suppl 1):A4.
133. Ekbom K, Ulfberg J. Restless legs syndrome. *J Intern Med.* 2009;266(5):419–31.
134. Anderson KN, Di Maria C, Allen J. Novel assessment of microvascular changes in idiopathic restless legs syndrome (Willis-Ekbom disease). *J Sleep Res.* 2013;22(3):315–21.
135. Patton SM, Ponnuru P, Snyder AM, Podskalny GD, Connor JR. Hypoxia-inducible factor pathway activation in restless legs syndrome patients. *Eur J Neurol.* 2011;18(11):1329–35.
136. Podlipnik M, Sarc I, Zihlerl K. Restless leg syndrome is common in patients with obstructive sleep apnoea. *ERJ Open Res.* 2017;3(Suppl 1):P20.
137. Staedt J, Stoppe G, Kogler A, Riemann H, Hajak G, Munz DL, et al. Single photon emission tomography (SPET) imaging of dopamine D2 receptors in the course of dopamine replacement therapy in patients with nocturnal myoclonus syndrome (NMS). *J Neural Transm (Vienna).* 1995;99(1-3):187–93.
138. Trenkwalder C, Walters AS, Hening WA, Chokroverty S, Antonini A, Dhawan V, et al. Positron emission tomographic studies in restless legs syndrome. *Mov Disord.* 1999;14(1):141–5.
139. Turjanski N, Lees AJ, Brooks DJ. Striatal dopaminergic function in restless legs syndrome: 18F-dopa and 11C-raclopride PET studies. *Neurology.* 1999;52(5):932–7.
140. Ruottinen HM, Partinen M, Hublin C, Bergman J, Haaparanta M, Solin O, et al. An FDOPA PET study in patients with periodic limb movement disorder and restless legs syndrome. *Neurology.* 2000;54(2):502–4.
141. Michaud M, Soucy JP, Chabli A, Lavigne G, Montplaisir J. SPECT imaging of striatal pre- and postsynaptic dopaminergic status in restless legs syndrome with periodic leg movements in sleep. *J Neurol.* 2002;249(2):164–70.
142. Tribl GG, Asenbaum S, Klosch G, Mayer K, Bonelli RM, Auff E, et al. Normal IPT and IBZM SPECT in drug naive and levodopa-treated idiopathic restless legs syndrome. *Neurology.* 2002;59(4):649–50.
143. Earley CJ, Uhl GR, Clemens S, Ferre S. Connectome and molecular pharmacological differences in the dopaminergic system in restless legs syndrome (RLS): plastic changes and

neuroadaptations that may contribute to augmentation. *Sleep Med.* 2017;31:71–7.

144. Earley CJ, Hyland K, Allen RP. CSF dopamine, serotonin, and bipterin metabolites in patients with restless legs syndrome. *Mov Disord.* 2001;16(1):144–9.

145. Allen RP, Connor JR, Hyland K, Earley CJ. Abnormally increased CSF 3-Ortho-methyldopa (3-OMD) in untreated restless legs syndrome (RLS) patients indicates more severe disease and possibly abnormally increased dopamine synthesis. *Sleep Med.* 2009;10(1):123–8.

146. Earley CJ, Connor J, Garcia-Borreguero D, Jenner P, Winkelmann J, Zee PC, et al. Altered brain iron homeostasis and dopaminergic function in restless legs syndrome (Willis-Ekbom disease). *Sleep Med.* 2014;15(11):1288–301.

147. Michaud M, Dumont M, Selmaoui B, Paquet J, Fantini ML, Montplaisir J. Circadian rhythm of restless legs syndrome: relationship with biological markers. *Ann Neurol.* 2004;55(3):372–80.

148. Allen RP, Barker PB, Wehrl FW, Song HK, Earley CJ, Earley CJ. MRI measurement of brain iron in patients with restless legs syndrome. *Neurology.* 2001;56(2):263–5.

149. Allen RP, Earley CJ. The role of iron in restless legs syndrome. *Mov Disord.* 2007;22(Suppl 18):S440–8.

150. Trenkwalder C, Hogl B, Winkelmann J. Recent advances in the diagnosis, genetics and treatment of restless legs syndrome. *J Neurol.* 2009;256(4):539–53.

151. Erikson KM, Jones BC, Hess EJ, Zhang Q, Beard JL. Iron deficiency decreases dopamine D1 and D2 receptors in rat brain. *Pharmacol Biochem Behav.* 2001;69(3-4):409–18.

152. Dooley DJ, Taylor CP, Donevan S, Feltner D. Ca²⁺ channel $\alpha 2\delta$ ligands: novel modulators of neurotransmission. *Trends Pharmacol Sci.* 2007;28(2):75–82.

153. Garcia-Borreguero D, Silber MH, Winkelmann JW, Hogl B, Bainbridge J, Buchfuhrer M, et al. Guidelines for the first-line treatment of restless legs syndrome/Willis-Ekbom disease, prevention and treatment of dopaminergic augmentation: a combined task force of the IRLSSG, EURLSSG, and the RLS-foundation. *Sleep Med.* 2016;21:1–11.

154. Rizzo V, Quartarone A, Bagnato S, Battaglia F, Majorana G, Girlanda P. Modification of cortical excitability induced by gabapentin: a study by transcranial magnetic stimulation. *Neurol Sci.* 2001;22(3):229–32.

155. Quiroz C, Gulyani S, Ruiqian W, Bonaventura J, Cutler R, Pearson V, et al. Adenosine receptors as markers of brain iron deficiency: implications for restless legs syndrome. *Neuropharmacology.* 2016;111:160–8.

156. Garcia-Borreguero D, Cano I, Granizo JJ. Treatment of restless legs syndrome with the selective AMPA receptor antagonist perampanel. *Sleep Med.* 2017;34:105–8.

157. Surmeier DJ, Ding J, Day M, Wang Z, Shen W. D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci.* 2007;30(5):228–35.

158. Sebastiao AM, Ribeiro JA. Adenosine receptors and the central nervous system. *Handb Exp Pharmacol.* 2009;(193):471–534.

159. Gulyani S, Earley CJ, Camandola S, Maudsley S, Ferre S, Mughal MR, et al. Diminished iron concentrations increase adenosine A(2A) receptor levels in mouse striatum and cultured human neuroblastoma cells. *Exp Neurol.* 2009;215(2):236–42.

160. Quiroz C, Pearson V, Gulyani S, Allen R, Earley C, Ferre S. Up-regulation of striatal adenosine A(2A) receptors with iron deficiency in rats: effects on locomotion and cortico-striatal neurotransmission. *Exp Neurol*. 2010;224(1):292–8.
161. Winkelmann J, Schormair B, Xiong L, Dion PA, Rye DB, Rouleau GA. Genetics of restless legs syndrome. *Sleep Med*. 2017;31:18-22.
162. Winkelmann J, Schormair B, Lichtner P, Ripke S, Xiong L, Jalilzadeh S, et al. Genome-wide association study of restless legs syndrome identifies common variants in three genomic regions. *Nat Genet*. 2007;39(8):1000–6.
163. Azcoitia V, Aracil M, Martinez-A C, Torres M. The homeodomain protein Meis1 is essential for definitive hematopoiesis and vascular patterning in the mouse embryo. *Dev Biol*. 2005;280(2):307–20.
164. Spieler D, Kaffe M, Knauf F, Bessa J, Tena JJ, Giesert F, et al. Restless legs syndrome-associated intronic common variant in Meis1 alters enhancer function in the developing telencephalon. *Genome Res*. 2014;24(4):592–603.
165. Xiong L, Catoire H, Dion P, Gaspar C, Lafreniere RG, Girard SL, et al. MEIS1 intronic risk haplotype associated with restless legs syndrome affects its mRNA and protein expression levels. *Hum Mol Genet*. 2009;18(6):1065–74.
166. Connor JR, Boyer PJ, Menzies SL, Dellinger B, Allen RP, Ondo WG, et al. Neuropathological examination suggests impaired brain iron acquisition in restless legs syndrome. *Neurology*. 2003;61(3):304–9.
167. Hornyak M, Feige B, Voderholzer U, Philipsen A, Riemann D. Polysomnography findings in patients with restless legs syndrome and in healthy controls: a comparative observational study. *Sleep*. 2007;30(7):861–5.
168. Stefani A, Mitterling T, Heidbreder A, Steiger R, Kremser C, Frauscher B, et al. Multimodal MRI reveals alterations of sensorimotor circuits in restless legs syndrome [abstract]. *Sleep*. 2019;42(Suppl 1):A268–70.
169. Chang Y, Chang HW, Song H, Ku J, Earley CJ, Allen RP, et al. Gray matter alteration in patients with restless legs syndrome: a voxel-based morphometry study. *Clin Imaging*. 2015;39(1):20–5.
170. Yang FC, Chou KH, Lee PL, Yin JH, Chen SY, Kao HW, et al. Patterns of gray matter alterations in migraine and restless legs syndrome. *Ann Clin Transl Neurol*. 2018;6(1):57–67.
171. Clarkson MJ, Cardoso MJ, Ridgway GR, Modat M, Leung KK, Rohrer JD, et al. A comparison of voxel and surface based cortical thickness estimation methods. *Neuroimage*. 2011;57(3):856–65.
172. Fischl B. FreeSurfer. *Neuroimage*. 2012;62(2):774–81.
173. Ghosh SS, Kakunoori S, Augustinack J, Nieto-Castanon A, Kovelman I, Gaab N, et al. Evaluating the validity of volume-based and surface-based brain image registration for developmental cognitive neuroscience studies in children 4 to 11 years of age. *Neuroimage*. 2010;53(1):85–93.
174. Barnes J, Ridgway GR, Bartlett J, Henley SM, Lehmann M, Hobbs N, et al. Head size, age and gender adjustment in MRI studies: a necessary nuisance? *Neuroimage*. 2010;53(4):1244–55.

