

Elisa Viladés Palomar

Evaluación electrofisiologica y  
neuro-ofthalmológica con tecnologia  
de última generación en pacientes  
con esclerosis múltiple

Director/es

Garcia Martin, Elena  
Pablo Julvez, Luis Emilio

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

**EVALUACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA Y NEURO-  
OFTALMOLÓGICA CON TECNOLOGÍA DE ÚLTIMA  
GENERACIÓN EN PACIENTES CON ESCLEROSIS  
MÚLTIPLE**

Autor

**Elisa Viladés Palomar**

Director/es

García Martín, Elena  
Pablo Julvez, Luis Emilio

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
**Escuela de Doctorado**

2021





**Universidad** Zaragoza

# Tesis Doctoral

**EVALUACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA Y NEURO-  
OFTALMOLÓGICA CON TECNOLOGIA DE ÚLTIMA  
GENERACIÓN EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

Autora

**Elisa Viladés Palomar**

Directores

**Elena García Martín**

**Luis Emilio Pablo Júlvez**

Facultad de Medicina

2020



**Universidad de Zaragoza**  
**Facultad de Medicina**  
**Departamento de Cirugía, Obstetricia y Ginecología**  
**Servicio de Oftalmología**

Trabajo de investigación presentado por la Graduada en Óptica y  
Optometría

**Elisa Viladés Palomar**

Para optar al Grado de Doctora

**DIRECTORES**

Dra. Elena García Martín  
Servicio de Oftalmología  
Hospital Universitario Miguel Servet

Dr. Luis Emilio Pablo Júlvez  
Servicio de Oftalmología  
Hospital Universitario Miguel Servet





“El conocimiento es eterno, compártelo, es una forma de conseguir la  
inmortalidad”

Tenzin Gyatso. XIV Dalai Lama



## AGRADECIMIENTOS

A mis padres, faro de inspiración y fuente de sabiduría, estas páginas reflejan el amor que me inculcaron por la historia.

---

A mis abuelos y mis tíos por su contribución en mi formación académica

---

A mi pareja por su comprensión y apoyo incondicional durante este proceso

---

A mi amiga y mentora la Dra. Garcia-Martin, sin la cual esta tesis no habría sido posible.

---

Al Prof. Luis Pablo por la confianza depositada y los recursos facilitados

---

A mis compañeras de equipo la Dra. Satué, Elvira y Beatriz por su apoyo en este proyecto

---

Al departamento de Electrónica del Grupo de Ingeniería Biomédica de la Universidad de Alcalá de Henares por sus aportaciones.

---

Al Grupo de Biomateriales del Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón (I3A) de Universidad de Zaragoza por su colaboración

---

A todos mis compañeros del Servicio de Oftalmología del Hospital Miguel Servet por todos los conocimientos que me han transmitido

---

A mis amigos por su motivación y apoyo

---

Al Instituto de Salud Carlos III por la financiación de este proyecto (FI16-00055)

---



La presente tesis doctoral ha sido estructurada siguiendo la normativa para las tesis por compendio de publicaciones.

Los artículos incluidos en la tesis pertenecen a la misma línea de investigación y han sido publicados previamente.

A continuación, se detallan los cuatro artículos que constituyen el cuerpo de la tesis:

1. Elisa Viladés, Amaya Pérez-del Palomar, José Cegoñino, Javier Obis, María Satue, Elvira Orduna, Luis Emilio Pablo, Marta Ciprés, Elena Garcia-Martin. **Physiological changes in retinal layers thicknesses measured with swept source optical coherence tomography.** Plos One 2020. In press
2. Carlo Cavaliere, Elisa Vilades, María Concepción Alonso-Rodríguez, María Jesús Rodrigo, Luis Emilio Pablo, Juan Manuel Miguel, Elena López-Guillén, Eva María Sánchez Morla, Luciano Boquete, Elena Garcia-Martin. **Computer-aided diagnosis of multiple sclerosis using a support vector machine and optical coherence tomography features.** Sensors (Basel) 2019;19(23):5323
3. Luciano Boquete, Elena López-Guillén, Elisa Vilades, Juan Manuel Miguel-Jiménez, Luis Emilio Pablo, Luis De Santiago, Miguel Ortiz del Castillo, María Concepción Alonso-Rodríguez, Eva María Sánchez Morla, Almudena López-Dorado, Elena Garcia-Martin. **Diagnostic ability of multifocal electroretinogram in early multiple sclerosis using a new signal analysis method.** PLoS One 2019;14(11): e0224500.
4. Elena Garcia-Martin, Jose Ramón Ara, Jesus Martin, Carmen Almarcegui, Isabel Dolz, Elisa Vilades, Laura Gil-Arribas, Francisco Javier Fernandez, Vicente Polo, Jose Manuel Larrosa, Luis Emilio Pablo, Maria Satue. **Retinal and optic nerve degeneration in patients with multiple sclerosis followed up for 5 years.** Ophthalmology 2017; 124(5):688-696.



D<sup>a</sup>. ELENA GARCIA MARTIN, Doctora en Medicina y Cirugía, facultativo especialista en Oftalmología del Hospital Universitario Miguel Servet, y profesora asociada de la Universidad de Zaragoza.

Certifica:

Que el trabajo de investigación titulado “Evaluación electrofisiológica y neurooftalmológica con tecnología de última generación en pacientes con esclerosis múltiple” que presenta ELISA VILADES PALOMAR Graduada en Óptica y Optometría, para optar al GRADO DE DOCTOR, fue realizado bajo mi dirección, se ajusta al proyecto de tesis presentado con anterioridad y doy mi autorización para su defensa como tesis por compendio de publicaciones.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente en Zaragoza, a 15 de octubre de 2020.

Fdo Dra Elena García-Martín





D<sup>a</sup>. LUIS EMILIO PABLO JULVEZ, Doctor en Medicina y Cirugía, facultativo especialista en Oftalmología y jefe del Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario Miguel Servet, y catedrático de la Universidad de Zaragoza.

Certifica:

Que el trabajo de investigación titulado “Evaluación electrofisiológica y neurooftalmológica con tecnología de última generación en pacientes con esclerosis múltiple” que presenta ELISA VILADES PALOMAR Graduada en Óptica y Optometría, para optar al GRADO DE DOCTOR, fue realizado bajo mi dirección, se ajusta al proyecto de tesis presentado con anterioridad y doy mi autorización para su defensa como tesis por compendio de publicaciones.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente en Zaragoza, a 15 de octubre de 2020.

D. Luis E Pablo Júlvez



# INDICE

<b>1. ABREVIATURAS</b>	<b>1</b>
<b>2. RESUMEN</b>	<b>3</b>
<b>3. RELACIÓN DE PUBLICACIONES QUE COMPONEN LA TESIS</b>	<b>5</b>
<b>4. INTRODUCCION</b>	<b>11</b>
4.1 Retina	12
4.1.1 Evolución y desarrollo	12
4.1.2 Envejecimiento	13
4.2 Esclerosis Múltiple	15
4.2.1 Distribución geográfica	15
4.2.2 Etiología	16
4.2.3 Esclerosis Múltiple y visión	18
4.3 Técnicas de aprendizaje automático	19
4.3.1 Tipos de algoritmos	19
<b>5. ESTADO ACTUAL DEL TEMA</b>	<b>25</b>
<b>6. HIPÓTESIS</b>	<b>27</b>
<b>7. OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
<b>8. METODOLOGÍA</b>	<b>31</b>
8.1. Sujetos de estudio	31
8.2. Protocolo exploratorio	33
8.3. Variables	43
8.4. Recogida y análisis de datos	44
<b>9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>49</b>
<b>10. LIMITACIONES DEL ESTUDIO</b>	<b>111</b>
<b>11. CONCLUSIONES</b>	<b>113</b>
<b>12. APORTACIONES DEL DOCTORANDO</b>	<b>115</b>
<b>13. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>117</b>
<b>14. APENDICES</b>	<b>125</b>
Apéndice I. Factor de impacto de las revistas y áreas temáticas.	125
Apéndice II. Justificación de la contribución del doctorando en cada publicación.	126
Apéndice III. Renuncia de los coautores no doctores a usar el artículo en su propia tesis doctoral.	127
Apéndice IV: Consentimientos	130

Apéndice V: Documentación del Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón (CEICA) 133

Apéndice VI: Cuestionarios proporcionados 135

## 1. ABREVIATURAS

- AV: Agudeza visual.
- CCG: Capa de células ganglionares
- CFNR: Capa de fibras nerviosas de la retina
- CSF: Función de sensibilidad al contraste.
- CV: Campo visual
- Cz: Central
- EDSS: Escala ampliada del estado de discapacidad (*Expanded Disability Status Scale*)
- EM: Esclerosis múltiple.
- ETDRS: Estudio del tratamiento precoz de la retinopatía diabética (*Early Treatment Diabetic Retinopathy Study*)
- Fz: Frontal
- GDx-VCC: Polarimetría laser
- HFA: Analizador de campo Humphrey (*Humphrey Field Analyzer*)
- ILM: Membrana limitante interna (*Inner Limiting Membrane*)
- IPL: Capa plexiforme interna (*Inner Plexiform Layer*)
- MAVC: Mejor agudeza visual corregida.
- MD: Desviación media
- mfERG: Electrorretinograma multifocal
- MSQOL: Calidad de vida en la esclerosis múltiple (*Multiple Sclerosis Quality of Life*)
- NFI: Indicador de fibras nerviosas (*Nerve Fiber Indicator*)
- NO: Neuritis óptica
- NRMSE: Error cuadrático medio normalizado (*Standardized Root-Mean-Square Error*)
- OCT: Tomografía de coherencia óptica (*Optical Coherence Tomography*)
- PET: Tomografía por emisión de positrones (*Positron Emission Tomography*)
- PEV: Potenciales evocados visuales
- PHG: Prueba del hemicampo del glaucoma
- PIO: Presión intraocular
- PSD: Desviación estándar del patrón
- Pz: Parietal
- RM: Resonancia magnética
- SC: Sensibilidad al contraste.
- SD: Desviación estándar
- SPECT: Tomografía por emisión de fotón único (*Single Photon Emission Computed Tomography*)
- SVM: Máquinas de vectores de soporte (*Support Vector Machine*)
- VC: Visión cromática
- VFI: Índice del campo visual (*Visual Field Index*)



## 2. RESUMEN

### 2.1 Objetivo

El objetivo de esta tesis doctoral es evaluar la capacidad de discriminar entre sujetos sanos y pacientes con esclerosis múltiple (EM) mediante técnicas de aprendizaje automático utilizando datos de tomografía de coherencia óptica (OCT). Por otro lado, se ha estudiado si un método de análisis novedoso aumentaría el valor diagnóstico del electroretinograma multifocal (mfERG) en el diagnóstico de la EM en etapa temprana.

### 2.2 Metodología

Se estudiaron diversas cohortes de sujetos sanos y pacientes con EM. Se utilizó el dispositivo Triton (Topcon, Japón) con un protocolo de OCT de campo amplio que se centra tanto en la mácula (ETDRS: exploración del estudio de retinopatía diabética de tratamiento temprano) como en el área peripapilar (TSNIT: exploración temporal-superior-nasal-inferior-temporal). Se empleó también el OCT Cirrus High Definition del que se extrajeron los valores de capa de fibras nerviosas de la retina (CNFR) del protocolo “optic disc 200x200” y los espesores de retina y capa de células ganglionares (CCG) del protocolo “macular cube 512x512”.

Se registraron los valores de latencia de la onda P100 obtenida mediante potenciales evocados visuales (PEV) y la amplitud y latencia de las ondas N1 y P1 obtenidas con mfERG. Se utilizó el análisis estándar basado en latencias y amplitudes y un nuevo método para evaluar el error cuadrático medio normalizado ( $F_{\text{NRMSSE}}$ ) entre las señales del modelo y los registros mfERG.

Se analizó la función visual mediante la medición de la visión cromática (con test de Ishihara), de la sensibilidad al contraste (CSV-1000), de la agudeza visual (con optotipos de Snellen y ETDRS) y campo visual.

### 2.3 Resultados

En los pacientes con EM, la OCT reveló una correlación moderada entre el aumento de EDSS y el adelgazamiento de la CFNR y este a su vez se correlacionó moderadamente con una menor calidad de vida. El anillo 3 del mfERG es el que mejor discrimina entre sujetos sanos y con EM, no obstante, el nuevo análisis de señal basado en el error cuadrático medio muestra un poder de discriminación mayor que el método estándar.

En análisis mediante support vector machine (SVM) sugiere que la variable más discriminante es el grosor total de GCL ++ (entre la membrana limitante interna y los límites de la capa nuclear interna), evaluada en el área peripapilar.

A excepción de la GCL+ (entre CFNR y los límites de la capa nuclear interna) que muestra un adelgazamiento continuo a lo largo de la vida, el resto de las capas de la retina parece adelgazarse a partir de la 3ª década de vida.

## 2.4 Conclusiones

Los pacientes con esclerosis múltiple presentan una pérdida axonal progresiva de la capa de fibras nerviosas. Es posible clasificar sujetos controles sanos y pacientes con EM sin episodios previos de neuritis óptica, aplicando técnicas de aprendizaje automático para detectar la neurodegeneración subclínica estructural de la retina.



### 3. RELACIÓN DE PUBLICACIONES QUE COMPONEN LA TESIS

A continuación, se incluye una breve presentación de cada trabajo justificando su unidad temática:

1. Elisa Viladés, Amaya Pérez-del Palomar, José Cegoñino, Javier Obis, María Satue, Elvira Orduna, Luis Emilio Pablo, Marta Ciprés, Elena Garcia-Martin. **Physiological changes in retinal layers thicknesses measured with swept source optical coherence tomography.** Plos One 2020. In press

Se trata de un estudio traslacional observacional que incluyó a 463 sujetos sanos, y en el que el objetivo principal fue evaluar los cambios fisiológicos relacionados con la edad en todas las capas de la retina, tanto en el área macular como peripapilar.

Se realizó una exploración con el instrumento Triton *swept-source* (fuente de barrido) de tomografía de coherencia óptica (SS-OCT) (Topcon Corporation, Japón) mediante el protocolo amplio ("*wide*") (con un campo de exploración de 12x9 cm). Este protocolo permite medir el espesor de las siguientes capas: espesor total de la retina (desde la membrana limitante interna -ILM- hasta el límite del epitelio pigmentario de la retina), capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR), entre la ILM y el límite de la capa de células ganglionares (CCG); capa de células ganglionares (GCL+), entre CFNR y los límites de la capa nuclear interna; y GCL ++ (entre ILM y el límite de la capa nuclear interna), y coroides (desde la membrana de Bruch hasta la interfaz corioidea-escleral).

Se comparó el espesor medio en cuatro grupos de edades: Grupo 1 (71 sujetos sanos de entre 20 y 34 años); Grupo 2 (65 individuos sanos de 35 a 49 años), Grupo 3 (230 controles sanos de 50 a 64 años) y Grupo 4 (97 sujetos sanos de 65 a 79 años).

El adelgazamiento más significativo de todas las capas de la retina se registró durante la 4ª década de vida, especialmente en el cuadrante temporal superior en CFNR, GCL ++ y el espesor total de la retina ( $p \leq 0,001$ ); y temporal superior, temporal inferior y mitad temporal en la capa corioidea ( $p < 0,001$ ). Curiosamente, se observó un engrosamiento significativo de la CFNR hasta la 3ª década de vida en las mitades temporal superior ( $p = 0,001$ ), inferior ( $p < 0,001$ ) y temporal ( $p = 0,001$ ), y también en la mitad nasal en la capa corioidea ( $p = 0,001$ ).

Exceptuando la CFNR, que presentó un engrosamiento hasta la tercera década de vida, el resto de las capas mostraron un adelgazamiento fisiológico progresivo.