175. Hornyak M, Ahrendts JC, Spiegelhalder K, Riemann D, Voderholzer U, Feige B, et al. Voxel-based morphometry in unmedicated patients with restless legs syndrome. *Sleep Med.* 2007;9(1):22–6.
176. Ashburner J. A fast diffeomorphic image registration algorithm. *Neuroimage.* 2007;38(1):95–113.
177. Chumbley J, Worsley K, Flandin G, Friston K. Topological FDR for neuroimaging. *Neuroimage.* 2010;49(4):3057–64.
178. Celle S, Roche F, Peyron R, Faillenot I, Laurent B, Pichot V, et al. Lack of specific gray matter alterations in restless legs syndrome in elderly subjects. *J Neurol.* 2010;257(3):344–8.
179. Comley RA, Cervenka S, Palhagen SE, Panagiotidis G, Matthews JC, Lai RY, et al. A comparison of gray matter density in restless legs syndrome patients and matched controls using voxel-based morphometry. *J Neuroimaging.* 2012;22(1):28–32.
180. Spiegelhalder K, Feige B, Paul D, Riemann D, van Elst LT, Seifritz E, et al. Cerebral correlates of muscle tone fluctuations in restless legs syndrome: a pilot study with combined functional magnetic resonance imaging and anterior tibial muscle electromyography. *Sleep Med.* 2008;9(2):177–83.
181. Astrakas LG, Konitsiotis S, Margariti P, Tsouli S, Tzarouhi L, Argyropoulou MI. T2 relaxometry and fMRI of the brain in late-onset restless legs syndrome. *Neurology.* 2008;71(12):911–6.
182. Provini F, Chiaro G. Neuroimaging in restless legs syndrome. *Sleep Med Clin.* 2015;10(3):215–26.
183. Rizzo G, Tonon C, Manners D, Testa C, Lodi R. Imaging brain functional and metabolic changes in restless legs syndrome. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2013;13(9):372.
184. Yang H, Wang L, Li X, Wang K, Hou Y, Zhang X, et al. A study for the mechanism of sensory disorder in restless legs syndrome based on magnetoencephalography. *Sleep Med.* 2019;53:35–44.
185. Gorges M, Roskopf J, Müller HP, Lindemann K, Hornyak M, Kassubek J. Patterns of increased intrinsic functional connectivity in patients with restless legs syndrome are associated with attentional control of sensory inputs. *Neurosci Lett.* 2016;617:264–9.
186. Ku J, Lee YS, Chang H, Earley CJ, Allen RP, Cho YW. Default mode network disturbances in restless legs syndrome/Willis-Ekbom disease. *Sleep Med.* 2016;23:6–11.
187. Le Bihan D, Johansen-Berg H. Diffusion MRI at 25: exploring brain tissue structure and function. *Neuroimage.* 2012;61(2):324–41.
188. Jones DK, Leemans A. Diffusion tensor imaging [Internet]. In: Modo M, Bulte JW, editors. *Magnetic resonance neuroimaging: methods and protocols*. New York: Humana Press. 2011 [cited 2017 Oct 13]. p. 127–44. Available from: https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-61737-992-5_6192
189. Le Bihan D, Mangin JF, Poupon C, Clark CA, Pappata S, Molko N, et al. Diffusion tensor imaging: concepts and applications. *J Magn Reson Imaging.* 2001;13(4):534–46.
190. Basser PJ, Jones DK, Jones DK, Jones DK. Diffusion-tensor MRI: theory, experimental design and data analysis - a technical review. *NMR Biomed.* 2002;15(7-8):456–67.

191. Beaulieu C. The biological basis of diffusion anisotropy. In: Johansen-Berg H, Behrens TE, editors. *Diffusion MRI: from quantitative measurement to in-vivo neuroanatomy*. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press; 2014. p. 155–83.
192. Fieremans E, Jensen JH, Helpen JA. White matter characterization with diffusional kurtosis imaging. *Neuroimage*. 2011;58(1):177–88.
193. Wang Y, Sun P, Wang Q, Trinkaus K, Schmidt RE, Naismith RT, et al. Differentiation and quantification of inflammation, demyelination and axon injury or loss in multiple sclerosis. *Brain*. 2015;138(Pt 5):1223–38.
194. Aung WY, Mar S, Benzinger TL. Diffusion tensor MRI as a biomarker in axonal and myelin damage. *Imaging Med*. 2013;5(5):427–40.
195. Song SK, Sun SW, Ju WK, Lin SJ, Cross AH, Neufeld AH. Diffusion tensor imaging detects and differentiates axon and myelin degeneration in mouse optic nerve after retinal ischemia. *Neuroimage*. 2003;20(3):1714–22.
196. Song SK, Yoshino J, Le TQ, Lin SJ, Sun SW, Cross AH, et al. Demyelination increases radial diffusivity in corpus callosum of mouse brain. *Neuroimage*. 2005;26(1):132–40.
197. Pierpaoli C, Barnett A, Pajevic S, Chen R, Penix LR, Virta A, et al. Water diffusion changes in Wallerian degeneration and their dependence on white matter architecture. *Neuroimage*. 2001;13(6 Pt 1):1174–85.
198. Inano S, Takao H, Hayashi N, Abe O, Ohtomo K. Effects of age and gender on white matter integrity. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2011;32(11):2103–9.
199. Jones DK, Cercignani M. Twenty-five pitfalls in the analysis of diffusion MRI data. *NMR Biomed*. 2010;23(7):803–20.
200. Yendiki A, Koldewyn K, Kakunoori S, Kanwisher N, Fischl B. Spurious group differences due to head motion in a diffusion MRI study. *Neuroimage*. 2014;88:79–90.
201. Leemans A, Jeurissen B, Sijbers J, Jones D. ExploreDTI: a graphical toolbox for processing, analyzing, and visualizing diffusion MR data [Internet]. Concord: Proc Int Soc Magn Reson Med. 2009 [cited 2017 Oct 13]. Available from: http://www.exploredti.com/ref/ExploreDTI_ISMRM_2009.pdf
202. Smith RE, Tournier JD, Calamante F, Connelly A. Anatomically-constrained tractography: improved diffusion MRI streamlines tractography through effective use of anatomical information. *Neuroimage*. 2012;62(3):1924–38.
203. 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.
204. Jezzard P, Balaban RS. Correction for geometric distortion in echo planar images from B0 field variations. *Magn Reson Med*. 1995;34(1):65–73.
205. Veraart J, Sijbers J, Sunaert S, Leemans A, Jeurissen B. Weighted linear least squares estimation of diffusion MRI parameters: strengths, limitations, and. *Neuroimage*. 2013;81:335–46.
206. Rabin JS, Perea RD, Buckley RF, Neal TE, Buckner RL, Johnson KA, et al. Global white matter diffusion characteristics predict longitudinal cognitive change independently of amyloid status in clinically normal older adults. *Cereb Cortex*. 2019;29(3):1251–62.

207. Sateia M. International classification of sleep disorders. 3rd ed. Darien: American Academy of Sleep Medicine; 2014.
208. Rossi S, Hallett M, Rossini PM, Pascual-Leone A, Avanzini G, Bestmann S, et al.; Safety of TMS Consensus Group. Safety, ethical considerations, and application guidelines for the use of transcranial magnetic stimulation in clinical practice and research. *Clin Neurophysiol*. 2009;120(12):2008–39.
209. Ziemann U, Reis J, Schwenkreis P, Rosanova M, Strafella A, Badawy R, et al. TMS and drugs revisited 2014. *Clin Neurophysiol*. 2015;126(10):1847–68. Review.
210. Oldfield RC. The assessment and analysis of handedness: the Edinburgh inventory. *Neuropsychologia*. 1971;9(1):97–113.
211. Masuko AH, Prado GF. Tradução e validação para a língua portuguesa do Brasil da Escala Internacional de Gradação da Síndrome das Pernas Inquietas do Grupo Internacional de Estudos da Síndrome das Pernas Inquietas. 2008;66(4):1–15.
212. Johns MW. A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale. *Sleep*. 1991;14(6):540–5.
213. Bertolazi AN, Fagundes SC, Hoff LS, Pedro VD, Menna Barreto SS, Johns MW. Portuguese-language version of the Epworth sleepiness scale: validation for use in Brazil. *J Bras Pneumol*. 2009;35(9):877–83.
214. Smith SM. Fast robust automated brain extraction. *Hum Brain Mapp*. 2002;17(3):143–55.
215. Jenkinson M, Smith S. A global optimisation method for robust affine registration of brain images. *Med Image Anal*. 2001;5(2):143–56.
216. Tromp D. A guide to quantifying head motion in DTI studies [Internet]. 2016 [cited 2018 Mar 29]. Available from: <https://thewinnower.com/papers/3525-a-guide-to-quantifying-head-motion-in-dti-studies>
217. 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.
218. Veraart J, Rajan J, Peeters RR, Leemans A, Sunaert S, Sijbers J. Comprehensive framework for accurate diffusion MRI parameter estimation. *Magn Reson Med*. 2013;70(4):972–84.
219. Vogel K, Timmers I, Kumar V, Nickl-Jockschat T, Bastiani M, Roebroek A, et al. White matter microstructural changes in adolescent anorexia nervosa including an exploratory longitudinal study. *Neuroimage Clin*. 2016;11:614–21.
220. Yoncheva YN, Somandepalli K, Reiss PT, Kelly C, Di Martino A, Lazar M, et al. Mode of anisotropy reveals global diffusion alterations in attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2016;55(2):137–45.
221. Mori S, Wakana S, Nagae-Poetscher LM, Zijl PC. MRI atlas of human white matter. Amsterdam: Elsevier; 2005.
222. 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.

223. Mori S, Kaufmann WE, Davatzikos C, Stieltjes B, Amodei L, Fredericksen K, et al. Imaging cortical association tracts in the human brain using diffusion-tensor-based axonal tracking. *Magn Reson Med*. 2002;47(2):215–23.
224. Stieltjes B, Kaufmann WE, van Zijl PC, Fredericksen K, Pearlson GD, Solaiyappan M, et al. Diffusion tensor imaging and axonal tracking in the human brainstem. *Neuroimage*. 2001;14(3):723–35.
225. Wakana S, Caprihan A, Panzenboeck MM, Fallon JH, Perry M, Gollub RL, et al. Reproducibility of quantitative tractography methods applied to cerebral white matter. *Neuroimage*. 2007;36(3):630–44.
226. Wakana S, Jiang H, Nagae-Poetscher LM, van Zijl PC, Mori S. Fiber tract-based atlas of human white matter anatomy. *Radiology*. 2004;230(1):77–87.
227. 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.
228. 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*. [Internet]. 2003;50(5):1077–88.
229. Rizzo G, Li X, Galantucci S, Filippi M, Cho YW. Brain imaging and networks in restless legs syndrome. *Sleep Med*. 2017;31:39–48.
230. Geng G, Henry R, Rae C. Effects of 8 and 32-channel phase array coils on DTI metrics. *Proc Intl Soc Magn Reson Med Sci Meet Exhib*. 2012;20:1900.
231. Farrell JA, Landman BA, Jones CK, Smith SA, Prince JL, van Zijl PC, et al. Effects of signal-to-noise ratio on the accuracy and reproducibility of diffusion tensor imaging-derived fractional anisotropy, mean diffusivity, and principal eigenvector measurements at 1.5 T. *J Magn Reson Imaging*. 2007;26(3):756–67.
232. Yao X, Yu T, Liang B, Xia T, Huang Q, Zhuang S. Effect of increasing diffusion gradient direction number on diffusion tensor imaging fiber tracking in the human brain. *Korean J Radiol*. 2015;16(2):410–8.
233. Rizzo G, Tonon C, Testa C, Manners D, Vetrugno R, Pizza F, Marconi S, Malucelli E, Provini F, Plazzi G, Montagna P, Lodi R. Abnormal medial thalamic metabolism in patients with idiopathic restless legs syndrome. *Brain*. 2012;135(12):3712–20.
234. Ni H, Kavcic V, Zhu T, Ekholm S, Zhong J. Effects of number of diffusion gradient directions on derived diffusion tensor imaging indices in human brain. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2006;27(8):1776–81.
235. Cox RW, Chen G, Glen DR, Reynolds RC, Taylor PA. fMRI clustering in AFNI: false-positive rates redux. *Brain Connect*. 2017;7(3):152–71.
236. Pannek K, Chalk JB, Finnigan S, Rose SE. Dynamic corticospinal white matter connectivity changes during stroke recovery: a diffusion tensor probabilistic tractography study. *J Magn Reson Imaging*. 2009;29(3):529–36.
237. Carpenter M, Sutin J. Human neuroanatomy. 11th ed. Amsterdam: Elsevier; 1983.
238. Guillery RW. Anatomical evidence concerning the role of the thalamus in corticocortical communication: a brief review. *J Anat*. 1995;187 (Pt 3):583–92. Review.

239. Marcus EM, Jacobson S, Sabin TD. Integrated neuroscience : a clinical case history problem solving approach. Oxford University Press; 2014.
240. Lambert C, Simon H, Colman J, Barrick TR. Defining thalamic nuclei and topographic connectivity gradients in vivo. *Neuroimage*. 2017;158:466–79.
241. Tyll S, Budinger E, Noesselt T. Thalamic influences on multisensory integration. *Commun Integr Biol*. 2011;4(4):378–81.
242. Green SA, Hernandez L, Bookheimer SY, Dapretto M. Reduced modulation of thalamocortical connectivity during exposure to sensory stimuli in ASD. *Autism Res*. 2017;10(5):801–9.
243. Saalman YB, Pinsk MA, Wang L, Li X, Kastner S. The pulvinar regulates information transmission between cortical areas based on attention demands. *Science*. 2012 10;337(6095):753-6.
244. Barron DS, Eickhoff SB, Clos M, Fox PT. Human pulvinar functional organization and connectivity. *Hum Brain Mapp*. 2015;36(7):2417–31.
245. Godau J, Klose U, Di Santo A, Schweitzer K, Berg D. Multiregional brain iron deficiency in restless legs syndrome. *Mov Disord*. 2008;23(8):1184–7.
246. Tsao H, Pannek K, Boyd RN, Rose SE. Changes in the integrity of thalamocortical connections are associated with sensorimotor deficits in children with congenital hemiplegia. *Brain Struct Funct*. 2015;220(1):307–18.
247. Benedetti F, Yeh PH, Bellani M, Radaelli D, Nicoletti MA, Poletti S, et al. Disruption of white matter integrity in bipolar depression as a possible structural marker of illness. *Biol Psychiatry*. 2011;69(4):309–17.
248. Correa DG, Ventura N, Zimmermann N, Doring TM, Tukamoto G, Leme J, et al. Evaluation of deep gray matter volume, cortical thickness and white matter integrity in patients with typical absence epilepsy: a study using voxelwise-based techniques. *Neuroradiology*. 2017;59(3):237–45.
249. Gaudio S, Carducci F, Piervincenzi C, Olivo G, Schioth HB. Altered thalamo–cortical and occipital–parietal– temporal–frontal white matter connections in patients with anorexia and bulimia nervosa: a systematic review of diffusion tensor imaging studies. *J Psychiatry Neurosci*. 2019;44(5):324-39.
250. Li X, Liu Z, Tang Z, Han Y. Diffusion tensor imaging study in the detection of white matter degeneration in subjective cognitive decline. *Alzheimers Dement*. 2016;12(7):773.
251. Lu LH, Zhou XJ, Keedy SK, Reilly JL, Sweeney JA. White matter microstructure in untreated first episode bipolar disorder with psychosis: comparison with schizophrenia. *Bipolar Disord*. 2011;13(7-8):604–13.
252. Worker A, Blain C, Jarosz J, Chaudhuri KR, Barker GJ, Williams SC, et al. Diffusion tensor imaging of Parkinson’s disease, multiple system atrophy and progressive supranuclear palsy: a tract-based spatial statistics study. *PLoS One*. 2014;9(11):e112638.
253. Cortese S, Imperati D, Zhou J, Proal E, Klein RG, Mannuzza S, et al. White matter alterations at 33-year follow-up in adults with childhood attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*. 2013;74(8):591–8.

254. Ercan ES, Suren S, Bacanli A, Yazıcı KU, Calli C, Ardic UA, et al. Altered structural connectivity is related to attention deficit/hyperactivity subtypes: a DTI study. *Psychiatry Res Neuroimaging*. 2016;256:57–64.
255. Ghorayeb I, Gamas A, Mazurie Z, Mayo W. Attention-deficit hyperactivity and obsessive-compulsive symptoms in adult patients with Primary restless legs Syndrome: different phenotypes of the same disease? *Behav Sleep Med*. 2017;00(00):1–8.
256. Chaddock-Heyman L, Erickson KI, Voss MW, Powers JP, Knecht AM, Pontifex MB, et al. White matter microstructure is associated with cognitive control in children. *Biol Psychol*. 2013;94(1):109–15.
257. Han BS, Hong JH, Hong C, Yeo SS, Lee D, Cho HK, et al. Location of the corticospinal tract at the corona radiata in human brain. *Brain Res*. 2010;1326:75–80.
258. Jang SH. A review of corticospinal tract location at corona radiata and posterior limb of the internal capsule in human brain. *NeuroRehabilitation*. 2009;24(3):279–83.
259. Kim JS, Pope A. Somatotopically located motor fibers in corona radiata: evidence from subcortical small infarcts. *Neurology*. 2005;64(8):1438–40.
260. DeSouza DD, Hodaie M, Davis KD. Abnormal trigeminal nerve microstructure and brain white matter in idiopathic trigeminal neuralgia. *Pain*. 2014;155(1):37–44.
261. Benito-Leon J, Mato-Abad V, Louis ED, Hernandez-Tamames JA, Alvarez-Linera J, Bermejo-Pareja F, et al. White matter microstructural changes are related to cognitive dysfunction in essential tremor. *Sci Rep*. 2017;7(1):2978.
262. Chiang MC, Barysheva M, Shattuck DW, Lee AD, Madsen SK, Avedissian C, et al. Genetics of brain fiber architecture and intellectual performance. *J Neurosci*. 2009;29(7):2212–24.
263. Payabvash S, Palacios EM, Owen JP, Wang MB, Tavassoli T, Gerdes M, et al. Diffusion tensor tractography in children with sensory processing disorder: potentials for devising machine learning classifiers. *Neuroimage Clin*. 2019;2:101831.
264. Stave EA, De Bellis MD, Hooper SR, Woolley DP, Chang SK, Chen SD. Dimensions of attention associated with the microstructure of corona radiata white matter. *J Child Neurol*. 2017;32(5):458–66.
265. Baumann O, Borra RJ, Bower JM, Cullen KE, Habas C, Ivry RB, et al. Consensus paper: the role of the cerebellum in perceptual processes. *Cerebellum*. 2015;14(2):197–220.
266. Proville RD, Spolidoro M, Guyon N, Dugue GP, Selimi F, Isope P, et al. Cerebellum involvement in cortical sensorimotor circuits for the control of voluntary movements. *Nat Neurosci*. 2014;17(9):1233–9.
267. Keser Z, Hasan KM, Mwangi BI, Kamali A, Ucisik-Keser FE, Riascos RF, et al. Diffusion tensor imaging of the human cerebellar pathways and their interplay with cerebral macrostructure. *Front Neuroanat*. 2015;9:41.
268. Palesi F, Tournier JD, Calamante F, Muhlert N, Castellazzi G, Chard D, et al. Contralateral cerebello-thalamo-cortical pathways with prominent involvement of associative areas in humans in vivo. *Brain Struct Funct*. 2015;220(6):3369–84.
269. Manto M, Bower JM, Conforto AB, Delgado-Garcia JM, da Guarda SN, Gerwig M, et al. Consensus paper: roles of the cerebellum in motor control--the diversity of ideas on cerebellar involvement in movement. *Cerebellum*. 2012;11(2):457-87.

270. Kaplan Y, Oksuz E. Association between restless legs syndrome and Chiari type 1 malformation. *Clin Neurol Neurosurg*. 2008;110(4):408–10.
271. Konieczny M, Bauer P, Tomiuk J, Weisser G, Haan J, Berger K, et al. CAG repeats in restless legs syndrome. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2006;141B(2):173-6.
272. Pedroso JL, Braga-Neto P, Martinez AR, Martins CR, Rezende Filho FM, Sobreira-Neto MA, et al. Sleep disorders in Machado-Joseph disease. *Curr Opin Psychiatry*. 2016;29(6):402–8.
273. Synofzik M, Godau J, Lindig T, Schols L, Berg D. Restless legs and substantia nigra hypoechogenicity are common features in Friedreich's ataxia. *Cerebellum*. 2011;10(1):9–13.
274. Winkelmann JW, Schoernig L, Platt S, Jensen JE. Restless legs syndrome and central nervous system gamma-aminobutyric acid: preliminary associations with periodic limb movements in sleep and restless leg syndrome symptom severity. *Sleep Med*. 2014;15(10):1225–30.
275. Ronconi L, Casartelli L, Carna S, Molteni M, Arrigoni F, Borgatti R. When one is enough: impaired multisensory integration in cerebellar agenesis. *Cereb Cortex*. 2017;27(3):2041–51.
276. Moulton EA, Elman I, Pendse G, Schmahmann J, Becerra L, Borsook D. Aversion-related circuitry in the cerebellum: responses to noxious heat and unpleasant images. *J Neurosci*. 2011;31(10):3795–804.
277. Soares JM, Marques P, Alves V, Sousa N. A hitchhiker's guide to diffusion tensor imaging. *Front Neurosci*. 2013;7:31.
278. Abetz L, Arbuckle R, Allen RP, Mavraki E, Kirsch J. The reliability, validity and responsiveness of the Restless Legs Syndrome Quality of Life questionnaire (RLSQoL) in a trial population. *Health Qual Life Outcomes*. 2005;3:1–11.