2. Carlo Cavaliere, Elisa Vilades, María Concepción Alonso-Rodríguez, María Jesús Rodrigo, Luis Emilio Pablo, Juan Manuel Miguel, Elena López-Guillén, Eva María Sánchez Morla, Luciano Boquete, Elena García-Martin. **Computer-aided diagnosis of multiple sclerosis using a support vector machine and optical coherence tomography features.** *Sensors (Basel)* 2019;19(23):5323

Se trata de un estudio traslacional observacional que incluyó a 48 sujetos sanos y 48 pacientes con EM de fenotipo remitente-recurrente (RR) sin episodios previos de neuritis óptica. El objetivo fue evaluar la capacidad diagnóstica en la EM analizando únicamente datos de OCT con una *support vector machine* (SVM) como clasificador automático.

Las mediciones de espesores de CNFR, CCG y coroides a nivel peripapilar y macular se realizaron con SS-OCT (Triton, Topcon). Basándonos en el análisis del área bajo la curva del operador-receptor (AUC), se seleccionaron las tres variables con mayor capacidad discriminante para formar el vector de características. Éstas fueron el espesor total de la capa GCL++ (desde la membrana limitante interna a la capa nuclear interna), y los sectores interior y exterior nasales de la rejilla ETDRS (Estudio del tratamiento precoz de la retinopatía diabética) macular.

Se utilizó el AUCCLASSIFIER y el coeficiente de correlación de Matthew para evaluar el rendimiento de la clasificación, obteniendo una sensibilidad de 0,890, una especificidad de 0,920, una exactitud de 0,910 y un AUCCLASSIFIER de 0,970.

Nuestros hallazgos sugirieron que el análisis mediante técnicas de aprendizaje automático es capaz de clasificar sujetos control y pacientes con EM incluso sin episodios previos de neuritis óptica, como técnica para estudiar la neurodegeneración estructural de la retina.

Por otro lado, nuestro estudio demuestra que las capas de la retina se adelgazan a partir de los 40 años, y se ha observado en el análisis comparativo por sexos, que en los hombres sanos existe un adelgazamiento de los sectores interno y externo de la macula, al contrario que las mujeres, donde observamos un engrosamiento, probablemente relacionado con los cambios maculares asociados a la edad, con factores hormonales (estudios previos demuestran el papel neuroprotector de los estrógenos) e incluso con un posible acumulo de líquido macular.

Estos hallazgos han sugerido que la EM-RR es más agresiva en hombres, ya que acumulan una mayor discapacidad en menos tiempo que las mujeres de su misma edad y mismos años de evolución.

- Luciano Boquete, Elena López-Guillén, Elisa Vilades, Juan Manuel Miguel-Jiménez, Luis Emilio Pablo, Luis De Santiago, Miguel Ortiz del Castillo, María Concepción Alonso-Rodríguez, Eva María Sánchez Morla, Almudena López-Dorado, Elena Garcia-Martin. **Diagnostic ability of multifocal electroretinogram in early multiple sclerosis using a new signal analysis method.** PLoS One 2019;14(11): e0224500.

Se trata de un estudio traslacional observacional con el objetivo principal de determinar si un nuevo análisis de señales podría incrementar la capacidad diagnóstica del electroretinograma multifocal (mfERG) en pacientes en estadios iniciales de EM-RR.

Las mediciones de los kernels de mfERG se obtuvieron con el dispositivo Retiport Retiscan de Roland, de acuerdo con los estándares de la Sociedad Internacional de Electrofisiología Clínica de la Visión (ISCEV). Se realizó un registro de ambos ojos de forma monocular y aleatoria, en 15 sujetos con diagnóstico de EM-RR inferior a 12 meses y sin episodios previos de neuritis óptica, junto a 6 controles sanos.

Se compararon dos métodos de análisis de los registros de mfERG: a) método estándar basado en las amplitudes y latencias de medición de ondas N1 y P1, y b) método de promediado de la base de datos de controles.

Observamos que solo la amplitud de N1 discriminó significativamente entre controles y pacientes con EM (prueba U de Mann-Whitney) en el anillo 3 ( $p = 0,023$ ) y el cuadrante inferonasal ( $p = 0,036$ ), no obstante, el anillo 2 es la región del campo visual con mayor capacidad de discriminación.

El valor NRMSE (error cuadrático medio normalizado) entre las señales del modelo y los registros mfERG sintetiza en un solo parámetro la comparación de las formas de la onda, en vez de utilizar los 4 parámetros del método tradicional. En el estudio de las diferentes regiones la  $F_{\text{NRMSE}}$  supera o iguala (cuadrante IN) el valor medio en el método estándar. Los valores de  $F_{\text{NRMSE}}$  en los controles superaron los valores obtenidos de las señales de EM, ya que la señal del modelo se construye a partir de señales de control.

Con este nuevo método de análisis de señal de mfERG, observamos que la región que mejor discrimina entre sujetos sanos y con EM es el hemisferio superior.

4. Elena Garcia-Martin, Jose Ramón Ara, Jesus Martín, Carmen Almarcegui, Isabel Dolz, Elisa Vilades, Laura Gil-Arribas, Francisco Javier Fernandez, Vicente Polo, Jose Manuel Larrosa, Luis Emilio Pablo, Maria Satue. **Retinal and optic nerve degeneration in patients with multiple sclerosis followed up for 5 years.** Ophthalmology 2017; 124(5):688-696.

Se trata de un estudio prospectivo longitudinal realizado en 50 sujetos sanos y 102 pacientes con EM-RR. El objetivo fue evaluar los cambios estructurales y funcionales a lo largo de 5 años de seguimiento.

Todos los participantes se sometieron a un examen neuro-oftálmico completo, incluyendo evaluación de la agudeza visual con mejor corrección mediante el optotipo de Snellen, visión del color, campo visual (CV), evaluación de los reflejos pupilares y la motilidad ocular; examen del segmento anterior, medición de la presión intraocular (PIO) con el tonómetro de aplanación de Goldmann y evaluación de la morfología papilar mediante examen fundoscópico y OCT, polarimetría láser (GDx-VCC) y potenciales evocados visuales (PEV). Además, se evaluó la puntuación de la Escala Expandida del Estado de Discapacidad (EDSS), la duración de la enfermedad, los tratamientos prescritos, los episodios previos de neuritis óptica y la calidad de vida (utilizando la puntuación de la Escala de Calidad de Vida de Esclerosis Múltiple de 54 ítems [MSQOL-54]). Cada año durante 5 años, los pacientes fueron reexaminados y se registraron los cambios en todos los parámetros. Un aumento mayor o igual de 0,5 en la puntuación de la EDSS durante el seguimiento se consideró una señal de progresión de la enfermedad.

En general, en nuestra población, se observó un incremento significativo de la EDSS tras 5 años, así como un empeoramiento de la calidad de vida. En cuanto a los parámetros estructurales la CFNR peripapilar y macular y de la CCG, se vieron significativamente reducidas tras los 5 años de seguimiento, en ambos grupos, siendo el adelgazamiento significativamente mayor en el grupo de EM-RR que en el grupo control. Por otro lado, observamos un aumento significativo de la latencia de la onda P100 en los sujetos con EM-RR con respecto a los controles.

También observamos que los cambios estructurales de la OCT no se correlacionan con los cambios funcionales (AV, CV, etc), pero si con la EDSS y la calidad de vida, aunque estos parecen no correlacionarse con la polarimetría laser, Además, observamos que, tras 5 años, los cambios funcionales y estructurales no han mostrado diferencias significativas entre los pacientes que previamente habían padecido episodios de neuritis óptica.

El hecho de que los parámetros funcionales no mostrasen un cambio significativo durante el seguimiento sugiere que la pérdida de espesor de la CFNR detectada mediante la OCT no es lo suficientemente grave como para afectar la funcionalidad o que existen mecanismos compensatorios que podrían atenuar los efectos neurodegenerativos y evitar déficits clínicos relevantes cuantificables mediante

evaluación de la agudeza visual o el campo visual. Nuestros resultados sugieren que a pesar de la utilidad diagnóstica de la onda P100 de los PEV, no es una variable tan sensible como la OCT, ya que tras 5 años de seguimiento se registraron pequeñas variaciones de amplitud y latencia en los sujetos control y solo un aumento significativo de la latencia en los pacientes con EM.



## 4. INTRODUCCION

El tema principal de las cuatro publicaciones que componen esta tesis doctoral se basa en el análisis de las principales estructuras oculares (nervio óptico, capas de la retina y coroides), los parámetros funcionales (tales como, agudeza visual, sensibilidad al contraste, campo visual y percepción del color), y los test electrofisiológicos (potenciales evocados visuales y electroretinograma multifocal) en pacientes con Esclerosis Múltiple (EM).

En España, en 2016 aproximadamente 1 millón de personas (2.08% de la población) se veían afectadas por alguna patología neurodegenerativa, especialmente por las enfermedades de Alzheimer, Parkinson, o EM. La previsión demográfica en nuestro país estima que en 2050 habrá 16.000.000 de personas mayores de 65 años, lo que supondrá un incremento de pacientes afectados por alguna de estas patologías.

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la muerte neuronal, si bien su etiología es diferente en cada patología: en el caso de la EM se trata de una muerte inmunomediada, en el caso de la enfermedad de Parkinson se trata de una alteración de los circuitos dopaminérgicos. Esta pérdida neuronal es la precursora de la discapacidad funcional y síntomas clínicos que condicionaran la vida del paciente.

El abordaje de las enfermedades neurodegenerativas supone un gran reto debido a factores sociológicos y técnicos, como el incremento de la esperanza de vida, factores socioeconómicos, el incremento de los costes sanitarios o el debilitamiento de la inversión social y sanitaria pública. Todos estos factores suponen un desafío a nivel humano, social y económico, tanto para pacientes como para profesionales sanitarios e investigadores.

En la actualidad, no existe un único marcador para el diagnóstico de las enfermedades neurodegenerativas, siendo necesario una batería de pruebas, como la resonancia magnética (RM), la punción lumbar y otras no exentas de riesgo debido al uso de marcadores radiactivos, como la tomografía por emisión de fotón único (SPECT) y la tomografía por emisión de positrones (PET).

Sin embargo, no es infrecuente que las lesiones observadas en las pruebas mencionadas anteriormente solo justifiquen una pequeña fracción de los síntomas y progresión de la enfermedad que presentan estos pacientes, lo que se conoce como la paradoja clínico-radiológica.

Son muchos los estudios publicados en la última década que han demostrado la evidencia de un adelgazamiento de la capa de fibra nerviosas de la retina (CFNR) a nivel del nervio óptico, así como de la capa de células ganglionares (CCG) a nivel macular. Además, esta pérdida neuronal y axonal se ha correlacionado con la progresión y empeoramiento de la calidad de vida. Este análisis es posible gracias a que el sistema visual es una extensión del sistema nervioso, fácilmente accesible mediante tomografía de coherencia óptica (OCT), una prueba rápida, inocua, rentable (en términos de coste-eficiencia) y no invasiva, que no requiere especialización técnica para su realización.

Por otro lado, esta tesis profundiza en las nuevas técnicas de aprendizaje automatizado, como el análisis discriminante lineal, redes neuronales, y máquinas de vectores de soporte (*support vector machines*) (SVM). Estas técnicas ya han demostrado su eficacia, incluso en patologías como el glaucoma o la EM, funcionando como un clasificador de imágenes que permite maximizar la capacidad discriminativa entre grupos de sujetos (enfermos versus sanos) utilizando datos.

## 4.1 Retina

### 4.1.1 Evolución y desarrollo

Con la primera opsina hace más de 600 millones de años, los primeros organismos desarrollaron fotorreceptores que eran capaces de detectar la luz, permitiendo evadirse de depredadores mediante la detección de sombras. Sin embargo, no fue hasta 170 millones de años después, en la explosión del Cámbrico, que los planes corporales de los animales comenzaron a evolucionar muy rápidamente, surgiendo los ojos y sistemas visuales en alta resolución. [1,2]

La posesión de capacidades o atributos ventajosos, como la vista, podría haberse vuelto crucial para la supervivencia y podría haber llevado a una "carrera armamentista" en el desarrollo de mecanismos defensivos y ofensivos. Los ojos evolucionaron con diversas formas, pero aparentemente basados en ciertas características subyacentes comunes de patrón y desarrollo, como lo ejemplifican genes como PAX6 y RAX, que tienen roles críticos durante la neurulación y la regionalización del cerebro. [2]

Dado que la estructura del ojo está diversificada, podemos imaginar fácilmente que sus diferentes estructuras se desarrollaron de distintas formas. El primordio de la retina emerge de en el prosencéfalo mucho antes de que el pliegue neural se cierre alrededor de la tercera semana de gestación. A medida que los pliegues neurales se encuentran en la línea media, el prosencéfalo se evagina para formar la vesícula óptica, la inversión de la retina.

Luego, la vesícula óptica invagina, formando la copa óptica y se forma el cristalino a partir del ectodermo de la superficie suprayacente en un proceso conocido como inducción secundaria. El componente retiniano del ojo deriva del ectodermo neural, y el cristalino y epitelio corneal del ectodermo de superficie en el caso de ojos de vertebrados. [3,4]

Una de las características más notables de la retina es su estructura extremadamente ordenada. Como muchas regiones del sistema nervioso central, la retina de los vertebrados está dispuesta en un ensamblaje de múltiples capas. Los cuerpos celulares de los cinco tipos de neuronas se distribuyen entre tres capas celulares separadas por dos estratos sinápticos donde las conexiones están restringidas.

Además de tener una distribución vertical, dentro de las capas celulares, las neuronas están dispuestas de forma no aleatoria en matrices regulares en el plano horizontal. Los cuerpos celulares se distribuyen uniformemente y sus dendritas están en mosaico. Estos patrones se denominan "mosaico retiniano", y esta organización tan precisa es esencial para establecer un



circuito funcional de la retina. Las células ganglionares de la retina de los mamíferos también están dispuestas en un mosaico, que es específico para cada subtipo de célula ganglionar retiniana, así como sus arborizaciones dendríticas que también están ordenadas, cubriendo toda la superficie de la retina sin solaparse. [5]

Hay muchos tipos de células ganglionares de la retina, cada una con patrones de ramificación característicos, tanto las señales intrínsecas como las ambientales parecen dar forma a los patrones de ramificación de las neuronas de la retina, al menos para las células ganglionares.