Abstract

Introduction: Restless Legs Syndrome, also known as Willis-Ekbom disease, is suggested to be caused by brain iron deficiency, loss of inhibitory modulation of descending central motor pathways, structural changes in the somatosensory cortex, abnormal connectivity between motor and sensory areas, as well as by slight abnormalities in white matter micro-organization. **Purpose:** To compare diffusion-tensor imaging metrics between subjects with primary restless legs syndrome and controls. **Methods:** We assessed diffusion-tensor imaging metrics in 38 individuals with restless legs syndrome (14 mild to moderate, 24 severe to very severe syndrome) and 24 healthy sex and age-matched controls with whole-brain tract based spatial statistics, region-of-interest and probabilistic tractography analyses. The regions-of-interest were the corticospinal tract at the level of the cerebral peduncle, the superior, middle and inferior cerebellar peduncles, as well as areas encompassing clusters that statistically significant differences were found between-groups according to tract based spatial statistics analysis. Subgroup analyses were conducted according to the severity of restless legs syndrome symptoms. For the tractography analysis, the tracts of interest were the corticospinal tract and the posterior thalamic radiation. We also explored associations between significant findings and symptoms' severity using the Spearman's correlation. **Results:** Our tract based spatial statistics results showed decreased axial diffusivity in the left posterior thalamic radiation in restless legs syndrome. Individuals with severe restless legs syndrome, had decreased axial diffusivity in the left posterior corona radiata. Axial diffusivity in this region was significantly and negatively correlated with the restless legs syndrome symptoms' severity. Region-of-interest- analysis showed an increased radial diffusivity in the superior cerebellar peduncles of individuals with severe restless legs syndrome. The tractography revealed no differences between-groups or subgroup. **Conclusions:** Our results are consistent with slight changes in white matter microstructural organization, mainly in individuals with restless legs syndrome with more severe symptoms in areas related to multisensory or sensorimotor integration.

Keywords: Restless legs syndrome; Diffusion tensor imaging

Apêndices

Apêndice 1. Avaliação clínica

QUESTIONÁRIO DEMOGRÁFICO/CLÍNICO

NOME: _____
Data: ____ / ____ / ____
Prontuário Unifesp: _____
Data de Nascimento: ____ / ____ / ____ Idade: _____
Raça: Branca () Negra () Oriental () outra _____
Endereço: _____ No: _____
apto: _____ Bairro: _____
CEP _____ - _____ Cidade: _____
Estado: _____
Telefone residencial : (____) _____ - _____ Telefone comercial : (____) _____ - _____
Celular : (____) _____ - _____
e-mail: _____
Peso : _____ Kg Altura : _____ cm
IMC : _____

SEXO: 1=masculino; 2=feminino

☐

ESTADO CIVIL: 1=casado; 2=solteiro; 3= relação estável; 4=divorciado; 5=viúvo

☐

ESCOLARIDADE: 0=analfabeto/primário incompleto; 1=primário completo/ginasial incompleto;
2=ginasial completo/colegial incompleto; 3=colegial completo/superior incompleto;
4=superior completo

☐

ANOS DE ESTUDO FORMAL: _____

OCUPAÇÃO: 1=trabalhador; 2=estudante; 3=aposentado; 4=desempregado;
5=outros _____

CARGO: _____

PERÍODO: 1=dia; 2=notite; 3=turnos alternados; 9=não aplicável

☐

CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS:

1. ☐ TEM OU JÁ TEVE SENSACÃO DE INCÔMODO OU DESCONFORTO NAS
PERNAS QUE CAUSA GRANDE VONTADE DE MOVÊ-LAS
0=não; 1=sim
2. ☐ ESSA SENSACÃO DE DESCONFORTO MELHORA OU PASSA COM A
MOVIMENTAÇÃO DAS PERNAS
0=não; 1=sim

3. ☐ ESSA SENSACÃO DE DESCONFORTO OCORRE OU PIORA DURANTE O REPOUSO
0=não; 1=sim

4. ☐ ESSA SENSACÃO DE DESCONFORTO OCORRE OU PIORA À NOITE
0=não; 1=sim

☐ **PACIENTE COM SPI** 0=não; 1=sim

☐ **ANTECEDENTES PESSOAIS**

☐ **FUMO** 0=não; 1=sim; 3=ex-fumante QUANTO cigarros/dia
HÁ QUANTOS ANOS FUMA

ALCOOL 0=não; 1=sim QUANTOS DIAS NA
SEMANA QUANTO doses/semana

☐ **CAFÉ:** 0=não; 1=sim QUANTO xícaras/dia

☐ **EXERCÍCIO FÍSICO:** 0=não; 1=sim QUANTO dias/semana

☐ **GESTACÃO PRÉVIA** 0=não; 1=sim QUANTAS COM QUE IDADE: _____
DIAGNÓSTICO PRÉVIO DE:

☐ HAS ☐ IRC ☐ ANEMIA 0=não; 1=sim

☐ DÇAS REUMÁTICAS 0=não; 1=sim QUAL _____

☐ DÇAS RESPIRATÓRIAS 0=não;
1=sim QUAL _____

☐ DÇAS CARDIACAS 0=não;
1=sim QUAL _____

☐ DÇAS DO TRATO GASTROINTESTINAL 0=não; 1=sim,
QUAL _____

☐ DÇA VASCULAR PERIFÉRICA. 0=não;
1=sim QUAL _____

☐ DÇA ENDÓCRINAS 0=não; 1=sim; 3=diabetes;
4=dças da tireóide 5=OUTRAS _____

☐ DÇA NEUROLÓGICA 0=não; 1=sim; 3=polineuropatia; 4=cefaléia; 5=OUTRAS _____

☐ DÇA PSIQUIÁTRICA 0=não; 1=sim; 3=humor; 4=ansiedade;
5=OUTRAS _____

OUTRO _____

USO DE MEDICAÇÕES NA ÚLTIMA SEMANA 0=não; 1=sim
DROGAS

1.	2.
3.	4.
5.	6.
7.	8.
9.	10.

ANTECEDENTES FAMILIARES

DÇA NEUROLÓGICA 0=não; 1=sim
QUAL _____

DÇA PSIQUIÁTRICA 0=não;
1=sim QUAL _____
OUTRAS _____

QUALIDADE DO SONO

HORA QUE VAI PARA CAMA ____:____

HORA QUE DORME ____:____

HORA DE ACORDAR ____:____

N DE DESPERTARES: _____ TEMPO MÉDIO ESTIMADO
DOS DESPERTARES _____min

Ronco Mov perna Bruxismo Sonambulismo 0=não; 1=sim

SE TIVESSE OPORTUNIDADE: HORA QUE DORMIRIA ____:____ HORA QUE
ACORDARIA ____:____

INSÔNIA: 0=não; 1=inicial; 2=manutenção; 3=terminal.

Frequência: 1= Nenhuma vez no ultimo mês; 2= $\leq$ 1xsemana; 3=1-2xsemana;
4= $\geq$ 3x semana

EXAME FÍSICO - NEUROLÓGICO

FORÇA MUSCULAR: 0=preservada; 1=alterada; se alterada
descrever: _____

REFLEXOS TENDÍNEOS: 0=preservados; 1=alterados; se alterados
descrever: _____

SENSIBILIDADE SUPERFICIAL: 0=preservada; 1=alterada; se alterada
descrever: _____

SENSIBILIDADE PROFUNDA: 0=preservada; 1=alterada; se alterada
descrever: _____

COORDENAÇÃO: 0=preservada; 1=alterada; se alterada
descrever: _____

ESTIGMAS DE DOENÇA VASCULAR PERIFÉRICA: 0=não; 1=sim

FO: 0=normal; 1=alterado; se alterado
descrever: _____

Achados:

CONCLUSÕES:

DIAGNÓSTICO

CLÍNICO:

COMORBIDADES:

Apêndice 2. Tutorial desenvolvido com passo-a-passo de processamento de Imagens por Tensor de Difusão (DTI)

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – Análise de imagens por tensor de difusão (*Diffusion tensor imaging*, DTI)

LABORATÓRIO DE NEUROESTIMULAÇÃO – HIAE, 2º andar, bloco B

Joselisa Paiva (10/08/2017)

1) Atalhos básicos do MAC OS X

- a) Digite no *Spotlight* (lupa no canto superior direito da tela) a palavra Terminal. Uma vez aberto, seu ícone aparecerá no DOCK (barra inferior). Clique com botão direito em cima para fixar seu atalho permanentemente.
- b) Command (⌘)-Shift-3: Tira foto da tela (o arquivo é salvo como TIFF, no *desktop*).
- c) Command-Shift-4: Tira foto de seleção da tela (idem).
- d) Command-C e Command-V - Copia e cola arquivos e pastas
- e) Command-Tab - Pula para o próximo programa ativo, pela ordem do Dock, da esquerda para a direita.

2) Comandos básicos para uso no *shell* (terminal)

- a) ls (listar arquivos), pwd (mostra o nome do diretório atual, "*present working directory*"), cd (sozinho, volta pro *home directory*. Se tiver o nome da pasta após o "cd", entra na pasta), "cd .." (cd, com dois pontos, faz retomar a um nível acima, pasta anterior), mkdir (criar pasta, "*make directory*"), rm (deletar arquivo, se pasta adicionar argumento -f, "*remove*") cp (copiar arquivo, "*copy*"), mv a* origem destino (mover todos os arquivos que começam com a letra "a" para o destino especificado), ls -l a*o (listar todos os arquivos que começam com a letra "a" e terminam com "o").

3) Instalação do FSL

- a) É possível rodar via Windows por meio de máquina virtual (passo a passo aqui: <https://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslwiki/FslInstallation/Windows>). Por motivo de velocidade de processamento, recomenda-se rodar o FSL no MAC OS X ou

distribuição LINUX (Centos or Debian/Ubuntu).

b) Requisitos mínimos de *hardware*:

- i) Dual core CPU
- ii) 4GB RAM (recomenda-se 8GB ou mais)
- iii) Mínimo de 75 gigas livres de HD

c) Faça *download* do instalador, arquivo “*fslinstaller.py*” (<https://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslwiki/FslInstallation>). Digite no terminal “cd ~/Downloads” e, então, “python fslinstaller.py”.

d) Para o SETUP. Dentro de novo terminal, digite “pico .bash_profile”. Será aberto um editor de texto. Copie e cole nele o seguinte trecho:

```
FSLDIR=/usr/local/fsl  
. ${FSLDIR}/etc/fslconf/fsl.sh  
PATH=${FSLDIR}/bin:${PATH}  
export FSLDIR PATH
```

e) Salvar com control+x. Agora basta reiniciar o sistema e digitar “fsl” em um terminal para abrir.

4) Referências recomendadas para estudo

a) Parte prática:

- i) *User guide* do próprio *site* do FSL:
<http://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslwiki/FDT/UserGuide>
- ii) Site <http://www.diffusion-imaging.com/> (Do Tromp, University of Wisconsin, Madison, USA).
- iii) Andrew Jahn (Indiana University, USA): blog (<https://www.andysbrainblog.com/>) e tutoriais em vídeo (https://www.youtube.com/watch?v=OmzQYJrC_Mo).
- iv) Guia de análise de DTI do departamento de Brain Imaging de Dartmouth (<http://dbic.dartmouth.edu/dti/DTIGuide.pdf>).
- v) Passo-a-passo escrito por Morrow, Morgan and Rorden: (<http://www.cabiatl.com/Resources/Course/tutorial/html/dti.html>).
- vi) Passo-a-passo da Suzanne Avery da *Vanderbilt University Institute of Imaging Science*: <http://www.blackfordlab.com/editor-assets/TBSS%20Processing%20Guide%20V1.2.pdf>
- vii) Fórum oficial do FSL (<https://www.jiscmail.ac.uk/cgi-bin/webadmin?A0=FSL>).

b) Parte teórica:

- i) Para a parte de física de ressonância magnética (RM): 56 vídeos de aulas ministradas pelo Dr. Michael Lipton do *Albert Einstein College of Medicine*, USA:
<https://www.youtube.com/playlist?list=PLPclmQzEnTpz-5TzxyyoYSbiAa9xdd89l>
- ii) Livro Introduction to Diffusion Tensor Imaging do Susumu Mori.
- iii) Livro Diffusion Tensor Imaging – A practical Handbook, Springer, 2016 (Van Hecke, Wim, Emsell, Louise, Sunaert, Stefan).

5) Conversão de DICOM para NIFT

- a) O FSL trabalha com o formato NIFTI (*Neuroimaging Informatics Technology Initiative*) que comprime 90% do tamanho original, sem perder informação. Para tanto, pode-se utilizar diversos softwares, sendo os mais comuns: DCM2NII (<https://www.nitrc.org/projects/dcm2nii/>) e o MRICConvert (Figura 1).
- b) Importe ou simplesmente puxe a pasta com os arquivos do sujeito, segurando com o mouse, para a janela de conversão.
- c) Após verificar os pontos de destaque (em vermelho) na figura 1, basta apertar “Convert all”. Recomenda-se a seguinte organização na pasta de cada sujeito:

C0001

```
| |-- ANATOMY--| |  
| |-- DTI--| |  
| |-- FUNCTIONAL--| |
```

- d) Verificar a orientação da imagem convertida (visualmente, chamar no terminal `fslview nomedaimagem.nii`) e se está seguindo a mesma orientação do MNI152 (se não souber qual é, pode abrir um *template* - dentro da pasta ATLAS do FSL - para comparação). Para reorientar (rotação rígida de 90, 180 ou 270 graus), no terminal, digitar:
fslreorient2std imagem_a_reorientar.nii coloque_nome_imagem_reorientada.nii
- e) Verifique se foram criados os arquivos “bvec” (direção dos gradientes) e “bval” (valor/magnitude dos gradientes).

Figura 1. Convertendo DICOM to NIFTI via MRIConvert

7) FDT Diffusion no FSL

- Abrir o FSL via terminal (digitar fsl).
- Selecionar a opção *FDT Diffusion* na interface gráfica (Figura 2).

Figura 2. Interface gráfica do FSL, com destaque para *toolbox* de processamento de DTI

8) Correção de *Eddy Currents* e *Motion artefacts*

- a) Para correção das correntes “parasitas” de Foucault e da movimentação de cabeça, dentro da janela FDT Diffusion, selecione “*Eddy current correction*”, como mostrado na figura 3.
- b) Campo ***Diffusion weighted data***: seleciona o arquivo DTI (“data.nii.gz”).
- c) Campo ***Corrected output data***: automaticamente, o FSL selecionará a mesma pasta e nomeará o arquivo pra “nodif_data”.
- d) Campo ***Reference volume***: por padrão, é sempre 0. Confirme se a primeira aquisição é um volume B0 (imagem não sensibilizada por gradientes de difusão) e se está de boa qualidade para servir como referência.

Figura 3. Eddy current correction

- e) Para rodar diretamente no terminal: **eddy_correct** input nodif_brain 0
- f) Visualize a imagem “nodif_data” (pós-correção) no FSLVIEW para comparação.

9) Rotação dos bvecs – Passo opcional

- a) O pipeline tradicional do FSL não prevê a rotação dos bvecs após a correção de movimento. Porém, este é um procedimento geralmente recomendado pelos pesquisadores da área (artigo Leemans & Jones, 2009: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mrm.21890/abstract>). Nas versões mais recentes do FSL, o comando necessário já se encontra disponível. Uso:

fdt_rotate_bvecs original_bvecs bvecs_rotacionados ecc_logfile

Obs1: arquivo ecc_logfile foi criado na etapa do Eddy Current.

Obs2: Este passo é dispensável se for realizar o TOPUP acompanhado pelo EDDY (versão nova do Eddy Current correction), pois já será realizada a rotação automaticamente.

Ref:

10) Quantificação dos movimentos – Passo opcional

- a) É possível usar os arquivos “.ecclog” de output da etapa 8 em scripts para gerar dados de quantificação do movimento de cabeça. Pode-se baixar o script (ec_plot.sh) aqui: <https://www.jiscmail.ac.uk/cgi-bin/webadmin?A2=fsl;e2a42b99.1101>, publicado no fórum e desenvolvido pelo próprio Mark Jenkinson do FSL.
- b) Dê permissão de escrita para o script no terminal por meio de **chmod +x** ./ec_plot.sh (pode ser necessário digitar, antes: “sudo bash” e digitar a senha de

administrador).

- c) Coloque o script dentro da pasta “\$FSLDIR/bin/”, assim estará disponível de qualquer lugar, bastando chamar de dentro da pasta do sujeito, no terminal:

./ec_plot.sh

- d) Para rodar este comando para um grupo de sujeitos, usaremos o script da Do Tromp, disponível no site: <http://www.diffusion-imaging.com/2015/11/a-guide-to-quantifying-head-motion-in.html>:

```
echo ~~~Export displacement, rotation and translation for each subject~~~
```

```
for i in `ls *.ecclog`
```

```
do
```

```
prefix=`echo $i | awk 'BEGIN{FS="."}{print $1}'`
```

```
ec_plot.sh ${i}
```

```
mv ec_disp.txt ${prefix}_ec_disp.txt
```

```
mv ec_disp.png ${prefix}_ec_disp.png
```

```
mv ec_rot.txt ${prefix}_ec_rot.txt
```

```
mv ec_rot.png ${prefix}_ec_rot.png
```

```
mv ec_trans.txt ${prefix}_ec_trans.txt
```

```
mv ec_trans.png ${prefix}_ec_trans.png
```

```
done
```

- e) Cole em um bloco de notas e salve com o nome de sua preferência, por ex. “group_head_motion.sh”. Será necessário dar permissão de escrita (passo 10a) e sugerimos, também, colocar este script na pasta “\$FSLDIR/bin/”.
- f) Junte todos os arquivos “.ecclogs” de cada sujeito, com seus respectivos nomes, dentro de uma pasta única e chame no terminal, dentro desta pasta, pelo script criado, por ex.:

./group_head_motion.sh

- g) A Do Tromp também disponibiliza código que calcula a distância euclidiana das rotações de cabeça para todos os sujeitos:

```
Echo ~~~Extract absolute translation average (mm) and euclidian distance~~~
```

```
for i in `ls *_ec_trans.txt`;
```

```
do
```

```
prefix=`echo $i | awk 'BEGIN{FS="."}{print $1}'`
```

```
count=`cat $i | wc |awk '{ print $1}'`
```

```
#Translation for x
```

```
x_total=`cat $i |tr -d - |awk '{s+= $1} END {print s}'`
```

```
x_average=`echo "scale=4; $x_total / $count" | bc`
```

```
#Translation for y
```



```

y_total=`cat $i |tr -d - |awk '{s+=$2} END {print s}'`
y_average=`echo "scale=4; $y_total / $count" | bc`
#Translation for z
z_total=`cat $i |tr -d - |awk '{s+=$3} END {print s}'`
z_average=`echo "scale=4; $z_total / $count" | bc`
#euclidian distance
euclidian=$(echo "scale=4;sqrt(($x_average*$x_average)+($y_average*$y_average)+($z_average*$z_average))" | bc)

echo ${prefix}, ${x_average}, ${y_average}, ${z_average}, ${euclidian} >> movement_data.txt
echo ${prefix}, ${x_average}, ${y_average}, ${z_average}, ${euclidian}

done

```

- h) Para rodá-lo, basta seguir os mesmos passos (10d-e). Será gerado um *output* chamado “movement_data.txt”. É interessante que estes dados sejam comparados em nível de grupo, de forma a identificar se há alguma diferença significativa na movimentação de cabeça. Também é importante detectar se há algum sujeito *outlier* (que se movimentou muito mais do que a média).

11) Correção TOP UP - Passo opcional

As etapas, aqui descritas, foram baseadas no *user guide* oficial do FSL (<http://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fslcourse/lectures/practicals/fdt1/index.html>) e também nas explicações mais detalhadas do site: <https://lcn1.uoregon.edu/kb-articles/preprocessing-of-diffusion-data-with-multiple-phase-encoding-directions>. Esta correção é altamente recomendada, porém opcional e, como pré-requisito, faz-se necessária a aquisição de 2 ou mais *datasets* (ou pelo menos de um volume b0 extra) em que os gradientes tenham polaridades invertidas (ântero-posterior - AP e pósterio-anterior-PA), de forma que distorções induzidas por suscetibilidade sejam melhor corrigidas. **Obs.: Se for realizar esta etapa, desconsiderar o passo anterior (etapa 8, *Eddy Current Correction*).**

- a) **Extrair o b0 de ambas as seqüências (AP e PA):**

```
fsfroi AP_DTI.nii b0_AP 0 1
```

```
fsfroi PA_DTI.nii b0_PA 0 1
```

Obs.: Se tiver mais de um b0 por *dataset*, pode optar por extrair todos os b0s e fazer um *average*, se quiser, com o comando *fsfmerge*.

b) **Juntar os B0 da sequência AP e PA em um único arquivo:**

```
fslmerge -t AP_PA_b0 b0_AP.nii b0_PA.nii
```

Atenção: No comando acima, o output vem na frente do nome dos arquivos que se deseja fazer o “merge”.

c) **Criar arquivo de texto chamado “acqparams.txt”:**

- i) As duas primeiras colunas dirão se a aquisição foi AP (0 -1) ou PA (0 1), a terceira por padrão é sempre 0.
- ii) Para cálculo da quarta coluna, usaremos a fórmula abaixo. O valor da última coluna (C4) é baseado no parâmetro de *echo spacing* (no caso desta aquisição, 0.57) e de EPI fator (128). Sempre consultar o protocolo de aquisição.