Sin embargo, la forma y el tamaño del árbol dendrítico de las células ganglionares cambian cuando la densidad de las células ganglionares vecinas se altera durante el desarrollo. La ablación con láser o la sección de axones dan como resultado una lesión local sin células ganglionares de la retina. Esta manipulación da como resultado que las células del borde de la lesión proyecten sus dendritas hacia la región libre de células ganglionares. [6,7]

#### 4.1.2 Envejecimiento

Tanto la retina como el ojo están expuestos a una variedad de agresiones ambientales y factores de estrés, incluidas mutaciones genéticas y alteraciones asociadas con la edad que afectan su función. La autofagia podría jugar un papel importante en el desarrollo de la retina y la diferenciación celular, así como en el envejecimiento fisiológico y en enfermedades importantes como la degeneración macular asociada a la edad y el glaucoma. [8]

La mayoría de los cambios se producen a nivel del epitelio pigmentario de la retina, la membrana de Bruch y la capa de fotorreceptores, estos cambios incluyen la pérdida de las características esenciales normales de estas células y su desaparición gradual. La evidencia indica que algunos de estos cambios pueden estar mediados por los efectos del estrés oxidativo, la inflamación y la exposición crónica a la luz. [8,9]

También se producen cambios en las capas internas de la retina, en las que la hipertensión, la autoinmunidad, la hipoxia y la isquemia podrían desempeñar un papel importante, dado que la muerte de los conos y de las células ganglionares es un problema potencial, es imperativo conocer los hechos básicos sobre cómo se ven afectados y los mecanismos involucrados en su muerte. [9]

Por otro lado, ha adquirido importancia el papel de la oxigenación local en la retina, donde es necesario un equilibrio correcto entre el suministro de oxígeno retiniano y el consumo de oxígeno para la homeostasis retiniana. Se han observado cambios en la distribución del oxígeno intrarretiniano durante la degeneración, reflejando estos cambios una pérdida gradual del metabolismo del oxígeno de los fotorreceptores en degeneración. Esto da como resultado niveles de oxígeno más altos de lo normal en la retina externa y una alteración significativa en el flujo de oxígeno desde la coroides hacia la retina interna. Es bien sabido que tanto la hipoxia como la hiperoxia pueden causar estrés y daño a las células neurales. [10]

Los estudios histopatológicos, así como estudios estructurales, han demostrado que tanto la CFNR como la CCG a nivel macular, ven disminuido su espesor de forma proporcional a la edad, lo que sugiere que la CCG podría ser un buen biomarcador para el pronóstico de determinadas patologías asociadas a la edad. [11]

No debemos olvidar que las células de la microglía constituyen la inmunidad innata principal del sistema nervioso central (SNC) y está implicada en diversas funciones patológicas y funcionales. En condiciones patológicas, se cree que la microglía, bien sea por una pérdida de la función endógena o por la adquisición de funciones inapropiadas, contribuye al inicio y/o a la progresión de la enfermedad del SNC, particularmente en un SNC envejecido. [12]

Es por ello, que la microglía, podría desempeñar un rol importante en el envejecimiento de la retina, ya que se encarga de la inmunidad de la retina y del mantenimiento de las sinapsis. La densidad de la microglía alcanza su punto máximo en la retina parafoveal, disminuyendo hacia la retina periférica, y esta distribución refleja la especialización macular. [13]

Recientemente, se han identificado las células ganglionares que expresan melanopsina (mCCG), como una nueva clase de fotorreceptores que favorecen los ritmos circadianos y otras funciones del ojo no involucradas en la formación de imágenes. [14,15] Algunos estudios han abordado la relevancia de las mCCG en humanos y algunas enfermedades. Recientemente se descubrió que las mCCG resisten la neurodegeneración en dos trastornos mitocondriales hereditarios que causan ceguera, como la neuropatía óptica hereditaria de Leber y la atrofia óptica dominante [16], y en otras patologías como el glaucoma. [17,18] Además, se ha demostrado una reducción significativa de las mCCG con el envejecimiento. [14,19,20]

## 4.2 Esclerosis Múltiple

Debemos remontarnos al siglo X, a una Islandia habitada por vikingos, para oír hablar del que podría ser el primer caso reportado de EM. El obispo de Thorlack, nos relata que, Halldora una mujer aquejada por un horrible mal, quedaba paralizada en múltiples ocasiones, del mismo modo que padeció de una ceguera transitoria, así como la pérdida del habla. Episodios que tras periodos de oración y sacrificio desaparecían. Sin duda, a día de hoy cuando leemos esto, no podemos evitar pensar en los clásicos episodios de una EM-RR. [20-21]

No será hasta el siglo XVIII, cuando Robert Hooper (patólogo británico y médico en ejercicio), Robert Carswell (profesor británico de patología), y Jean Cruveilhier (profesor de anatomía patológica francés), realizasen ilustraciones médicas de lesiones de la médula espinal acompañadas de atrofia, en sujetos que reportaban episodios similares a los de Halldora. El patólogo sueco Georg Eduard von Rindfleisch (1836–1908) anotó en 1863 que las lesiones asociadas estaban distribuidas alrededor de los vasos sanguíneos.

Así, Jean-Martin Charcot, pionero de la neurología moderna, acuñó por primera vez el término de “esclerosis múltiple”, a la que denominó esclerosis en placas. [21]

La EM es una enfermedad autoinmune crónica del SNC caracterizada por la desmielinización primaria, con una pérdida variable de axones. La desmielinización y la neurodegeneración en la EM se asocian con una profunda reacción de la astrogliosis, que forma una cicatriz glial densa en forma de lesiones de larga duración. [22] Durante algún tiempo, la visión de la patología de la EM se centró en las placas desmielinizadas focales en la sustancia blanca, más tarde, quedó claro que las lesiones también están presentes en la sustancia gris, incluida la corteza, los ganglios basales, el tronco encefálico y la sustancia gris de la médula espinal. [23]

Además, existe la neurodegeneración, que afecta al cerebro y a la médula espinal en un sentido global, dando lugar a una pérdida axonal en la sustancia blanca de apariencia normal y una neurodegeneración difusa en toda la sustancia gris. Estos cambios finalmente resultan en una profunda pérdida y atrofia de tejido cerebral, que es más pronunciada en la etapa progresiva de la enfermedad. [24]

### 4.2.1 Distribución geográfica

La incidencia de EM aumenta con la latitud, registrando una incidencia más altas en Canadá y norte de EEUU, países nórdicos, bálticos y Rusia.[25-27] En cambio, en la península arábiga, Asia, América Central y América del Sur continental la frecuencia es mucho menor, incluso en España este gradiente norte-sur se mantiene.[28-30]

Son varios los factores (Figura 1) que se han asociado a esta relación incidencia-latitud, como la exposición a luz ultravioleta [31], el déficit de vitamina D [32], los subproductos de la industria [33] y los factores genéticos. [20,21]

## 4.2.2 Etiología

### ❖ Factores genéticos

Hay pruebas que apoyan la existencia de una mayor frecuencia de diagnóstico de EM en hermanos [34-36] y en individuos estrechamente relacionados con antecedentes familiares de EM. [37] El alto riesgo de un diagnóstico de EM entre individuos estrechamente relacionados sugiere un vínculo entre el haplotipo HLA y la enfermedad, como se ha observado en grandes estudios de asociación del genoma completo (GWAS) para el alelo HLA DRB1 \* 15: 01, considerado como el factor de riesgo genético más importante para la EM, y en particular para una edad de aparición más precoz. [38]

Este alelo también está presente con una frecuencia muy alta (14%) en las poblaciones del norte de Europa [39] y en un 18-19% en las del sur de Europa. [40] También ha habido al menos otros 11 alelos HLA estadísticamente asociados con el riesgo de EM. Varios estudios con gran tamaño muestral de GWAS (algunos incluyen hasta 80.000 individuos) han identificado hasta 200 variantes genéticas no HLA asociadas estadísticamente con el riesgo de EM. [41,42]

### ❖ Estilo de vida

También hay estudios que relacionan factores del estilo de vida como la obesidad [43,44], la dieta [45], los cambios en el microbiota intestinal [46,47], el tabaquismo [48], la exposición a productos químicos industriales como los disolventes orgánicos, metales pesados [49,50] y un estilo de vida "urbano" con un mayor riesgo de desarrollar EM o de un aumento riesgo de progresión de la enfermedad.

### ❖ Radiación Ultravioleta (UV) y vitamina D

Alrededor del 15% de la población mundial vive en latitudes por encima de los 40º en la mitad norte de los Estados Unidos, Europa, Canadá y Rusia o en el hemisferio sur en Nueva Zelanda, Tasmania y Patagonia. Los individuos en estas latitudes altas reciben cantidades relativamente menores de luz solar, y registran una incidencia mayor de EM. De hecho, la incidencia de EM en estos individuos varía de 110 a 140 casos por 100.000 personas, lo que es dos veces mayor que la tasa entre los paralelos 40, que tiene alrededor de 57 a 78 casos por 100.000. [31,32]

Es importante destacar que la vitamina D es un importante regulador del sistema inmunológico y de varias enfermedades inmunológicas, especialmente la EM. Se conoce la exposición inadecuada a la luz solar como el principal factor de riesgo de deficiencia de vitamina D en latitudes superiores a 40 grados norte donde la población depende de la vitamina D en la dieta en lugar de la sintetizada por la luz. [51]

❖ Virus y otros factores ambientales

La evidencia epidemiológica de la implicación del VEB (Virus de Eipstein-Barr) en la EM se centra en estudios que han demostrado que el riesgo de EM es mucho mayor en los individuos que han padecido mononucleosis infecciosa que en los que no la han padecido (riesgo 2 a 3 veces mayor). [52]

Por el contrario, algunos estudios observan que la seropositividad al citomegalovirus humano (CMV), tendría un efecto protector sobre el riesgo de padecer EM. [53] Otro factor de riesgo viral es el de la expresión retroviral endógena. Los retrovirus endógenos (RVE) son secuencias genómicas repetitivas que están presentes en la mayoría, si no en todos, los vertebrados. Revisiones sistemáticas recientes y metaanálisis de un gran número de estudios han establecido claramente que los pacientes con EM sobre expresan el ARN de la familia RVEH en comparación con los controles sanos. Otras familias de RVE cuya expresión se ha asociado con la EM incluyen: HERV-H, HERVFc1 en el cromosoma X y HERV-K y HERV-W. [33,52,53]

Esta visión de la patogénesis se explica muy probablemente por la hipótesis de la higiene, según la cual la exposición a infecciones genéricas en una etapa temprana de la vida mejora el desarrollo de un sistema inmunorregulador que disminuye la actividad de las células T autorreactivas más adelante en la vida. [33]

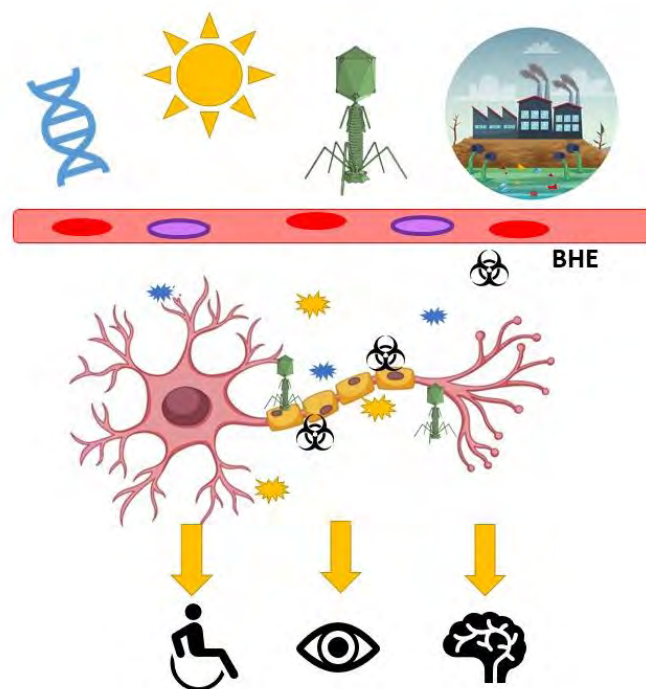


Figura 1: Fisiopatología de la esclerosis múltiple

### 4.2.3 Esclerosis Múltiple y visión

La alteración de la función visual en la EM puede ir desde una reducción de la AV, de la sensibilidad al contraste o de la visión de color alterada, como en los casos de neuritis óptica, o trastornos de la motilidad ocular. Además, algunos medicamentos para la EM también pueden afectar la función visual. [54]

El daño a las fibras nerviosas de los núcleos del tronco encefálico y del cerebelo puede provocar trastornos de la motilidad ocular. Mientras que la recuperación casi completa es común después de la neuritis óptica aguda, los trastornos de la motilidad ocular a menudo causan síntomas oculares persistentes como la diplopía. Un trastorno común de la motilidad ocular en la EM es la oftalmoplejía internuclear, que se estima que afecta a más del 20% de los pacientes. [55]

La EM rara vez es la causa de parálisis aisladas de pares craneales, pero a veces se observan al inicio de la enfermedad o durante las recaídas, especialmente en pacientes jóvenes. Los nervios abducens y oculomotor son los más comúnmente afectados y la parálisis del nervio troclear no suele darse en estos pacientes.

La disfunción sacádica y el nistagmo son bastante frecuentes en pacientes con EM. Son causadas por la desmielinización del cerebelo o de los tractos entre el cerebelo y el tronco encefálico.

La capa de fibras nerviosas de la retina peripapilar (pCFNR), compuesta de axones amielínicos, se ha sugerido como un biomarcador que representa la degeneración axonal en el cerebro de pacientes con EM. El análisis de la integridad microestructural axonal puede mejorar aún más la capacidad para detectar la degeneración temprana y monitorizar la progresión de la enfermedad y la eficacia del tratamiento. [54,56-68]

Estudios transversales previos utilizando SD-OCT demostraron que el espesor del complejo de células ganglionares maculares-capa plexiforme interna (mGCIPL) tiene una confiabilidad y reproducibilidad altas y mostró una mejor correlación con la función visual y la discapacidad clínica en la EM que la CFNR, incluso en etapas iniciales de la enfermedad. La tasa de adelgazamiento de mGCIPL se acelera en pacientes con EM que exhiben actividad inflamatoria y se correlaciona fuertemente con la atrofia cerebral, particularmente la atrofia de la materia gris, con el tiempo. [60,61,66-68]

En la retina de los mamíferos, los fotorreceptores (bastones y conos), cuyos fotopigmentos son rodopsina y fopsina, son responsables de la visión. Se ha descubierto que las células ganglionares también están involucradas en la regulación de la melatonina, expresando selectivamente melanopsina, una proteína similar a la opsina y un fotopigmento cuya expresión está restringida a <2% de las células ganglionares. [53] Ahora se sabe que la exposición a la luz azul activa la melanopsina e inhibe el SNC para sintetizar y liberar melatonina. [59] Un estudio reciente indicó que las pérdidas de axones y células ganglionares podrían estar asociadas con la deficiencia de vitamina D. [31,69]

## 4.3 Técnicas de aprendizaje automático

El aprendizaje automático es una técnica para reconocer patrones que puede ser aplicada a imágenes médicas. Generalmente comienza con el sistema de algoritmos de aprendizaje automático, que calcula las características de la imagen que se cree que son de importancia para realizar la predicción o el diagnóstico de interés (textura, color, forma, etc.).

El sistema de algoritmos de aprendizaje automático identifica la mejor combinación de estas características de imagen para clasificar la imagen o calcular alguna métrica para la región de imagen dada. Hay varios métodos que se pueden utilizar, cada uno con diferentes fortalezas y debilidades. Existen varias métricas para medir el rendimiento de un algoritmo; sin embargo, uno debe ser consciente de los posibles peligros asociados que puede resultar en métricas engañosas. [70,71]

### 4.3.1 Tipos de algoritmos

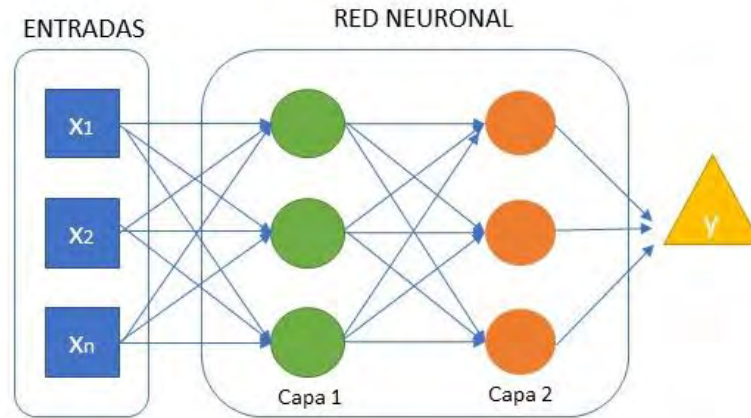
Hay diversos algoritmos para seleccionar las mejores características, estos se basan en diferentes métodos para ajustar la función de ponderación y suposiciones sobre los datos. Algunas de las técnicas más comunes son redes neuronales, k vecinos más cercanos, máquinas de vectores de soporte, árboles de decisión, el algoritmo de Bayes y el aprendizaje profundo.

#### ❖ Redes neuronales

El aprendizaje con redes neuronales es el método arquetípico de aprendizaje automático. [72] Las siguientes tres funciones son parte del esquema de aprendizaje para este método (Figura 2):

- a) La función de error mide qué buena o mala es una salida para un conjunto dado de entradas.
- b) La función de búsqueda define la dirección y la magnitud del cambio requerido para reducir la función de error.
- c) La función de actualización define cómo se actualizan los pesos de la red sobre la base de los valores de la función de búsqueda.