Ref.: https://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslwiki/topup/Faq#How_do_I_know_what_phase_encode_vectors_to_put_into_my_--datain_text_file.3F. Dica: a informação do “echo spacing” geralmente está na “Sequence” tab do scanner da Siemens (às vezes referido como “dwell time”). Total da formula: 0.07296, que irá na última coluna.

$$C_4 = 1 \times 10^{-3} S_E F_{EPI}$$

S_E : echo spacing (ms)

F_{EPI} : the EPI factor.

Arquivo final “acqparams.txt” (basta salvar em um editor de texto qualquer):

```
0 -1 0 0.07296
```

```
0 1 0 0.07296
```

- iii) Aplica o TOPUP propriamente dito e visualiza o “my_unwarped_images” que será gerado:

topup --imain=AP_PA_b0.nii --datain=acqparams --config=b02b0.cnf

--out=topup_AP_PA_b0 --fout=my_field --iout=my_unwarped_images

Obs.: o argumento “--config” é sempre b02b0.cnf que é um arquivo padrão do FSL e contém as configurações ideais pra este tipo de comando.

iv) Agora, pode-se optar por um dos seguintes caminhos, a depender do tipo de aquisição:

(1) Usar o “my_unwarped_images” que foi gerado no passo anterior e seguir as demais etapas do FDT.

(2) Fazer o *applytopup* para aplicar a correção do b0 em toda a sequência de DTI:

applytopup --imain=AP_DTI,PA_DTI --inindex=1,2 --datain=acqparams --topup=topup_AP_PA_b0 --out=my_hifi_images

Obs.: No “--inindex=1,2” o index 1 especifica que o primeiro arquivo “AP_DTI” deve usar a primeira linha do arquivo “acqparams.txt” e assim por diante. Esta segunda opção só irá funcionar se os arquivos “AP_DTI” e “PA_DTI” possuírem as mesmas dimensões (conferir com ferramenta **fslsize** no terminal). Em nosso caso, como o “PA_DTI” só tem um volume (1 b0), teríamos que deixar o argumento **--imain=AP_DTI**, de forma a aplicar a correção apenas nesta sequência. Só que, neste caso, é necessário usar o argumento **method=jac** (exemplo abaixo):

applytopup --imain=AP_DTI --inindex=1 --datain=acqparams --topup=topup_AP_PA_b0 --method=jac --out=my_hifi_images

Em resumo: só usar o ApplyTOPUP se tiver duas sequências inteiras com polaridades opostas. Vide discussão no fórum: <https://www.jiscmail.ac.uk/cgi-bin/webadmin?A2=ind1212&L=fsl&D=0&P=297009> e <https://www.jiscmail.ac.uk/cgi-bin/webadmin?A2=fsl;c9ea14c7.1306>

(a) **Para a correção EDDY:**

1. Precisaremos de um b0 de alta resolução (extrair do my_hifi_images.nii.gz, *output* do ApplyTOPUP):

```
fslroi my_hifi_images.nii.gz hifi_nodif 0 1
```

2. Fazer extração da calota craniana (BET) no hifi_nodif:

```
bet hifi_nodif hifi_nodif_brain -m -f 0.2
```

3. Criar arquivo de texto “index.txt”, conforme N=fslsize (aqui, 69 dimensões). Para facilitar, use o script:

```
indx=""

for ((i=0; i<69; ++i));

do indx="$indx 1";

done

echo $indx > index.txt
```

4. Agora o EDDY propriamente dito:

```
eddy --imain=my_hifi_images.nii.gz --  
mask=hifi_nodif_brain_mask --index=index.txt --acqp=acqparams  
--bvecs=AP_bvecs --bvals=AP_bvals --fhwm=0 --  
topup=topup_AP_PA_b0 --flm=quadratic --  
out=eddy_unwarped_images
```

Obs.: O *output* “eddy_unwarped_images” estará pronto para rodar no DTIFIT.

12) Extração da calota craniana com BET

- a) Campo **Input image**: nodif_data.nii (*dataset* já corrigido pra *eddy current*).
- b) Campo **Output image**: será gerado automaticamente um b0 sem calota com final “_brain.nii”.
- c) No campo em verde, na figura 4, recomendamos selecionar “**Robust brain**”

center estimation", ligeiramente mais demorada, mas que estima melhor a porção de calota.

- d) Selecionar em *Advanced Options* a opção "**Output binary brain mask image**" para a criação do brain_mask.nii (máscara da calota craniana).
- e) O default é o *threshold* de 0.5. Repita esta etapa com diferentes limiares para avaliação. Recomenda-se fixar um *threshold* único para todos os sujeitos.
- f) Sempre procuramos o melhor ajuste, mas não é preciso se preocupar se a imagem final ficar com um pequeno "halo" de calota craniana, pois este excesso pode ser filtrado em etapas posteriores.
- g) Selecionado a opção "**Output brain surface overlaid onto original image**", será criada uma terceira imagem (volume B0 original com máscara da calota sobreposta) para conferência do ajuste do *threshold* no FSLVIEW.
- h) Se preferir rodar todos os passos acima via terminal, o comando é:
bet brain.nii nodif_brain.nii **-R -f** 0.3 -g 0 -o -m

Argumentos:

-m cria a máscara binária

-f *threshold*

-o gera a superfície da calota sobreposta à imagem original.

-g gradiente vertical; default=0; valores positivos geram um *outline* do cérebro maior na parte de baixo e menor em cima. Pode-se modificar.

-R método robusto

Figura 4. Extração de calota craniana com BET

13) Estimativa dos tensores com DTIFIT

Figura 5. Estimativa dos tensores no DTIFIT

- Pode-se apenas seleccionar a pasta (neste caso, os arquivos deverão estar, necessariamente, nomeados como na figura 5 para detecção automática) ou especificar manualmente os arquivos.
- Campo **Diffusion weighted data**: seus dados DTI após correção *Eddy Current*.
- Campo **BET binary brain mask**: máscara da calota craniana criada a partir do volume b0 na etapa BET.
- Campo **Output basename**: prefixo que se quiser dar para os tensores.
- Campo **Gradient directions**: arquivo bvecs.
- Campo **b values**: arquivo bvals.
- Selecionar, obrigatoriamente, em *Advanced options* a opção “**Save tensor**”.
- Recomenda-se aplicar a regressão “*Weighted Least-squares*” no lugar do *default* (regressão linear), para uma melhor estimativa do tensor.
- Também pode-se aplicar o “*Save Sum-squared Error*”, útil para detectar artefactos e erros na estimativa dos tensores.
- Apertar Go.
- Se quiser rodar direto no terminal: **dtifit --data=data --out=dti --**

mask=nodif_brain_mask --bvecs=bvecs -- bvals=bvals

k) Verifique os *outputs* gerados:

<basename>_V1 – 1º eigenvector/autovetor (direção de difusão mais longa)

<basename>_V2 – 2º eigenvector

<basename>_V3 – 3º eigenvector

<basename>_L1 – 1º eigenvalue

<basename>_L2 – 2º eigenvalue

<basename>_L3 – 3º eigenvalue

<basename>_MD - mean diffusivity (difusividade média, MD)

<basename>_FA - fractional anisotropy (anisotropia fracionada, FA).

<basename>_MO – modo da anisotropia (“Trace” ou Difusividade Total, *oblate* ~ -1; *isotropic* ~ 0; *prolate* ~ 1)

<basename>_S0 - sinal de T2 sem difusão.

14) Visualizando o mapa FA - FSLVIEW

- Abrir o FSLVIEW no menu gráfico do FSL ou chamar direto no terminal (digitar `fslview`) e ir em File/Add, escolher `dti_FA` (mapa FA), para olharmos os valores de FA em cada voxel.
- Abrir, sobreposto, o arquivo `dti_V1` (mapa com o primeiro eigenvector, ou seja, a direção principal de cada voxel).
- Uma vez selecionado o `dti_V1`, vá no ícone “i” (em azul, destacado na Figura 6) e, na janela “Overlay Information Dialog” configure o **Image type** como *Diffusion tensor* e **Display as:** *Lines*. Dê zoom e verifique se as direções dos estão biologicamente plausíveis.

- Para ver os mesmos dados por meio da codificação de cores (vermelho: esquerda-direita, azul: dorso-ventral e verde: antero-posterior), mude a opção **“Display as”** para RGB e **“Modulation”** para `dti_FA`. Verifique as cores. Dica: olhe o corpo caloso e o trato corticoespinhal.

Figura 6. Checando o mapa de anisotropia fracionada no FSLVIEW. Adaptado de pág. 12, Dartmouth College, DTI ANALYSIS GUIDE (<http://dbic.dartmouth.edu/dti/DTIGuide.pdf>)

15) Conferindo a qualidade (*Sanity Check*):

- a) Usamos **fslmaths** para chegar eigenvalues negativos que podem indicar problemas no pré-processamento ou baixo *signal-to-noise* (SNR). Um halo de valores altos (brilhoso) ao redor do cérebro é comum e não deve preocupar (é sinal de problemas no registro). Porém, muitos valores negativos dentro da região cerebral são problemáticos. Para conferir se há valores negativos, digite no terminal para cada autovalor (eigenvalue), aqui estamos fazendo para L3:

fslmaths dti_L3 -thr 0 dti_L3_thresholded (deixa só valores acima de 0).

fslmaths dti_L3_thresholded -sub dti_L3 dti_L3neg

- b) Para checar se tem FA > 1 (implausível):

fslmaths dti_FA -thr 0 -uthr 1 normFA (deixa só valores entre 0 e 1).

fslmaths dti_FA -sub normFA highlowFA

16) Estimando *crossing fibers* – BEDPOSTX

- a) Este é o comando mais simples, porém dos mais demorados (em média, 15 horas por sujeito). No menu do FDT no FSL, escolhemos a opção “BEDPOSTX” e selecionamos a pasta individual onde estão os arquivos de DTI já processados (requer arquivo data, nodif_brain_mask – BET e bvecs). Aperte Go.

- b) O *output* será uma pasta chamada “DTI.bedpost”.

Figura 7. BEDPOSTX

- c) Esta etapa é necessária para rodar o PROBTRACKX, pois calcula o número de fibras de passagem (*crossing fibers*) por voxel, usando estimativa bayesiana.

17) Registro do DTI em T1

- a) As imagens de DTI precisam ser registradas em uma imagem estrutural de alta resolução (T1) e a *um template (standard space)*. Este registro requer que a imagem T1 tenha passado pela etapa de BET para retirar a calota craniana (vide passo 12).
- b) No FDT, vá ao menu **Registration** (Figura 8).
- c) No campo **Main structural image:** arquivo T1_sujeito_brain.nii.
- d) Não precisa alterar nada no campo **Standard Space**.

Figura 8. Etapa de registro da imagem de difusão na estrutural e sua normalização

18) Tractografia probabilística com PROBTRACKX

- a) No menu do FDT, selecione PROBTRACX (Figura 9).
- b) Selecione o diretório criado na etapa BEDPOSTX (.bedpostX).
- c) A configuração dependerá do trato de interesse. Aqui, queremos como ROI o trato corticoespinal. Todas as máscaras aqui utilizadas foram obtidas por meio do FSLVIEW (veja tutorial do Andrew Jahn: <https://youtu.be/flu4tUjRfUE>).
- d) Campo **Seed Space**: opção Single mask.
- e) Selecione "Seed space is not diffusion".
- f) Campo **Seed Image/Surface**: máscara do trato corticoespinal
- g) Campo **Optional targets**: como *exclusion mask* usamos a máscara do corpo caloso (para que o trato gerado seja ipsilateral).
- h) Campo **Output directory**: pode deixar o mesmo diretório ou criar um novo.

Figura 9. Etapa PROBTRACKX. À direita, exemplo de tractografia do trato corticoespinhal

19) Tract Based Spatial Statistics – TBSS

- a) Trata-se de uma análise *voxel-based* de comparação entre grupos. A sua vantagem é de minimizar o problema de alinhamento causado pelo corregristo entre sujeitos, ao optar por comparações do centro de tratos (via esqueletonização). Veja, abaixo, resumo de cada etapa de seu processamento:

Análise TBSS

Tract-based spatial statistics

Apesar do nome (tract-base), é um tipo de processamento VBA (Voxel-based analysis)

Fonte: Adaptado de Schwarz CG, Reid RI, Gunter JL, Senjem ML, Przybelski AS, Zuk SM, et al. Improved DTI registration allows voxel-based analysis that outperforms Tract-Based Spatial Statistics. *NeuroImage*. 2014;94:65-78. Fig. 1.Steps of original FSL TBSS Pipeline, with example images; Fig. 4.Flowchart of steps in synthetic sensitivity analysis, where control subjects are compared to copies of themselves with FA synthetically reduced in a set of chosen ROIs, in order to quantify how well each method is able to detect these known change locations.

Figura 10. Passo-a-passo do TBSS

- i) Construa uma pasta com os mapas de FA de todos os sujeitos do estudo (pacientes e controles) e inicie o processamento do TBSS, no terminal, com **tbss_1_preproc *.***
- ii) Visualize o arquivo gerado "index.html" e faça uma checagem de controle de qualidade e, se necessário, exclua sujeitos e repita.
- iii) Decida se irá registrar os sujeitos em um *template* padrão (como o MNI, -T, tempo: 15xn), fazer o registro sujeito-a-sujeito (-n, bem demorado: 5xnxn) ou usando um *template* de sua escolha (-t). Digite:
tbss_2_reg argumento (-n,-T,-t)
- iv) Próxima **etapa** dependerá de como foi feito o registro (-T para MNI ou -S para indivíduos do estudo): **tbss_3_postreg (-S ou -T)**
- v) Escolha o *threshold* de FA (padrão é 0.2): **tbss_4_prestats 0.2** (ideal é testar diferentes limiares e visualizar o esqueleto médio: **fslview all_FA -b 0,0.8 mean_FA_skeleton -b 0.2,0.8 -l Green**).
- vi) **RANDOMISE**: etapa de teste de permutação para comparação entre grupos. Pode-se configurar de diversas maneiras. Aqui, adotamos a correção para múltiplas comparações (p-corrigido) e a opção TFCE (*Threshold-free cluster enhancement*) que, ao considerar clusters, aumenta o poder de detecção de

diferenças. Para rodar o teste estatístico, precisamos criar um design do nosso modelo.

(1) Criando GLM design:

- (a) Entra no **GLM SETUP** dentro do menu **MISC** do FSL, muda opção pra **Higher Level design** e coloca quantidade de sujeitos no **inputs**.
- (b) Clica em **Wizard** e escolhe **two groups, unpaired**. Insere quantidade de controles e clica em **process**.
- (c) Insira as variáveis de interesse ou de controle (por ex.: idade, sexo...).
Dica: para importar, copie os dados de uma tabela e, na janela de importação, aperte botão do meio do mouse para colar.
- (d) Escolhe os contrastes, lembrando que group A é controle e Group B é paciente. Escolha só dois 2 contrastes.
- (e) Salvar o *design* dentro da pasta *stats*, gerando arquivos design.mat e design.con.

(2) Rodando o Randomise:

```
randomise -i all_FA_skeletonised -o tbss -m mean_FA_skeleton_mask -  
d design.mat -t design.con -n 500 --T2  
Obs.: O “-T2” especifica que será adotado o TFCE.
```

20) TBSS para não_FA

- a) Copie arquivos FA, L1, L2, L3 e MD para pastas distintas, dentro de cada pasta de sujeito.
- b) Esta separação cuidadosa é necessária porque todos os arquivos “não_FA” precisarão ser renomeados para “sujeito_dti_FA.nii.gz”. Aqui, utilizamos script próprio chamado “Rename.sh” para auxiliar a renomear. Uso: ***.rename.sh "from" "to" "*.gz"***
 - i) Em particular, pro RD, faz-se necessário calcular a média $(L2+L3/2)$ via *fslmaths*. Para tal, usamos script próprio (***.average_images.sh***).
- c) Agora, basta rodar o comando **tbss_non_FA** no terminal.

21) Visualizando resultados:

- a) Lembre-se que os valores-p corrigidos para múltipla comparação terão final “corr” e que o FSLVIEW apresenta como 1-P (significativo se maior que 0.95).

O comando abaixo irá abrir um standard (MNI152_T1) e apresentar o contraste (controle > paciente, tstat2 em verde e paciente>controle, tstat1, em azul). Digite no terminal:

```
fslview $FSLDIR/data/standard/MNI152_T1_1mm mean_FA_skeleton -l  
Green -b 0.2,0.7 tbss_tfce_corr_tstat2 -l Red-Yellow -b 0.95,1  
tbss_tfce_corr_tstat1 -l Blue-Lightblue -b 0.95,1
```

- b) Para destacar resultados significativos, podemos usar o seguinte comando para gerar uma nova imagem com diferenças “mais grossas” (preenchidas):

```
tbss_fill tbss_tfce_corr_tstat1 0.94 mean_FA_skeleton  
tbss_tfce_corr_tstat1_filled
```

- c) Para pedir informação de coordenada dos clusters significativos:

```
cluster -i tbss_tfce_corr_tstat1 -t 0.95 --mm >  
cluster_tfce_tstat1_95.output
```

- d) Para pedir informação da região anatômica (label) dos voxels significativos, podemos usar o comando **atlasquery**, definindo o atlas de interesse, tal como os exemplos abaixo. Resultado será mostrado diretamente no terminal.

```
atlasquery -a "MNI Structural Atlas" -m "bss_tfce_corr_tstat1"  
atlasquery -a "JHU ICBM-DTI-81 White-Matter Labels" -m  
"tbss_tfce_corr_tstat1"  
atlasquery -a "JHU White-Matter Tractography Atlas" -m  
"tbss_tfce_corr_tstat1"
```

22) Tractografia

O AutoPtx é uma ferramenta que permite executar a tractografia probabilística do FSL (Protrackx) no espaço sujeito-nativo com scripts fáceis de usar e protocolos (máscaras *seed*, *target*, *stop* e de exclusão) pré-definidos para uma variedade de tratamentos.

O AutoPtx requer uma versão funcional do FSL e foi testado no Linux e Mac. Os protocolos (ou seja, *seed*, *target*, *exclusion* e *stop* masks) são definidos com a robustez em mente e foram mostrados para trabalhar com uma ampla gama de qualidades de dados. O AutoPtx tem sido utilizado com sucesso em coortes de base populacional (por exemplo, Rotterdam Scan Study, UK Biobank Imaging

Study).

23) Passo-a-passo pra rodar o AutoPTX:

Dentro da pasta AutoPtx, existe na subpasta "protocols" um protocolo de reconstrução para os seguintes tratos:

1) Dentro da pasta AutoPtx (onde estão os *scripts* originais), colocar cada sujeito em pasta própria contendo os seguintes arquivos (nomeados exatamente assim): data.nii.gz, bvec e bval

2) No terminal, dentro da pasta AutoPtx, dar permissão para cada *script* com o comando `chmod +x ./nomedascript.sh`

3) Ainda no terminal, dentro da pasta AutoPtx, chamar o primeiro *script* (irá rodar o DTIFIT e BedpostX) com o comando:
`./autoPtx_1_preproc */data.nii.gz`

4) Em seguida, chamar o segundo *script* (responsável por rodar o *probtrack*) com o comando:
`./autoPtx_2_launchTractography *.*`

5) Confira se todos os tratos foram corretamente gerados para cada sujeito. Obs.: é possível editar antecipadamente a lista de tratos de interesse no arquivo "StructureList". O número de tratos impacta diretamente no tempo de processamento.

6) De volta ao terminal, rodar `./autoPtx_prepareForDisplay_other_metrics` (script adaptado do original "autoPtx_prepareForDisplay" para incluir as outras métricas além de FA). Este *script* exige que você informe o *threshold* (por padrão 0.05) para "afinar" os tratos (que serão salvos numa nova pasta criada automaticamente e chamada de *visualise*) e faz o *upsampling* de todas as métricas (coloca-as na pasta Measurements)

6) No terminal, dentro da pasta Measurements, criar os arquivos RD, com o *script* próprio `./average_images.sh` (conceder permissão, se precisar, via *chmod*)

7) Criar nova pasta, manualmente, dentro da AutoPTx (raíz), aqui dei nome de "Tratos_normalizados" e colar nesta as pastas que estão dentro da "visualise", ou seja, os tratos gerados e já thresholded. Colar também os *scripts* próprios (after_autoPtx e normalize_tracts) e arquivo chamado *list* (que contém o nome de todos os tratos criados, em ordem)

8) Precisa agora mover os dados da pasta Measurements (mapas *upsampled*, mas que ainda estão no espaço do sujeito) para as respectivas pastas dos sujeitos de "Tratos_normalizados". Para isso, dentro da pasta Measurements, no terminal, rodar o script `./move_natives.sh`

9) Dentro da pasta "Tratos_normalizados", rodar primeiro o `./after_autoPTX_FA` que irá fazer o registro do mapa FA no MNI, criando o FA2STD.nii e o *nonlinear transf* (o

mesmo usado para registrar demais mapas). Ao concluir, rodar os demais
./after_autoPTX_AD,MD,RD

10) Por fim, rode o ./normaliza_tratos que irá registrar os tratos no espaço MNI de cada
sujeito e gerar um arquivo txt com valores pra todas as métricas.