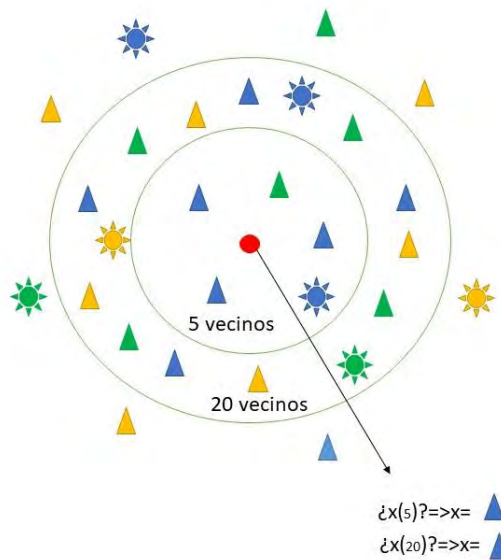
Durante la fase de aprendizaje, se presentan ejemplos al sistema de red neuronal, se calcula el error para cada ejemplo y se calcula el error total. Sobre la base del error, la función de búsqueda determina la dirección general a cambiar, y la función de actualización usa esta métrica de cambio para ajustar los pesos. Este es un proceso interactivo y, por lo general, se continúa ajustando hasta que hay poca mejora en el error. Los ejemplos del mundo real suelen tener una o más capas ocultas y funciones más complejas en cada nodo. [72,73]



**Figura 2:** Esquema simplificado de una red neuronal

❖ **k vecinos más cercanos**

Este algoritmo clasifica un vector de entrada, es decir, una colección de características para un objeto de ejemplo desconocido, asignando el objeto a la clase o clases más similares. Calcula la distancia del elemento nuevo a cada uno de los existentes, y ordena dichas distancias de menor a mayor para ir seleccionando el grupo al que pertenece. Se trata de un algoritmo de aprendizaje supervisado, ya que no genera un modelo fruto del aprendizaje con datos de entrenamiento, sino que el aprendizaje sucede en el mismo momento en el que se prueban los datos de tests (Figura 3). [70,71,74]



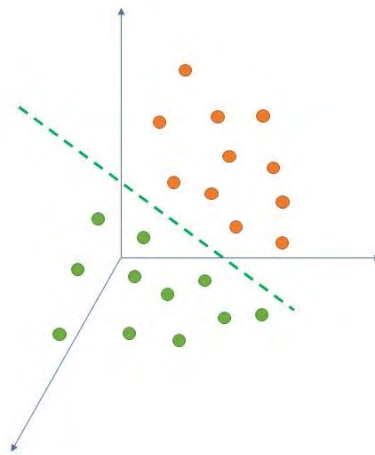
**Figura 3:** Representación de la organización del algoritmo k vecinos más cercanos



❖ Máquinas de vectores de soporte (*support vector machines, SVM*)

Se trata de un clasificador lineal biclase. Este método, tras entrenarlo, nos devolverá un discriminante, el vector normal al hiperplano que separa a las dos clases, además de otros atributos necesarios para clasificar entradas posteriores. Los vectores de soporte son los puntos que definen el margen máximo de separación del hiperplano que separa las clases (Figura 4).

En el caso de que las clases no sean linealmente separables en un plano, podemos usar el “truco” del kernel para añadir una nueva dimensión donde sí lo sean. Esta capacidad brinda a los algoritmos de máquinas vectoriales de soporte una gran ventaja sobre muchos otros métodos de aprendizaje automático. [60,71,75]



**Figura 4:** Representación de la clasificación de casos de una SVM, organizando los datos en 3 dimensiones (truco del kernel)

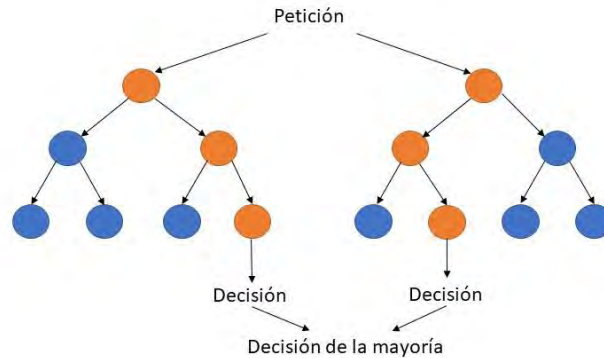
Poseen además la ventaja de que se pueden seguir perfeccionando y optimizando al introduciendo más datos (por ejemplo, nuevas poblaciones que se incluyen en el estudio de otras áreas geográficas).

❖ Árboles de decisión

Todos los métodos de aprendizaje automático descritos hasta este punto tienen una desventaja importante: los valores utilizados en los pesos y las funciones de activación generalmente no se pueden extraer para obtener algún tipo de información que pueda ser interpretada por humanos. Los árboles de decisión ofrecen la ventaja sustancial de que producen reglas legibles por humanos sobre cómo clasificar un ejemplo dado.

Los árboles de decisiones son familiares para la mayoría de las personas y generalmente toman la forma de preguntas de sí o no, por ejemplo, si un valor numérico es mayor que cierto valor. El aspecto de los árboles de decisión que se aplica al aprendizaje automático es la búsqueda rápida de las muchas combinaciones posibles de puntos de decisión para encontrar los puntos que, cuando se utilizan, darán como resultado el árbol más simple

con los resultados más precisos. Cuando se ejecuta el algoritmo, se establece la profundidad máxima (es decir, el número máximo de puntos de decisión) y la amplitud máxima que se buscará y establece la importancia de tener resultados correctos frente a más puntos de decisión (Figura 5). [70,71,76]

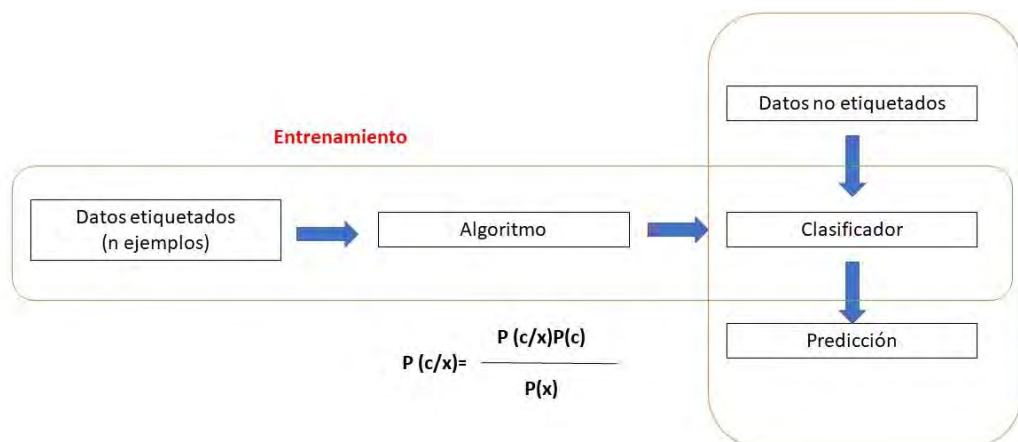


**Figura 5:** Representación de la toma de decisiones en un árbol de decisión

❖ Algoritmo de Naive Bayes o Clasificador Bayesiano

Según el teorema de Bayes, uno de los métodos de aprendizaje automático más antiguos, la probabilidad de un evento es una función de eventos relacionados. La fórmula del teorema de Bayes es  $P(y | x) = [P(y) \times P(x | y)] / P(x)$ : la probabilidad (P) de "y" dada "x" es igual a la probabilidad de "y" multiplicada por la probabilidad de "x" y dividido por la probabilidad de "x".

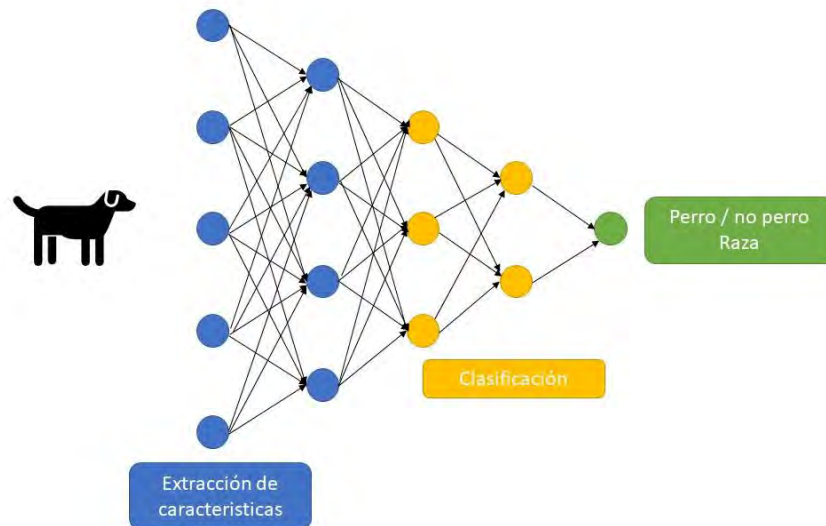
En el aprendizaje automático, donde hay múltiples características de entrada, se deben encadenar las probabilidades de cada característica para calcular la probabilidad final de una clase, dada la matriz de características de entrada que se proporciona (Figura 6). Es un método importante no sólo porque ofrece un análisis cualitativo de los atributos y valores que pueden intervenir en el problema, sino porque tiene también en cuenta la importancia cuantitativa de esos atributos. [70,77,78]



**Figura 6:** Representación de un clasificador basado en un algoritmo Bayesiano, con el objetivo final de proporcionar una predicción basada en las probabilidades de cada atributo.

## ❖ Deep Learning o aprendizaje profundo

Este método lleva a cabo el proceso de Machine Learning usando una red neuronal artificial que se compone de niveles jerárquicos. En el nivel inicial de la jerarquía, la red aprende algo simple y luego envía esta información al siguiente nivel. El siguiente nivel toma esta información sencilla, la combina, compone una información un poco más compleja, y así sucesivamente (Figura 7).



**Figura 7:** Esquema del proceso de aprendizaje profundo. A diferencia del learning machine es más rápido, complejo y permite trabajar con gran cantidad de datos.

Puede aplicarse con éxito a grandes volúmenes de datos para el descubrimiento y aplicación de conocimiento, así como a la realización de predicciones a partir de él, principalmente debido a que obtienen tasas de éxito elevadas con entrenamiento “no supervisado, a diferencia de las técnicas anteriormente mencionadas. [70,79]



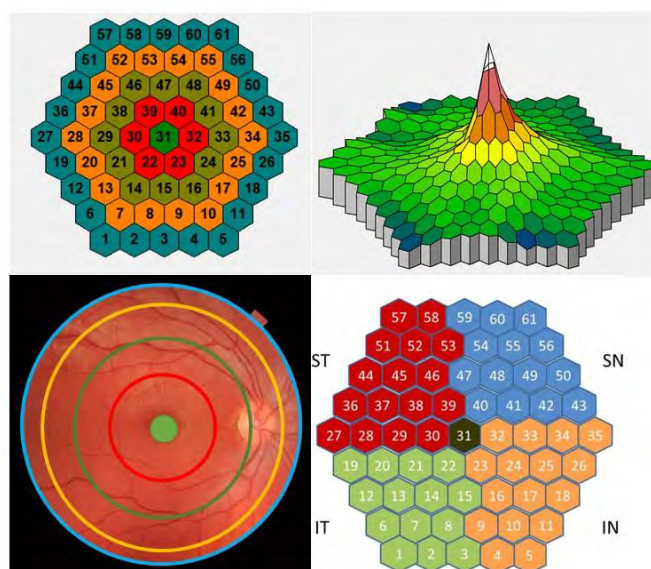
## 5. ESTADO ACTUAL DEL TEMA

La OCT en el manejo de la EM se viene utilizando desde su invención en 1991, e incluso con la OCT basada en el dominio del tiempo (TD-OCT) se encontró una evidencia consistente de atrofia de la capa de fibras nerviosas de la retina peripapilar (CFNR).

Los datos de los estudios TD-OCT sobre las capas de la retina de forma individual fueron escasos debido a la mala resolución de la imagen y la ausencia de algoritmos de segmentación, pero con la aparición de la OCT de dominio espectral (SD-OCT), se pudieron superar estas limitaciones. [80]

Tradicionalmente se trabajó con la CNFR peripapilar, y las mejoras en la segmentación han permitido cuantificar también atrofia en la CCG, así como observar que esta atrofia se detiene en la capa nuclear interna. [81] En consecuencia, los cambios de volumen de la capa nuclear interna han surgido como un sustituto potencialmente nuevo de los cambios relacionados con la inflamación en la esclerosis múltiple. Todos estos cambios solo son visibles gracias a la OCT, permitiendo observar en estos pacientes cambios de una forma mucho más precoz que con una oftalmoscopia tradicional, la cual requiere una pérdida de al menos el 50% de las fibras nerviosas para mostrar alteraciones detectables.

Por otro lado, la electrofisiología tradicional había demostrado alteraciones en los PEV y ERG en sujetos con EM, sin embargo, la principal limitación de estas técnicas es que analizan áreas grandes de la retina, por lo que pequeñas alteraciones pueden pasar desapercibidas. [82,83] La electroretinografía multifocal (mfERG) se desarrolló con el objetivo de obtener información objetiva sobre la actividad de la retina por conos y un mapa de sensibilidad de alta resolución topográfica de la retina (Figura 8). [84]



**Figura 8:** Mapa topográfico tridimensional de la retina basado en la amplitud e P1, donde se observa el pico máximo que correspondería a la mácula (hexágono 31)

Son pocos los estudios que han investigado el potencial del mfERG para el diagnóstico de la EM y además se basan en el análisis tradicional de amplitudes y latencias, produciendo resultados contradictorios. [82-91]

Por otro lado, los algoritmos de aprendizaje automático han adquirido especial relevancia gracias a su capacidad para construir modelos predictivos que pueden aprender patrones y relaciones mientras requieren una mínima intervención humana. En la EM, esta aplicación hasta ahora se ha sido utilizado principalmente para clasificar las diferentes etapas de la enfermedad, síndrome clínicamente aislado (CIS), esclerosis múltiple remitente-recidivante (EM-RR) y esclerosis múltiple secundaria progresiva (EM-SP), o para predecir la transición de CIS a EM clínicamente definida. [92-95]

Es sabido que la esclerosis múltiple cursa con una neurodegeneración crónica de la capa de fibras nerviosas de la retina y la capa de células ganglionares, así como con alteraciones electrofisiológicas.

No obstante, las limitaciones de la electrofisiología tradicional y la falta de estudios de las nuevas técnicas de electrofisiología multifocal plantean la necesidad de identificar qué variables tienen la capacidad de discriminar entre pacientes con esclerosis múltiple y sujetos sanos.

A lo largo de la última década ha quedado constatado que la OCT es capaz de detectar diferencias tanto a nivel macular como peripapilar en sujetos con EM. Sin embargo, los análisis TSNIT y ETDRS proporcionados por los dispositivos están pensados para una rápida interpretación, lo cual limita el volumen de datos ofrecidos a priori. Aquí es donde intervienen los métodos de aprendizaje automático, ya que permiten analizar y correlacionar un mayor volumen de datos y más allá de un análisis estadístico tradicional. Son sin duda la llave para la optimización de la capacidad diagnóstica del OCT, pues permiten que se establezcan los algoritmos de decisión identificando los parámetros de mayor sensibilidad y especificidad.

En esta tesis se han aplicado las técnicas de aprendizaje automático para optimizar la capacidad discriminatoria entre sujetos sanos y sujetos con esclerosis múltiple, a través de los diferentes parámetros obtenidos mediante OCT y electrofisiología, con el objetivo de detectar las variables (capa, sectores, estructura, etc.) de mayor especificidad y sensibilidad.

## 6. HIPÓTESIS

La esclerosis múltiple desde fases precoces causa alteraciones subclínicas en la estructura de la neuro-retina y en las pruebas electrofisiológicas que pueden ser utilizadas para su diagnóstico precoz optimizando la capacidad de estas pruebas para discriminar entre sujetos sanos y pacientes con esclerosis múltiple, mediante la aplicación de técnicas de inteligencia artificial como las máquinas de vectores de soporte (*Support vector machine*).