Figura 11. Tratos com protocolos pré-definidos para reconstrução via tractografia pela ferramenta AUTOPTX.

Tratos do tronco encefálico:

Pedúnculo cerebelar médio (MCP, *middle cerebellar peduncle*)

Lemnisco medial (ML, *medial lemniscus*)

Fibras de projeção

Trato corticoespinhal (CST, *corticospinal tract*)

Radiação acústica (AR, *acoustic radiation*) X

Radiação talâmica anterior (ATR, *anterior thalamic radiation*)

Radiação talâmica superior (STR, *superior thalamic radiation*)

Radiação talâmica posterior (PTR, *posterior thalamic radiation*)

Fibras de associação

Fascículo longitudinal superior (SLF, *superior longitudinal fasciculus*)

Fascículo longitudinal inferior (ILF, *inferior longitudinal fasciculus*)

Fascículo fronto-occipital inferior (IFO, inferior fronto-occipital *fasciculus*)

Fascículo uncinado (UNC, *uncinate fasciculus*)

Fibras do sistema límbico

Giro cingulado (parte do giro do cíngulo) (CGC, *cingulate gyrus part of cingulum*)

Parte parahipocampal do cíngulo (CGH, *parahippocampal part of cingulum*)

Fibras do corpo caloso

Forceps maior (FMA, *forceps major*)

Forceps menor (FMI, *forceps minor*)

24) Script adaptado para extração das métricas complementares

`“./autoPtx_prepareForDisplay_other_metrics”`

```
Usage() {  
cat << EOF
```

```
Usage: autoPtx_prepareForDisplay <threshold>
```

```
For all subjects, generates binary masks for each structure, and  
prepares a call to display the tracts in FSLView.
```

```
<threshold> is used to binarise the normalised tract density  
images. As a  
first test try e.g. 0.005.
```

```
EOF  
    exit 1  
}
```

```
[ "$1" = "" ] && Usage
```

```
thresh=$1
```

```
# init  
prewd=$PWD  
execPath=`dirname $0`  
cd $execPath  
execPath=$PWD  
cd $prewd
```

```
tractSrc=tracts  
data=preproc  
structures=$execPath/structureList  
subjects=preproc/subjectList
```

```
# function based on fsledithd script  
setIntentCode() {  
    tmpbase=`${FSLDIR}/bin/tmpnam`;
```

```

tmpbase2=`${FSLDIR}/bin/tmpnam`;

# generate the xml-style header with fslhd
${FSLDIR}/bin/fslhd -x $1 | grep -v '/>' | grep -v 'intent_code' |
grep -v '_filename' | grep -v '^[^t]_name' | grep -v 'nvox' | grep -v
'to_ijk' | grep -v 'form_.*orientation' | grep -v 'qto_' > ${tmpbase}
# exit if the above didn't generate a decent file
if [ `cat ${tmpbase} | wc -l` -le 1 ] ; then
echo "==ERROR== Header not recognized. Exiting..."
exit 0;
fi

# append intent_code to header
echo "  intent_code = \"$2\" \" \" >> ${tmpbase}
# close the xml-style part
echo ">" >> ${tmpbase}

cat ${tmpbase} | grep -v '^[^ ]*#' | grep -v '^[^ ]*$' >
${tmpbase2}
${FSLDIR}/bin/fslcreatehd ${tmpbase2} $1

\rm -f ${tmpbase} ${tmpbase2}
}

```

```

echo "#!/bin/bash" > $command
chmod +x $command
while read sub; do
  mkdir -p measurements/$sub
  for im in MD L1 L2 L3; do
    $FSLDIR/bin/applywarp --in=preproc/$sub/dti_${im} --
out=measurements/$sub/dti_${im} --ref=preproc/$sub/refVol --
premat=$FSLDIR/etc/flirtsch/ident.mat
    $FSLDIR/bin/fslmaths preproc/$sub/dti_${im} -mul 1000 -range
preproc/$sub/dti_${im}
  done
done < preproc/subjectList

```

Apêndice 3. Tabela suplementar 1 - Valores médios de anisotropia fracionada, difusividade axial, difusividade média e difusividade radial extraídos de todas as regiões de interesse em indivíduos com SPI_{tot} em comparação com os controles

		CONTROLES		SPI _{tot}		Variação	valor-p	valor-p	D de
		Média ± DP		Média ± DP		percentual		corrigido	Cohen
FA									
Pedúnculo cerebral	0,601	0,017	0,600	0,023	-0,17%	0,70	>1,00	-0,05	
Coroa radiada posterior	0,432	0,025	0,422	0,020	-2,22%	0,03	0,18	-0,42	
Radiação talâmica posterior	0,519	0,024	0,516	0,025	-0,50%	0,74	>1,00	-0,11	
Pedúnculo cerebelar superior	0,512	0,022	0,511	0,024	-0,33%	0,09	0,54	-0,07	
Pedúnculo cerebelar médio	0,454	0,013	0,453	0,014	-0,27%	0,73	>1,00	-0,09	
Pedúnculo cerebelar inferior	0,448	0,023	0,444	0,022	-0,89%	0,20	>1,00	-0,17	
AD (m ² /s)									
Pedúnculo cerebral	1,50E-03	4,29E-05	1,51E-03	5,51E-05	0,79%	0,60	>1,00	0,24	
Coroa radiada posterior	1,19E-03	3,10E-05	1,18E-03	3,61E-05	-1,20%	0,08	0,48	-0,42	
Radiação talâmica posterior	1,33E-03	4,55E-05	1,31E-03	4,65E-05	-1,56%	0,50	>1,00	-0,44	
Pedúnculo cerebelar superior	1,80E-03	8,98E-05	1,86E-03	9,02E-05	2,82%	0,11	0,66	0,58	
Pedúnculo cerebelar médio	1,25E-03	3,83E-05	1,26E-03	4,73E-05	1,01%	0,14	0,84	0,30	
Pedúnculo cerebelar inferior	1,21E-03	2,85E-05	1,22E-03	4,22E-05	0,68%	0,88	>1,00	0,23	
MD (m2/s)									
Pedúnculo cerebral	8,51E-04	2,24E-05	8,58E-04	3,46E-05	0,82%	0,70	>1,00	0,24	
Coroa radiada posterior	7,99E-04	2,71E-05	7,95E-04	3,28E-05	-0,50%	0,03	0,18	-0,13	

continua...

...continuação

Radiação talâmica posterior	8,10E-04	3,34E-05	8,01E-04	3,07E-05	-1,15%	0,74	>1,00	-0,29
Pedúnculo cerebelar superior	1,15E-03	6,76E-05	1,19E-03	8,08E-05	3,42%	0,09	0,54	0,54
Pedúnculo cerebelar médio	8,24E-04	3,00E-05	8,34E-04	3,09E-05	1,11%	0,73	>1,00	0,30
Pedúnculo cerebelar inferior	7,94E-04	2,08E-05	8,04E-04	3,63E-05	1,23%	0,20	>1,00	0,33
RD (m ² /s)								
Pedúnculo cerebral	5,27E-04	2,31E-05	5,31E-04	3,47E-05	0,89%	0,54	>1,00	0,16
Coroa radiada posterior	6,02E-04	3,38E-05	6,03E-04	3,49E-05	0,19%	0,65	>1,00	0,03
Radiação talâmica posterior	5,50E-04	3,43E-05	5,47E-04	3,32E-05	-0,62%	0,87	>1,00	-0,10
Pedúnculo cerebelar superior	8,17E-04	6,20E-05	8,51E-04	8,03E-05	4,06%	0,03	0,18	0,48
Pedúnculo cerebelar médio	6,14E-04	2,81E-05	6,21E-04	2,64E-05	1,23%	0,21	>1,00	0,28
Pedúnculo cerebelar inferior	5,85E-04	2,64E-05	5,96E-04	3,90E-05	1,82%	0,20	>1,00	0,33

GLM foi usado para comparar as médias de FA, AD, MD e RD entre os grupos, com idade e sexo como covariáveis de controle. Valor-p refere-se ao teste bicaudal. Os valores percentuais de variação estão em relação aos sujeitos com SPI em comparação aos controles. SPI: síndrome das pernas inquietas / Doença de Willis-Ekbom; GLM: modelo linear geral; DP: desvio-padrão; FA: anisotropia fracionada; AD: difusividade axial; MD: difusividade média; RD: difusividade radial; ROI: região de interesse; SPI_{tot}: grupo composto por todos os portadores de SPI, independentemente da gravidade dos sintomas.

Apêndice 4. Tabela suplementar 2 - Valores médios de anisotropia fracionada, difusividade axial, difusividade média e difusividade radial extraídos de todos os Tratos de Interesse no grupo de portadores de SPI_{tot} em comparação com os controles

	CONTROLES		SPI _{tot}		Varição percentual (%)	Valor-p	Valor-p corrigido	D de Cohen
	Média ± DP		Média ± DP					
FA								
Trato corticoespinal	0,497	0,016	0,503	0,026	1,09	0,71	>1,00	0,26
Radiação talâmica posterior	0,441	0,019	0,440	0,019	-0,40	0,86	>1,00	-0,09
AD(m ² /s)								
Trato corticoespinal	1,21E-03	3,09E-05	1,21E-03	3,01E-05	-0,25	0,22	0,44	-0,10
Radiação talâmica posterior	1,26E-03	4,66E-05	1,25E-03	4,39E-05	-0,88	0,78	>1,00	-0,24
MD(m ² /s)								
Trato corticoespinal	7,59E-04	2,25E-05	7,51E-04	2,86E-05	-1,07	0,26	0,52	-0,31
Radiação talâmica posterior	8,30E-04	3,23E-05	8,24E-04	2,91E-05	-0,73	0,55	>1,00	-0,20
RD(m ² /s)								
Trato corticoespinal	5,35E-04	2,45E-05	5,24E-04	3,43E-05	-2,01	0,22	0,44	-0,35
Radiação talâmica posterior	6,16E-04	3,03E-05	6,12E-04	2,89E-05	-0,58	0,78	>1,00	-0,12

GLM foi usado para comparar as médias de FA, AD, MD e RD entre os grupos, com idade e sexo como covariáveis de controle; Valor-p refere-se ao teste bicaudal. Os valores percentuais de variação estão em relação aos sujeitos com SPI em comparação aos controles.; SPI: síndrome das pernas inquietas / Doença de Willis-Ekbom; GLM: modelo linear geral; DP: desvio-padrão; FA: anisotropia fracionada; AD: difusividade axial; MD: difusividade média; RD: difusividade radial; ROI: região de interesse; SPI_{tot}: grupo composto por todos os portadores de SPI, independentemente da gravidade dos sintomas.