## 7. OBJETIVOS

- I. Analizar el cambio fisiológico en el espesor de las capas de la retina a lo largo de la vida.
- II. Evaluar si dicho cambio fisiológico es diferente según el género (entre varones y mujeres).
- III. Estudiar qué parámetros de la tomografía de coherencia óptica tipo swept-source son más útiles para detectar la neurodegeneración de los pacientes con esclerosis múltiple y para diferenciarlos de los sujetos sanos.
- IV. Evaluar si el género influye en el adelgazamiento de los espesores de las capas de la neuro-retina en los pacientes con esclerosis múltiple.
- V. Analizar la afectación de las diferentes capas de la neuro-retina en los estadios iniciales de esclerosis múltiple.
- VI. Evaluar y optimizar la capacidad de las máquinas de vectores de soporte (*Support vector machine*) para distinguir entre sujetos sanos y pacientes con esclerosis múltiple.
- VII. Estudiar si los electroretinogramas multifocales son herramientas útiles para diagnosticar la esclerosis múltiple en fases precoces y qué parámetros tienen mayor capacidad diagnóstica utilizando métodos de inteligencia artificial.
- VIII. Demostrar que los pacientes con esclerosis múltiple presentan una pérdida axonal progresiva en la capa de fibras nerviosas peripapilar detectables mediante tomografía de coherencia óptica.
- IX. Analizar las correlaciones entre el adelgazamiento de las capas de la neuro-retina en la esclerosis múltiple y el grado de discapacidad y la afectación en la calidad de vida a medida que progresa la enfermedad durante 5 años de seguimiento.
- X. Demostrar que la fisiopatología de la esclerosis múltiple incluye una pérdida axonal progresiva continua, incluso cuando la enfermedad está estable y no se dan episodios recurrentes o brotes.



## 8. METODOLOGÍA

Los artículos que forman parte de esta tesis doctoral son el resultado de varios estudios que se llevaron a cabo en la Unidad de Función Visual del Servicio de Oftalmología, con la participación del Servicio de Neurología del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza, el Grupo de Biomateriales de la Universidad de Zaragoza y el Grupo de Ingeniería Biomédica de la Universidad de Alcalá de Henares. El diseño de estos estudios siguió los principios de la Declaración de Helsinki, y el protocolo fue aprobado por el Comité Ético de Investigaciones Clínicas de Aragón (CEICA).

De acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, utilizamos datos enmascarados, a cada ojo randomizado se le asignó un número específico único, para proteger su identidad en los análisis estadísticos. Así mismo, la base de datos se protegió con una clave para restringir el acceso únicamente a los investigadores del estudio.

### 8.1. Sujetos de estudio

Se reclutaron pacientes con EM con diagnóstico confirmado que llevaran un seguimiento de su patología en el servicio de neurología del Hospital Miguel Servet y que previamente hubieran dado su consentimiento a participar en el correspondiente estudio.

#### 8.1.1 Physiological changes in retinal layers thicknesses measured with swept source optical coherence tomography

Se reclutaron 480 sujetos sanos que participaron de forma voluntaria, sometiéndose a un examen oftalmológico para descartar patologías oftálmicas subclínicas, como glaucoma, degeneración macular asociada a la edad, etc.

Los criterios de exclusión fueron:

- Enfermedad ocular concomitante.
- Patologías sistémicas que puedan afectar el sistema visual (diabetes, etc.).
- Trauma ocular previo.
- Terapia con láser.
- Parámetros morfométricos de disco óptico sugestivos de glaucoma crónico subclínico (relación copa a disco  $\geq 0,5$ ).
- Error refractivo  $>$  de  $\pm 5$  dioptrías (D).
- Longitud axial  $< 21$  o  $> 25$  mm.
- PIO  $> 21$  mmHg.

Las mediciones de la retina se obtuvieron en todos los sujetos utilizando el dispositivo Deep Retinal Image (DRI) Triton Plus SS-OCT (Topcon, Tokio, Japón). Realizamos el protocolo OCT 3D + 5LineCross (superposición 8 de 12,0 \* 9,0 mm + 9,00 mm), solo se analizaron las imágenes con una puntuación de calidad  $> 55$  y se rechazaron las imágenes de mala calidad antes del análisis de los datos.

### 8.1.2 Computer-aided diagnosis of multiple sclerosis using a support vector machine and optical coherence tomography features

Se reclutaron 48 pacientes con EM sin episodios previos de neuritis óptica y 48 sujetos sanos que participaron de forma voluntaria (que acudieron a revisión oftalmológica o de su refracción y no presentaban patología oftálmica, alumnos de la universidad, personal, familiares y amigos).

El diagnóstico de la EM fue establecido por un neurólogo/a especialista en EM según los criterios de McDonald [96]. Se recogieron variables neurológicas como la Escala Expandida del Estado de Discapacidad (EDSS), duración de la enfermedad, tratamientos prescritos, variables oftalmológicas como PIO, longitud axial, error refractivo y variables estructurales de la OCT.

El análisis fue realizado aplicando técnicas de inteligencia artificial, principalmente máquinas de vectores de soporte (*Support vector machine*).

### 8.1.3 Diagnostic ability of multifocal electroretinogram in early multiple sclerosis using a new signal analysis method

Se reclutaron 15 sujetos con EM (11 mujeres y 4 hombres) con diagnóstico precoz (inferior a 12 meses) sin historia previa de neuritis óptica y 6 controles sanos (3 hombres y tres mujeres).

La EM se diagnosticó en base a los criterios de McDonald [96] y fue confirmada por un neurólogo. Se excluyeron los pacientes con un brote activo de EM (de cualquier déficit o localización neurológica) en los 3 meses anteriores a su reclutamiento en el estudio o en cualquiera de las visitas anuales, para evitar el efecto de la inflamación que se produce en estos brotes y que podría falsear los datos de espesores de la OCT.

Todos los sujetos se sometieron a un examen neuro-oftálmico completo, incluida la evaluación de la agudeza visual mejor corregida utilizando las tablas de Snellen y ETDRS, la sensibilidad al contraste con la prueba CSV1000, la visión del color con el test de Ishihara, los reflejos pupilares, la motilidad ocular; se realizaron exámenes del segmento anterior, presión intraocular (PIO) con el tonómetro de aplanación de Goldmann y morfología papilar mediante examen fundoscópico en todos los sujetos para detectar cualquier alteración ocular (como glaucoma primario de ángulo abierto, cataratas, patología corneal) que pudiera afectar la visión funcional o los resultados del mfERG.

### 8.1.4 Retinal and optic nerve degeneration in patients with multiple sclerosis followed up for 5 years.

Este estudio longitudinal prospectivo incluyó pacientes con EM remitente-recurrente definida y controles sanos con un seguimiento de 5 años. Se evaluaron un total de 204 ojos de 102 pacientes y 100 ojos de 50 controles sanos al inicio del estudio y luego cada año durante 5 años.

La EM fue diagnosticada en base a la revisión de 2010 de los criterios de Mc Donald [96] y confirmada por un neurólogo especialista en EM. Los criterios de exclusión fueron: AV menor de 0,1 en el optotipo de Snellen, PIO mayor a 20 mmHg, brote activo de EM de cualquier tipo en los 6 meses anteriores a su inclusión en el estudio o en cualquiera de las visitas anuales, errores

de refracción de más de 5 dioptrías de refracción de equivalente esférico o 3 dioptrías de astigmatismo.

Las variables de estudio recogidas fueron:

- Neurológicas: Puntuación de la Escala Expandida del Estado de Discapacidad (EDSS), duración de la enfermedad, tratamientos prescritos, episodios previos de neuritis óptica y puntuación de la Escala de Calidad de Vida de Esclerosis Múltiple de 54 ítems [MSQOL-54].
- Funcionales: AV con los optotipos de Snellen, test de visión cromática con prueba de Ishihara, desviación media (MD) en decibelios (dB) del campo visual, amplitud y latencia de la onda P100 de los potenciales evocados visuales (PEV).
- Estructurales: espesor de la capa de fibras nerviosas peripapilar (CFNRp), CNFR y capa de células ganglionares (CCG) en el área macular utilizando dispositivo Cirrus de OCT y el indicador de fibras nerviosas (NFI), promedio TSNIT junto con la desviación estándar (SD), promedio del espesor de CNFR superior e inferior mediante polarimetría laser GDx-VCC.

## 8.2. Protocolo exploratorio

El protocolo exploratorio realizado constó de una evaluación neurológica, examen de la función visual, electrofisiología, y evaluación estructural de la retina y del nervio óptico.

### 8.2.1 Evaluación neurológica

La valoración neurológica fue realizada por el Servicio de Neurología del Hospital Universitario Miguel Servet y proporcionaba la siguiente información:

- Tiempo de evolución de la enfermedad desde su confirmación diagnóstica.
- Fenotipo de EM (recidivante-remitente, primaria progresiva, o secundaria progresiva).
- Edad de diagnóstico.
- Tratamiento actual y tratamientos previos prescritos para la EM.
- Severidad y grado de afectación neurológica obtenido mediante la escala EDSS.
- Calidad de vida mediante el test MSQOL-54.

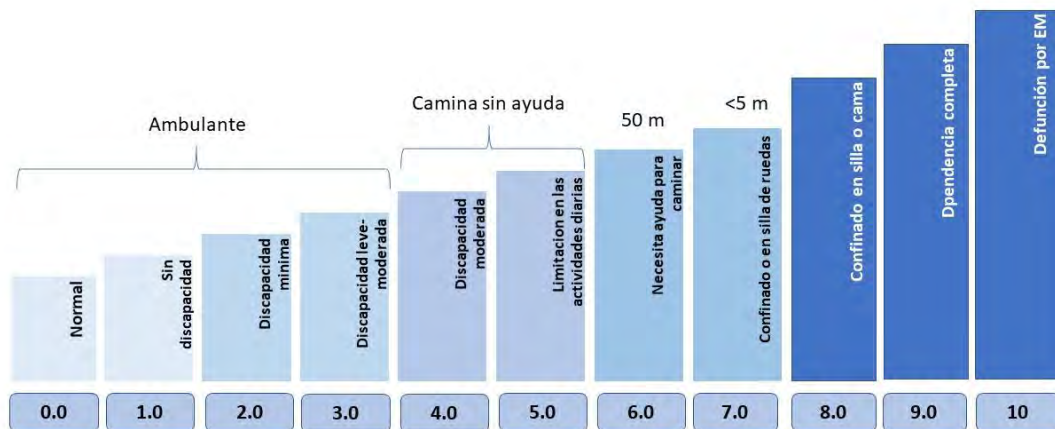
#### 8.2.1.1 Escala de severidad

La herramienta más utilizada para la evaluación de la situación funcional de los pacientes con EM es la Escala Expandida del Estado de Discapacidad (EDSS).

Aunque se basa principalmente en la capacidad para caminar (Figura 9), el examen neurológico, además, también proporciona ocho medidas de subescala, denominadas puntuaciones del sistema funcional (SF), basadas en estos ocho sistemas funcionales:

- Piramidal (función motora)
- Cerebeloso
- Tronco cerebral
- Sensorial

- Intestino y vejiga
- Visual
- Cerebral o mental
- Otros



**Figura 9:** Escala de discapacidad de Kurtzke. Muestra el grado de discapacidad, así como la capacidad de ambulación.

Los sistemas funcionales se califican en una escala de 0 (bajo nivel de problemas) a 5 o 6 (alto nivel de problemas) para reflejar mejor el nivel de discapacidad observado clínicamente. La categoría "Otros" consiste en cualquier otro hallazgo neurológico atribuido a la EM y es dicotómica, con 0 como ninguno y 1 como cualquier hallazgo detectado.

Por el contrario, la puntuación total de la EDSS está determinada por dos factores: la marcha y la puntuación del SF. Las personas con puntuaciones EDSS de 4.0 o más pueden tener algún grado de discapacidad en la marcha. Las puntuaciones entre 4.0 y 9.5 están determinadas tanto por la capacidad de andar como por las puntuaciones del SF. En aras de la simplicidad, muchos expertos miden las puntuaciones de la EDSS entre 4,0 y 9,5 enteramente según la forma de andar, sin considerar las puntuaciones del SF, pero en nuestros estudios se utilizaron tanto números enteros como con decimales.

#### 8.2.1.2 MSQOL-54

El MSQOL-54 es una medida multidimensional de la calidad de vida relacionada con la salud que combina elementos genéricos y específicos de la EM en un solo test. Se basa en el SF-36 como componente genérico al que se agregaron 18 ítems para aprovechar problemas específicos de la EM como fatiga, función cognitiva, etc. El test genera 12 subescalas junto con dos puntuaciones de resumen y dos medidas adicionales de un solo elemento.

Las subescalas son: función física, limitaciones de capacidades físicas, limitaciones de capacidades emocionales, dolor, bienestar emocional, energía, percepciones de salud, función social, función cognitiva, problemas de salud, calidad de vida general y función sexual. Las puntuaciones de resumen son el resumen compuesto de salud física y el resumen compuesto de salud mental. Las medidas de un solo elemento son la satisfacción con la función sexual y el cambio en la salud.

El MSQOL-54 es un cuestionario estructurado que el paciente generalmente puede completar con poca o ninguna ayuda, aunque también puede ser administrado por un entrevistador (Apéndice 6).

## 8.2.2 Evaluación de la función visual

### 8.2.2.1 Mejor agudeza visual corregida Snellen

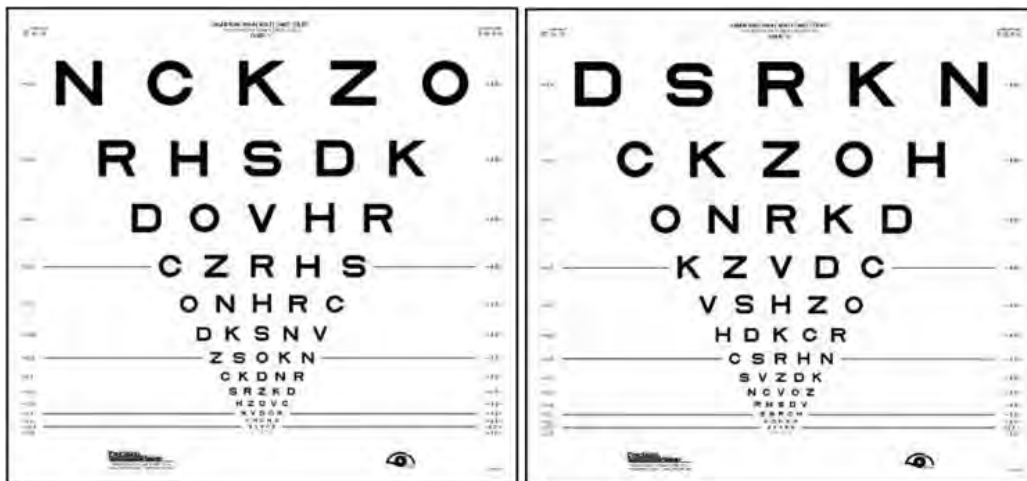


Se determinó como la mejor AV, a la obtenida tras la mejor refracción esferocilíndrica subjetiva, medida con el optotipo Snellen proyectado a 6 m en condiciones mesópicas ( $<15\text{cd/m}^2$ , con el luxómetro colocado en el centro de la pantalla de proyección, con el proyector y luces apagados) en una sala de iluminación controlada (Figura 10).

**Figura 10:** Proyector y mando del optotipo proyectado

### 8.2.2.2 Mejor agudeza visual corregida ETDRS

Se registró la mejor AV, tras la mejor refracción esferocilíndrica subjetiva, medida con el optotipo ETDRS colocado a 4 m y en condiciones mesópicas (Figura 11).



**Figura 11:** Lámina 1 (izquierda) y lámina 2 (derecha). Cada fila contiene 5 letras, el espacio entre ellas es proporcional al espacio de las letras, así como el espacio entre filas

Se utilizó la lámina R (“refracción”) para determinar la refracción subjetiva y la AV del ojo derecho (OD) con la lámina 1 y la del ojo izquierdo (OI) con la lámina 2 para evitar el efecto memoria. Se determinó la AV en escala logMAR (logaritmo del mínimo ángulo de resolución) como la última línea en la que el paciente fue capaz de leer 3 o más letras (0,02 unidades logarítmicas por cada letra leída).

### 8.2.2.3 Test Ishihara

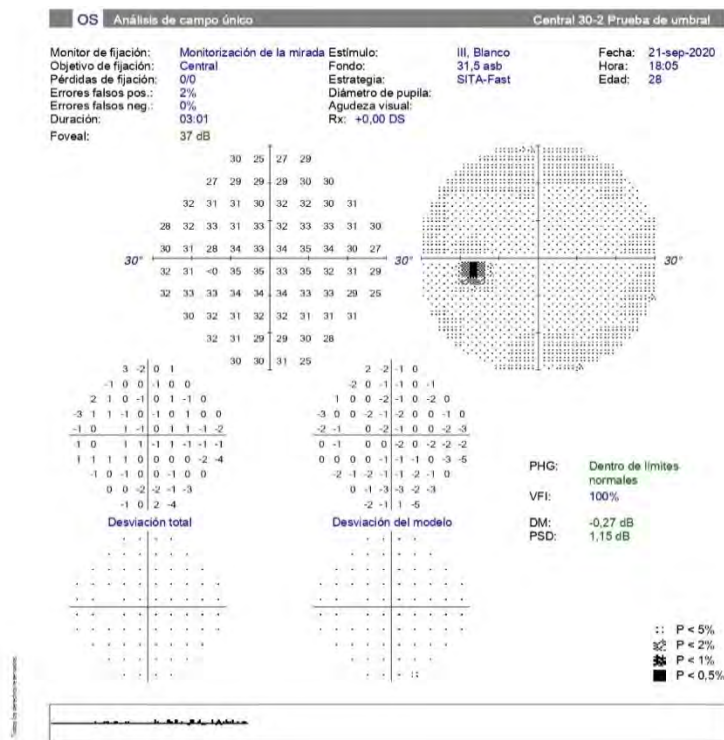
Esta prueba de visión cromática se realizó en condiciones fotópicas (alta luminosidad) con la mejor corrección para distancia cercana. Se realizó de forma monocular, presentado las láminas (Figura 12) en un ángulo de observación recomendado de 45°, mostrando cada lámina entre 4 y 15 segundos.



**Figura 12:** Láminas pseudocromáticas de Ishihara. Incluyen un patrón de puntos entre los que puede distinguirse un numero o un recorrido. El test completo se compone de 38 láminas.

### 8.2.2.4 Campimetría 30-2

Se utilizó el analizador de campo Humphrey (HFA) II (Zeiss, Alemania), seleccionando la estrategia 30-2 SITA estándar, blanco-blanco, umbral completo y estímulo III, realizando el campo en condiciones escotópicas y de forma monocular con la mejor refracción determinada por el propio aparato (Figura 13). Se repitieron los test con una tasa de falsos positivos/negativos >15% y/o más de tres pérdidas de fijación, y en los casos en los que no fue posible lograr una prueba válida, se excluyó del análisis.

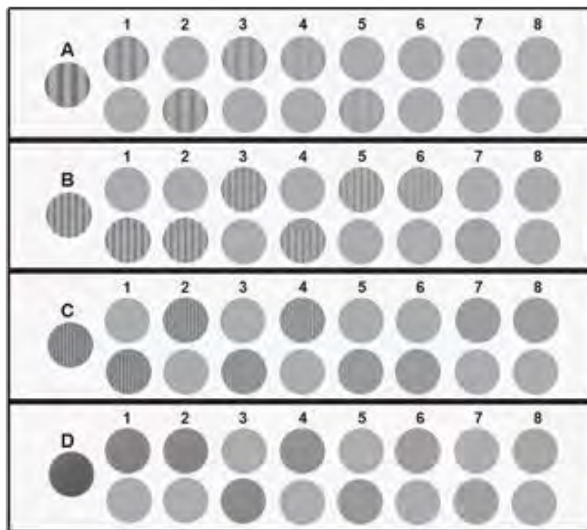


**Figura 13:** Campo SITA-standar 30-2, muestra el mapa de desviación total, desviación del modelo, y los indicadores de patrón del hemicampo de glaucoma, índice de campo visual, desviación media y desviación estándar del patrón



### 8.2.2.5 Sensibilidad al contraste CSV-1000

La sensibilidad al contraste fue determinada con el test CSV-1000, en condiciones mesópicas, a 2,5 metros y con su mejor corrección.



Esta prueba mide la sensibilidad al contraste en las frecuencias espaciales de 3 (A), 6 (B), 12 (C) y 18 (D) ciclos por grado. Cada frecuencia tiene 8 niveles de contraste, que va variando gradualmente a lo largo de dos filas de círculos, donde uno presenta el estímulo y el otro no. Los pacientes debían determinar en cuál de los dos se encontraba el estímulo, anotando el último nivel determinado correctamente (Figura 14).

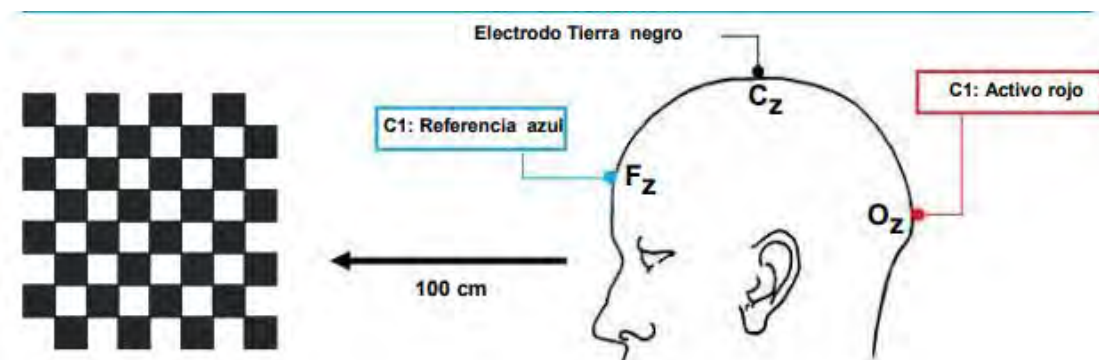
**Figura 14:** Test CSV-1000. Se observan las 4 frecuencias espaciales, 3 (A), 6 (B), 12 (C) y 18 (D) ciclos por grado y los 8 niveles de contraste

### 8.2.3 Electrofisiología

#### 8.2.3.1 Potenciales evocados visuales

Los PEV fueron realizados por el servicio de neurofisiología del Hospital Universitario Miguel Servet. Se colocó un electrodo de referencia a nivel del nasión, otro activo a nivel del anión y otro a modo de toma de tierra.

Las mediciones se registraron de forma monocular con su mejor corrección, en condiciones fotópicas, con el paciente colocado a 1 metro del monitor (Figura 15).

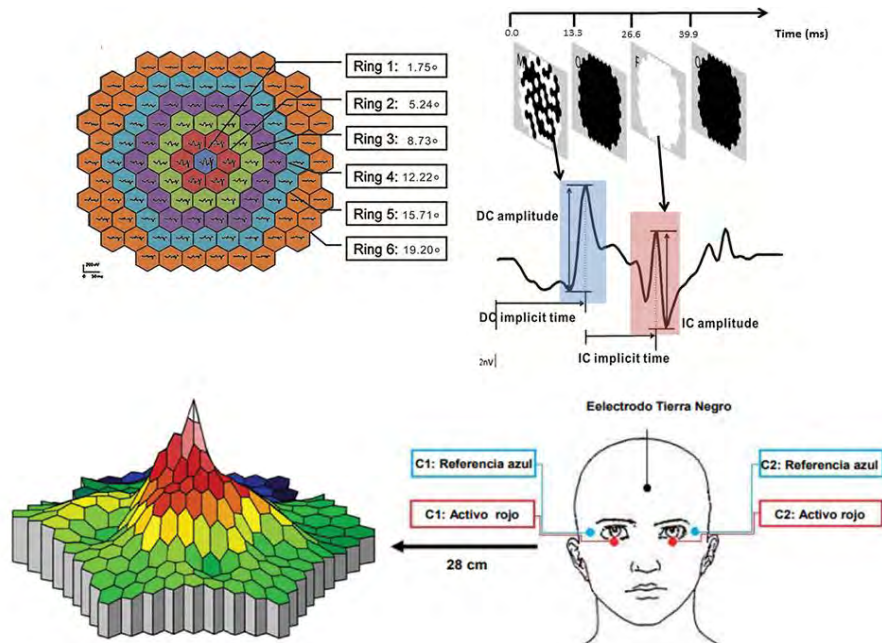


**Figura 15:** Disposición de los electrodos y patrón visualizado por el paciente. Fz= frontal, Cz = central o Vertex y el Pz= Parietal. Guía rápida Retisystem Versión: 19-99\_04\_7.5S (Topcon)

### 8.2.3.2 Electrorretinograma multifocal

Se realizó en la Unidad de Función Visual del servicio de oftalmología, mediante el dispositivo Retiport Retiscan (Roland Consultant, Alemania)

Las mediciones se registraron de forma monocular tras dilatación, con una adición de 3 dioptrías sobre su mejor corrección, en condiciones fotópicas y con el paciente colocado a 28cm del monitor. Se colocó a los pacientes un electrodo toma de tierra en el nasión, dos electrodos cutáneos de referencia y dos electrodos activos DTL (plata/nílon de grado médico) en el fórnix (Figura 16).



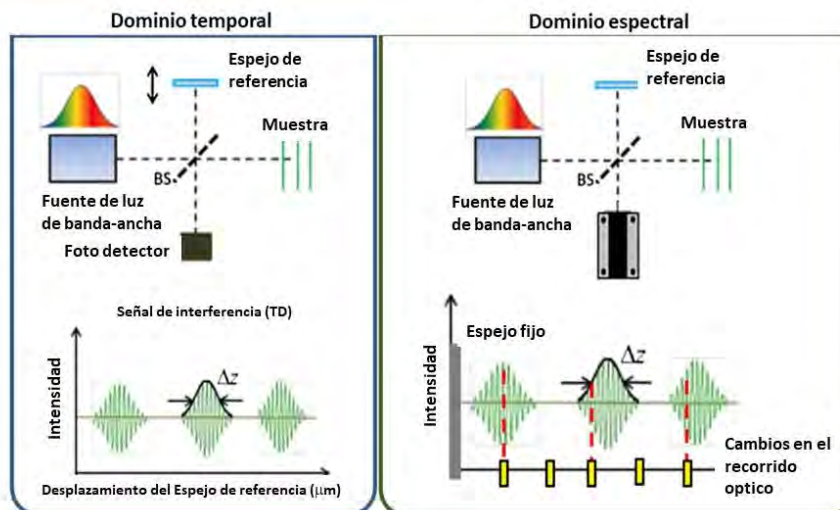
**Figura 16:** Disposición de los electrodos, patrón visualizado por el paciente, distribución del patrón de las áreas analizadas y mapa topográfico tridimensional basado en la amplitud de P1.

## 8.2.4 Estudio estructural

### 8.2.4.1 Tomografía de coherencia óptica Cirrus

La tomografía de coherencia óptica (OCT) a menudo se describe como el análogo óptico de la ecografía por ultrasonido, que genera imágenes utilizando el retardo de tiempo y la magnitud de los ecos de la luz. La OCT está basada en el interferómetro de Michelson, analizando las interferencias entre la señal de un objeto bajo investigación y una señal de referencia local.

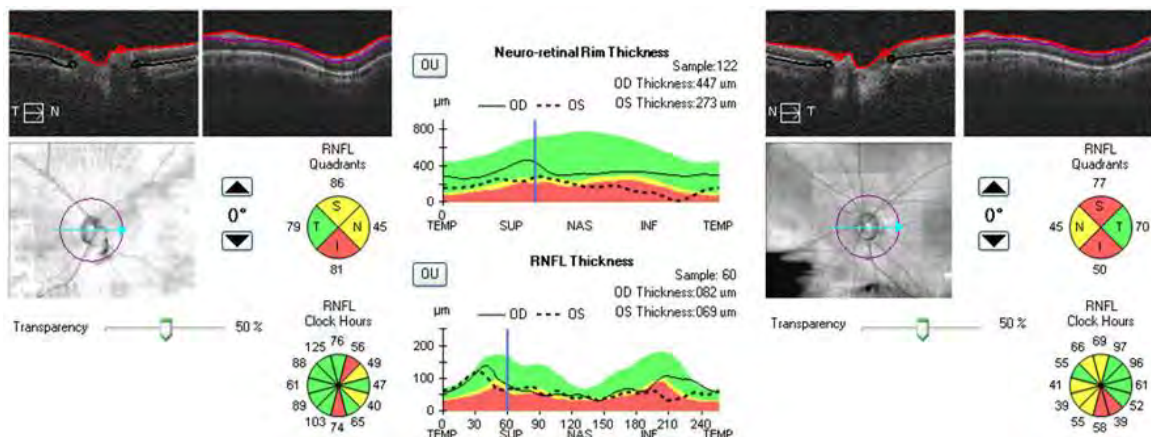
En comparación con los antiguos TD-OCT (OCT de dominio tiempo) los actuales SD-OCT (OCT de dominio espectral), presentan un esquema muy similar, pero basado en la espectrometría. El espejo de referencia móvil ahora se inmoviliza y el detector se reemplaza por un espectrómetro. Y aquí es donde intervienen las transformadas de Fourier, ya que una medición espectral producirá un perfil de exploración similar al obtenido en un TD-OCT. Sin embargo, en este caso, la contribución de la señal de dos o más interfaces se puede recopilar simultáneamente, ya que contribuyen sobre diferentes componentes de oscilación espectral (Figura 17).



**Figura 17:** Diferencias entre la tomografía de coherencia óptica de dominio temporal y espectral

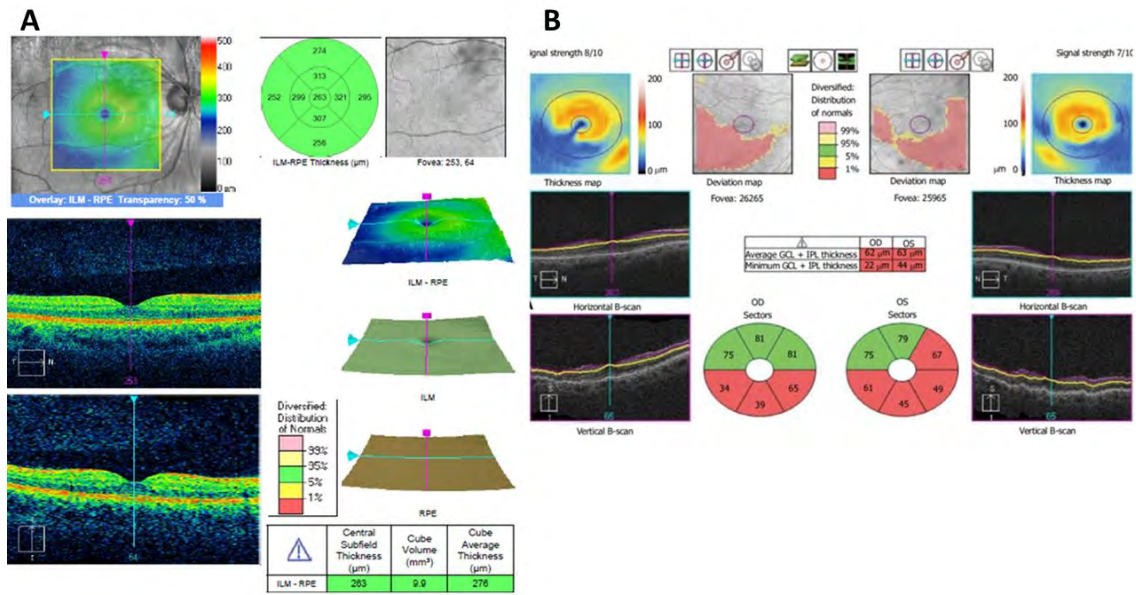
Se emplearon dos protocolos de adquisición:

- Protocolo Optic disc cube 200x200 para CFNR (Figura 18)  
 Analiza un área de 6mm<sup>3</sup> alrededor del nervio óptico, y se registran las variables del espesor medio en los sectores superior, inferior nasal y temporal, así como en 12 sectores horarios y el espesor promedio total.



**Figura 18:** Análisis de capa de fibras nerviosas proporcionado por el protocolo 2020x200 de nervio óptico. Muestra el grafico de doble joroba y un análisis por sectores.

- Protocolo macular 512x128 para espesores y volumen macular:  
 Analiza el espesor de la retina desde la membrana limitante interna hasta el epitelio pigmentario de la retina, proporcionando el espesor en las nueve áreas ETDRS. Se trata de tres anillos (1,3 y 6 mm) ubicados en torno a la fóvea (anillo 1), los anillos 1 y 2 a su vez se dividen en superior, inferior, nasal y temporal. Además, también aporta el espesor subfoveal y el promedio del cubo.  
 Este mismo protocolo presenta un subanálisis exclusivo para la CCG, mostrando el espesor en los sectores superior, superonasal, inferonasal, inferior, inferotemporal y superotemporal, así como los espesores promedio y mínimo de la CCG+capa plexiforme interna (Figura 19).

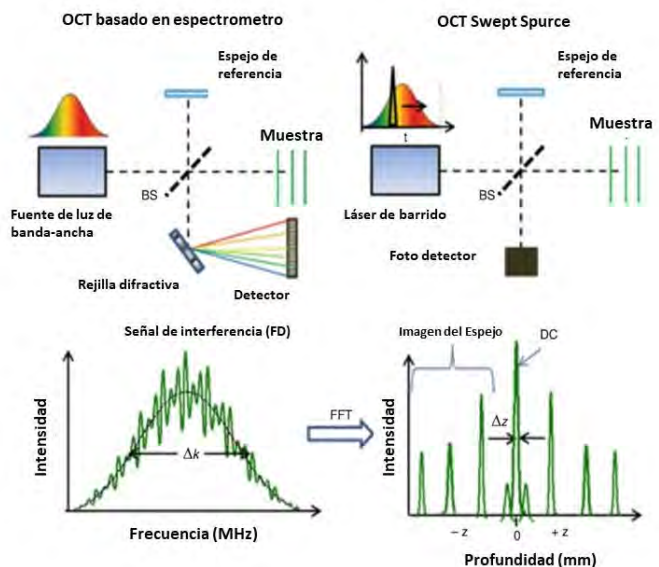


**Figura 19:** A. Análisis del espesor total de la retina del protocolo macular 512x512. B Análisis del espesor de capa de células ganglionares obtenido mediante el mismo protocolo.

#### 8.2.4.2 Tomografía de coherencia óptica Triton

La nueva generación de OCT añade una mejora sobre el SD-OCT, incorporando un láser de barrido como fuente de luz y un detector de fotodiodo único (Figura 20), y se denomina Swept Source (SS-OCT). Esta mejora permite velocidades de escaneo más rápidas, unos 100.000 Hz, lo que proporciona imágenes tridimensionales más precisas de la retina e incluso de la coroides, con resoluciones axiales y transversales de 8 y 20  $\mu\text{m}$  en el tejido, respectivamente.

SS-OCT posee una longitud de onda de 1.050 nm, permitiendo una visualización en profundidad del ojo desde la retina hasta la esclerótica incluso en sujetos con cataratas moderadas a severas. Los sistemas SS-OCT tienen la capacidad de obtener imágenes simultáneas de la retina y la coroides con mayor eficiencia de detección, ya que son menos propensos a la dispersión.



**Figura 20:** Diferencias entre tomografía de coherencia óptica basa en espectrometría y Swept Source

Las imágenes fueron adquiridas con el dispositivo Triton (Topcon,Japan), utilizando dos protocolos:

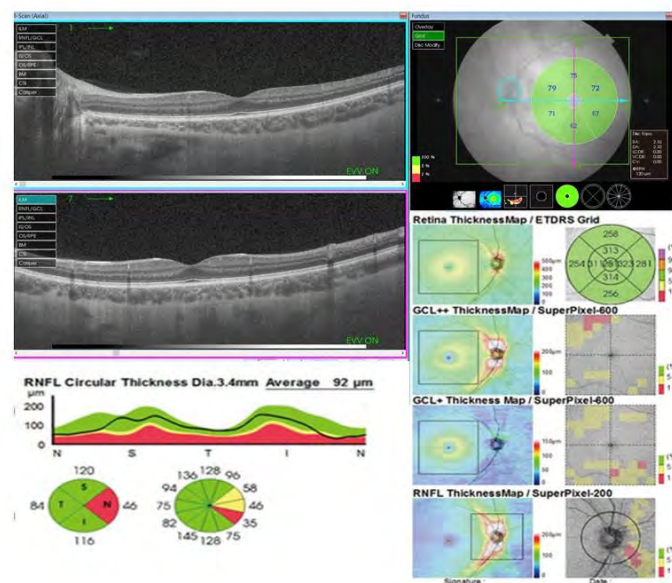
- 3D Wide

Este protocolo incluye un escaneo de 9 mm de alto × 12 mm de ancho que se centra tanto en la mácula (ETDRS: exploración del estudio de retinopatía diabética de tratamiento temprano) como en el área peripapilar (TSNIT: exploración temporal-superior-nasal-inferior-temporal).

La exploración ETDRS proporciona las nueve áreas maculares clásica, así como el espesor central subfoveal, el espesor medio y el volumen macular.

El diámetro del área peripapilar medido con la exploración TSNIT es de 3,40 mm. El análisis TSNIT proporciona datos de los 4 cuadrantes peripapilares (superior, nasal, inferior y temporal) y 6 sectores (superonasal, superotemporal, nasal, temporal, inferonasal e inferotemporal) (Figura 21).

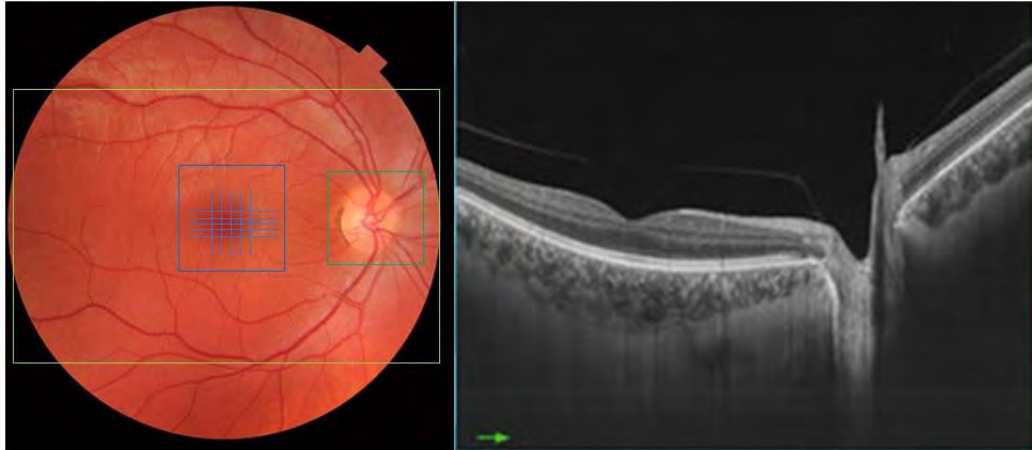
Ambos análisis proporcionan mediciones independientes y automatizadas de diferentes capas. A nivel macular y peripapilar, se registraron los espesores de la CFNR (entre la membrana limitante interna -ILM- y los límites de CCG), y a nivel macular se registraron también los espesores de la GCL + (entre la CFNR y los límites de la capa nuclear interna), GCL ++ (entre la ILM y los límites de la capa nuclear interna), el espesor de la retina (entre la ILM y el epitelio pigmentario de la retina), y de la coroides.



**Figura 21:** Corte estructural centrado en macula. Este protocolo proporciona un análisis macular que incluye mapas de desviación para cada capa, así como el análisis TSNIT de capa de fibras nerviosas peripapilar.

- 3D+5line cross

Este protocolo se basa en la superposición de un protocolo macular 3D Macula (H) 7\*7mm y un protocolo peripapilar 3D Disc de 6\*6mm de ancho (Figura 22) generando una medición de 12\*9mm, de igual manera que el protocolo Wide, anteriormente explicado.

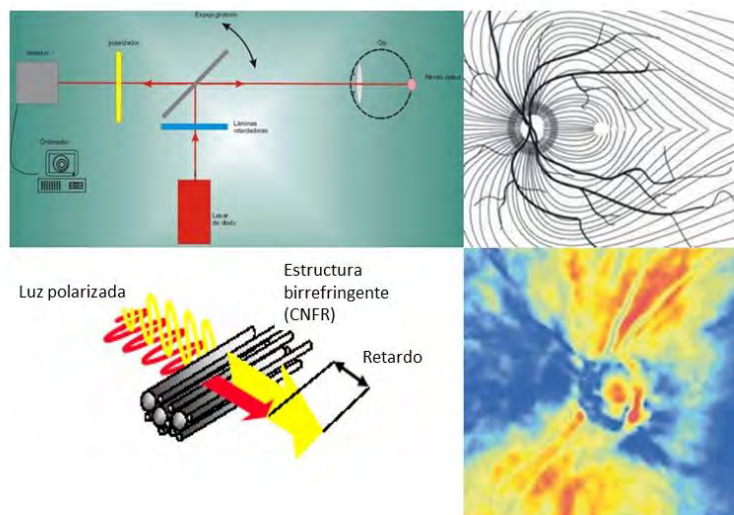


**Figura 22:** Se muestra el cubo macular centrado en la fóvea y el cubo peripapilar centrado en el nervio óptico. Genera 5 A scans horizontales y 5 verticales para el análisis estructural de la retina.

#### 8.2.4.3 Polarimetría laser GDx

La polarimetría laser, uno de los métodos más antiguos para el diagnóstico y seguimiento de glaucoma, y se basa en el principio de birrefringencia de medios.

Utiliza luz emitida por un diodo láser y polarizada en dos rayos perpendiculares atraviesa la retina. Debido a las propiedades polarizantes de los microtúbulos de los axones que forman la CFNR, cada uno de estos rayos pasa a través de esta capa a una velocidad ligeramente diferente (Figura 23); cuanto más 'acorde' es la configuración de las capas con la dirección de propagación de la onda, más rápido pasa esta. Después la luz se refleja en el epitelio pigmentado, regresa al detector, pasando nuevamente a través de la capa de fibra nerviosa, repitiéndose así el proceso.



**Figura 23:** Representación de los componentes en que se basa la polarimetría. Se observan los dos rayos de luz polarizada que atraviesan la capa de fibras nerviosas de la retina y viajan a velocidades diferentes.

### 8.3. Variables

Las variables seleccionadas para nuestro estudio fueron (Tabla 1):

<b>Demográficas</b>	Sexo Edad	
<b>Neurológicas</b>	Fenotipo de EM Edad al diagnóstico Tiempo de evolución Tratamiento Puntuación EDSS Puntuaciones MDQOL-54	
<b>Oftalmológicas</b>	PIO Episodios de NO	
<b>Función visual</b>	AV Snellen	Puntuación decimal
	AV ETDRS	Puntuación log MAR
	Ishihara	nº de láminas correctas
	Campo visual	Desviación media (MD)
	CSV-1000	Frecuencia A, B, C y D
<b>Estructurales</b>	GDx-VCC	NFI
		TSNIT promedio (mm)
		Espesor superior (mm)
		Espesor inferior (mm)
		TSNIT SD ( $\mu\text{m}$ )
	Cirrus OCT	Espesor total CFNR ( $\mu\text{m}$ )
		Espesor CFNR ( $\mu\text{m}$ ) S, N, T e I
		Espesor total CCG+IPL ( $\mu\text{m}$ )
		Espesor mínimo CCG+IPL ( $\mu\text{m}$ )
		Espesor CCG ( $\mu\text{m}$ ) foveal
	Triton OCT	Espesor CCG ( $\mu\text{m}$ ) I, IN, N, SN, S, ST, T, IT
Espesor macular de CNFR, GCL+, GCL++, coroides y espesor total de la retina		
<b>Electrofisiología</b>	PEV	Latencia onda P100
	mfERG	Amplitud y latencia de P1 y N1

**Tabla 1:** Variables recogidas en los cuatro artículos. Abreviaturas: I, inferior; S, superior; T, temporal; N, nasal; IN: inferonasal, IT, inferotemporal, SN, superonasal; ST, superotemporal, CFNR, capa de fibras nerviosas de la retina CCG, capa de células ganglionares; IPL, capa plexiforme interna; PEV, potenciales evocados visuales; mfERG, electroretinograma multifocal; SD, desviación estándar; NFI, indicador de fibras nerviosas; PIO, presión intraocular; EDSS, escala expandida de discapacidad; ETDRS, Early treatment Diabetic Retinopathy Study; GCL+, entre CFNR y los límites de la capa nuclear interna; GCL++, entre la membrana limitante interna y los límites de la capa nuclear interna.

## 8.4. Recogida y análisis de datos

Todas las variables citadas anteriormente se registraron en diferentes bases de datos correspondientes a cada uno de los estudios que componen esta tesis, con el programa Excel 2010 (Microsoft Office).

Cada uno de los análisis estadísticos se realizó con el programa SPSS versión 20.0 (SPSS Inc., Chicago, United States) y/o el Statgraphics Centurion XVII (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA). Se comprobó el ajuste a la normalidad mediante el test de Kolmogorov-Smirnov para cada una de las variables.

La aplicación de técnicas de inteligencia artificial, principalmente máquinas de vectores de soporte (Support vector machine), fue realizada por el grupo de ingenieros biomédicos del departamento de electrónica de la Universidad de Alcalá de Henares liderado por Luciano Boquete.

A continuación, se detalla la estadística individual de cada uno de los estudios.

1. Elisa Viladés, Amaya Pérez-del Palomar, José Cegoñino, Javier Obis, María Satue, Elvira Orduna, Luis E Pablo, Marta Ciprés, Elena Garcia-Martin. **Physiological changes in retinal layers thicknesses measured with swept source optical coherence tomography.** Plos One 2020. In press

Se trata de un estudio traslacional observacional que incluyó a 463 sujetos sanos, el objetivo fue evaluar los cambios fisiológicos relacionados con la edad en todas las capas de la retina en las áreas macular y peripapilar.

Se realizó un análisis comparativo entre los 4 grupos de edad en relación a las variables de espesores de la CFNR, GCL+, GCL++, coroides y espesor total de la retina, para encontrar diferencias en cada uno de los 200 puntos obtenidos en el análisis Disc 5.2x5.2-Superpixelgrid-200, organizados en cuatro cuadrantes (temporal superior -TS-; temporal inferior -TI-; nasal superior -NS-; y nasal inferior -NI-) y cuatro mitades (superior, inferior, nasal y temporal).

La comparación entre grupos de edad se realizó mediante el test ANOVA para cada medición de espesor en los cuatro cuadrantes y cuatro mitades. Se realizó un análisis post-hoc para valorar la existencia de diferencias estadísticas en cada comparación entre los cuatro grupos de edad (Grupo 1 en comparación con el Grupo 2; Grupo 1 en comparación con el Grupo 3; Grupo 1 en comparación con el Grupo 4; Grupo 2 en comparación con el Grupo 3; Grupo 2 en comparación con el Grupo 4 y el Grupo 3 en comparación con el Grupo 4). En todos los análisis se utilizó la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples.



2. Carlo Cavaliere, Elisa Vilades, M<sup>a</sup> C Alonso-Rodríguez, María Jesús Rodrigo, Luis Emilio Pablo, Juan Manuel Miguel, Elena López-Guillén, Eva María Sánchez Morla, Luciano Boquete, Elena Garcia-Martin. **Computer-aided diagnosis of multiple sclerosis using a support vector machine and optical coherence tomography features.** Sensors (Basel) 2019;19(23):5323.

Se trata de un estudio traslacional observacional que incluyó a 48 sujetos sanos y 48 pacientes con EM-RR sin episodios previos de neuritis óptica. El objetivo fue evaluar la viabilidad diagnóstica de la OCT para detectar EM utilizando una SVM como clasificador automático.

Se realizó un análisis comparativo entre sujetos sanos y sujetos con EM para determinar la capa más eficiente a la hora de detectar diferencias entre sujetos, mediante una máquina de soporte de vectores. El clasificador se implementó utilizando la aplicación Classification Learner incluida en Statistics and Machine Learning Toolbox 11.6 de MATLAB (Mathworks Inc., Natick, MA, EE. UU.).

Las comparaciones entre grupos se analizaron mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov (K-S) para comprobar su distribución, la prueba de Fisher para estudiar las diferencias en las varianzas, la prueba T de Student para analizar las medias y la de Mann-Whitney Wilcoxon para comparar las medianas. Se estableció el nivel de significatividad en 0,05.

Las correlaciones se estimaron con el coeficiente de Pearson. El área bajo la curva ROC (receiver operating characteristics) se utilizó para evaluar la capacidad de discriminación de la característica propuesta en este estudio.

3. Luciano Boquete, Elena López-Guillén, Elisa Vilades, Juan Manuel Miguel-Jiménez, Luis Emilio Pablo, Luis De Santiago, Miguel Ortiz del Castillo, María Concepción Alonso-Rodríguez, Eva María Sánchez Morla, Almudena López-Dorado, Elena Garcia-Martin. **Diagnostic ability of multifocal electroretinogram in early multiple sclerosis using a new signal analysis method.** PLoS One 2019;14(11): e0224500.

Se trata de un estudio transversal observacional para determinar si un nuevo análisis de señales podría incrementar la capacidad diagnóstica del mfERG en pacientes en estadios iniciales de EM-RR. Para ello se reclutaron 15 pacientes de reciente diagnóstico y 6 controles sanos.

La normalidad de los resultados se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk (W). Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante la prueba T de Student para muestras independiente en distribuciones normales y la prueba U-Mann-Whitney (Wilcoxon) en distribuciones no paramétricas. Las diferencias entre los métodos se evaluaron utilizando la prueba T de Student para muestras dependiente en distribuciones normales (prueba T de muestras pareadas). Las correlaciones se realizaron mediante el coeficiente de Pearson.

Se utilizó MATLAB (Mathworks Inc., Natick, MA, EEUU), para obtener un modelo de señal a partir de las medidas de los 6 controles sanos, luego se comparó la señal de los sujetos con EM-RR con la señal modelo usando el error cuadrático medio estandarizado.

4. Elena Garcia-Martin, Jose Ramón Ara, Jesus Martín, Carmen Almarcegui, Isabel Dolz, Elisa Vilades, Laura Gil-Arribas, Francisco Javier Fernandez, Vicente Polo, Jose Manuel Larrosa, Luis Emilio Pablo, Maria Satue. **Retinal and optic nerve degeneration in patients with multiple sclerosis followed up for 5 years.** Ophthalmology 2017; 124(5):688-696.

Se trata de un estudio prospectivo longitudinal realizado en 50 sujetos sanos y 102 pacientes con EM-RR. El objetivo de este estudio fue evaluar los cambios estructurales y funcionales a lo largo de 5 años.

Se analizó la agudeza visual, la visión del color (placas pseudoisocromáticas de Ishihara), el campo visual, el volumen y el espesor macular correspondiente a las 9 áreas del ETDRS, la CFNR de los 4 cuadrantes del nervio óptico y el espesor de la CCG en las 6 áreas del cubo macular, con el dispositivo Cirrus HD, la polarimetría láser de barrido, los potenciales evocados visuales, y las variables neurológicas (EDSS y test MSQOL-54).



## 9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

19/10/2020

Correo: Elisa vp - Outlook

Notification of Formal Acceptance for PONE-D-20-02557R1 - [EMID:e5d69d47cfc12329]

PLOS ONE <em@editorialmanager.com>

Lun 05/10/2020 17:21

Para: Elisa Viladés <elsavilades@hotmail.com>

You are being carbon copied ("cc'd") on an e-mail "To" "Elena García-Martin" egmvivax@yahoo.com

CC: "Elisa Viladés" elisavilades@hotmail.com, "Amaya Pérez-del Palomar" amaya@unizar.es, "José Cegoñino" jcegoni@unizar.es, "Javier Obis" jobal89@hotmail.com, "María Satue" mariasatue@gmail.com, "Luis E Pablo" lpablo@unizar.es, "Marta Ciprés" martacipres90@gmail.com, "Elvira Orduna" elvisabi14@hotmail.com

PONE-D-20-02557R1

Physiological changes in retinal layers thicknesses measured with swept source optical coherence tomography.

Dear Dr. García-Martin:

I'm pleased to inform you that your manuscript has been deemed suitable for publication in PLOS ONE. Congratulations! Your manuscript is now with our production department.

If your institution or institutions have a press office, please let them know about your upcoming paper now to help maximize its impact. If they'll be preparing press materials, please inform our press team within the next 48 hours. Your manuscript will remain under strict press embargo until 2 pm Eastern Time on the date of publication. For more information please contact [onepress@plos.org](mailto:onepress@plos.org).

If we can help with anything else, please email us at [plosone@plos.org](mailto:plosone@plos.org).

Thank you for submitting your work to PLOS ONE and supporting open access.

Kind regards,  
PLOS ONE Editorial Office Staff

on behalf of  
Dr. Sanjoy Bhattacharya  
Academic Editor  
PLOS ONE

---

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/pone/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

Viladés E

1 **Physiological changes in retinal layers thicknesses measured with swept source optical coherence**  
2 **tomography.**

3 **AUTHORS:**

4 Elisa Viladés<sup>1,2</sup>, Amaya Pérez-del Palomar<sup>2,3</sup>, José Cegoñino<sup>2,3</sup>, Javier Obis<sup>1</sup>, María Satue<sup>1,2</sup>, Elvira  
5 Orduna<sup>1,2</sup>, Luis E Pablo<sup>1,2</sup>, Marta Ciprés<sup>1,2</sup>, Elena Garcia-Martin<sup>1,2\*</sup>.

6 **AFFILIATIONS:**

7 1 Department of Ophthalmology, Miguel Servet University Hospital, Zaragoza (Spain)

8 2 Aragon Institute for Health Research (IIS Aragón). University of Zaragoza. Zaragoza (Spain).

9 3 Mechanical Engineering Department. Aragon Institute of Engineering Research. University of  
10 Zaragoza, Zaragoza (Spain)

11 **CORRESPONDING AUTHOR:**

12 Email: [egmvivax@yahoo.com](mailto:egmvivax@yahoo.com) (EGM)

13

14 **RUNNING HEAD:** Changes in retinal layers related with age

15

16 **KEYWORDS:** Retina, Age, OCT, Swept-source, optical coherence tomography, retinal layers

17

18 The authors have no financial support or conflict of interest.

19 All subjects gave detailed consent to participate in this study, which was conducted in accordance with  
20 the guidelines determined by the Ethics Committee of the Miguel Servet Hospital and the principles of  
21 the Declaration of Helsinki.

22 Financial Support: This work was supported by PI17/01726 (Instituto de Salud Carlos III) and by  
23 MAT2017-83858-C2-2 MINECO/AEI/FEDER, UE, DPI2016-79302R

24

25

26 **Abstract**

27 Purpose: To evaluate the physiological changes related with age of all retinal layers thickness  
28 measurements in macular and peripapillary areas in healthy eyes.

29 Methods: Wide protocol scan (with a field of view of 12x9 cm) from Triton SS-OCT instrument (Topcon  
30 Corporation, Japan) was performed 463 healthy eyes from 463 healthy controls. This protocol allows to  
31 measure the thickness of the following layers: Retina, Retinal nerve fiber layer (RNFL), Ganglion cell layer  
32 (GCL+), GCL++ and choroid. In those layers, mean thickness was compared in four groups of ages: Group  
33 1 (71 healthy subjects aged between 20 and 34 years); Group 2 (65 individuals aged 35-49 years), Group  
34 3 (230 healthy controls aged 50-64 years) and Group 4 (97 healthy subjects aged 65-79 years).

35 Results: The most significant thinning of all retinal layers occurs particularly in the transition from group  
36 2 to group 3, especially in temporal superior quadrant at RNFL, GCL++ and retinal layers ( $p \leq 0.001$ ), and  
37 temporal superior, temporal inferior, and temporal half in choroid layer ( $p < 0.001$ ). Curiously group 2  
38 when compared with group 1 presents a significant thickening of RNFL in temporal superior quadrant  
39 ( $p = 0.001$ ), inferior ( $p < 0.001$ ) and temporal ( $p = 0.001$ ) halves, and also in nasal half in choroid layer  
40 ( $p = 0.001$ ).

41 Conclusions: Excepting the RNFL, which shows a thickening until the third decade of life, the rest of the  
42 layers seem to have a physiological progressive thinning.

43  
44  
45  
46  
47

## 48 **Introduction**

49 Currently OCT is widely used in clinical practice and clinical trials accepting their measurements for the  
50 evaluation of the response to treatment and the progression of pathologies. <sup>[1]</sup> Retinal thickness or  
51 central macular thickness (CMT) measured with OCT is particularly used, which correlates with  
52 pathological changes and response to treatment for a variety of eye diseases. <sup>[2]</sup>

53 Currently we still accept the thickness of the retina as the space between surfaces detected, but retinal  
54 image segmentation is challenging; structures such as vascular structures, macula, and microaneurysms  
55 have low contrast with their background. In contrast, other structures have high contrast with  
56 background tissues, but they are difficult to distinguish using classical segmentation techniques. <sup>[1,3]</sup>

57 Also, recent works have shown that the most commonly used algorithms in daily practice for retinal layer  
58 segmentation have a large number of segmentation errors, especially in the case of age-related macular  
59 degeneration, great disruptive pathology such as subretinal fluid, intraretinal cysts and retinal  
60 detachments that interrupt the structured logical organization of the retinal layers. <sup>[4,5]</sup>

61 Currently we can classify the existing segmentation algorithms into two clusters, mathematical modeling  
62 and machine learning approaches. Mathematical modeling is based on the previous anatomical,  
63 structural and clinical knowledge that is known about the retina. However pure machine learning  
64 algorithms for retinal layer segmentation classifies each pixel from an image on how they fall under a  
65 particular layer or boundary, that means that boundaries between layers are not linear. <sup>[2]</sup>

66 Swept-source (SS)-OCT offers potential advantages due to a modified Spectral-domain (SD) and depth  
67 resolved technology which includes an improved imaging range, minor sensitivity roll-off with imaging  
68 depth, greater detection efficiencies, and an adjustability to longer imaging wavelengths of 1050nm, this



69 allows a greater choroidal penetration and higher speed for image acquisition. The main difference of SS-  
70 OCT is that captures the interferences of the backscattered light from the retina thanks to a wavelength  
71 sweeping laser light source and a photodiode detector, in contrast to SD-OCT where a line scan camera  
72 and a spectrometer record the interferences between a broadband light source. Those improvements on  
73 SS-OCT enables higher density raster scan protocols and deeper image penetration, as a result on en-face  
74 reconstructions a better visualization of choroidal detail is possible.<sup>[6]</sup>

75 Swept-source (SS)-OCT with a wavelength of 1,050 nm and 100,000 A-scans/sec has allowed in-depth  
76 visualization of the eye from the retina to the sclera even in patients with moderate to severe cataracts,  
77 as well as during eye blinking and/or ocular movement. SS-OCT systems have the potential for superior  
78 and simultaneous imaging of the retina and choroid because of the longer wavelength, potentially higher  
79 detection efficiency, and lower dispersion.<sup>[7]</sup>

80 Choroidal thinning has been considered more and more important in the last months, because it has  
81 been associated with some ophthalmological pathologies such as age-related macular degeneration  
82 (AMD), and also in neurodegenerative diseases such as multiple sclerosis <sup>[8]</sup>, Parkinson's disease <sup>[9]</sup> or  
83 Fibromyalgia <sup>[10]</sup> and systemic conditions like diabetes mellitus <sup>[11]</sup> or pathologies with unclear  
84 physiopathology such as migraine. <sup>[12,13]</sup>

85 Also, age has been found to be negatively correlated with central choroidal thickness and with central  
86 choroidal volume <sup>[14]</sup>, choroidal thickness and volume are also negatively statistically significant  
87 concerning the refractive error, and axial length measured with low-coherence reflectometry was also  
88 found to be negatively correlated with choroidal thickness and volume. On the other hand, sex has not  
89 been found to influence choroidal thickness significantly. <sup>[15]</sup>

90 Imaging of the choroid was dramatically improved with the development of spectral domain optical

91 coherence tomography (SD-OCT) and was further augmented with the advantage of enhanced depth  
92 imaging SD-OCT (EDI SD-OCT) by Spaide and colleagues.<sup>[16]</sup>

93 Even though, standard cross-sectional (Bscan) OCT imaging are still limited, consequently the choroidal  
94 assessment is not as detailed as it could be. However, en-face OCT imaging, is able to provide a high-  
95 definition three-dimensional and depth-resolved reconstruction of the choroid, revealing choroidal  
96 vascular details not easily visible on cross-sectional OCT imaging. Despite this, SD-OCT is the gold  
97 standard for clinical assessment and management of chorioretinal disorders, nevertheless the limited  
98 depth of penetration (~850nm), could compromise the choroidal assessment although the selection of  
99 the enhanced depth imaging (EDI) method.<sup>[7]</sup>

100 In the absence of automated segmentation software for SS OCT systems, previous investigators have  
101 used manual (mostly single-point) measurement techniques using in-built calipers or modification of  
102 retinal segmentation lines to evaluate choroidal thickness; given the high anatomic variability of the  
103 choroid, these are impractical for clinical use, are highly dependent on location of measurement, and  
104 may be subject to further operator effects.<sup>[17]</sup> Nevertheless, SS-OCT provides objective and automated  
105 measurements of the choroid.

106

## 107 **Materials and methods**

108 Between 2015 and 2018, 480 healthy white caucasian patients were recruited for this cross-sectional  
109 study. The inclusion criteria were age between 20 and 79 years, refractive error less than  $\pm 5$  diopters (D),  
110 axial length between 21 and 25 mm, intraocular pressure less than 21mmHg. The exclusion criteria were  
111 concomitant ocular disease (such as glaucoma or retinal pathology); systemic pathologies that could  
112 impair the visual system; ocular trauma; laser therapy; and pathology affecting the optic nerve and retina  
113 (such as glaucoma, optic neuritis, macular degeneration). We excluded eyes with morphometric

114 parameters of optic disc suggestive of subclinical chronic glaucoma (cup to disc ratio $\geq$ 0.5).

115

116 All participants provided written informed consent to participate in this study. The written informed  
117 consent for participants and for the study protocol was approved by the Ethics Committee of Clinic  
118 Research in Aragon (CEICA) and by the Ethics Committee of Miguel Servet University Hospital, in  
119 Zaragoza, Spain, which specifically approved the study procedures. This study was conducted in  
120 accordance with the guidelines established by the principles of the Declaration of Helsinki.

121 Both eyes of each subject were evaluated, but only one of the eyes, randomly selected, was included in  
122 the statistical analysis to avoid potential bias by interrelation between eyes of the same subject. In the  
123 cases of subjects with exclusion criteria in only one eye, the other eye was selected for the analysis.

124 A total of 13 eyes were excluded because of not enough OCT quality or exclusion criteria detected during  
125 the exploration (morphometric parameters of optic disc compatibles with glaucoma, epiretinal  
126 membrane or macular hole). Finally, we included 467 eyes (233 males, 234 females), that were classified  
127 in four groups in steps of 15 years, as the difference between the youngest and the oldest is 60 years:  
128 Group 1 (composed by 71 eyes of 71 healthy subjects aged between 20 and 34 years); Group 2  
129 (composed by 65 eyes of 65 healthy individual aged 35 to 49 years), Group 3 (with 230 eyes from 230  
130 healthy controls aged between 50 and 64 years) and Group 4 (composed by 97 eyes from 97 healthy  
131 subjects aged 65-79 years).

132

### 133 **OCT evaluation**

134 Retinal measurements were obtained in all subjects using the DRI Triton SS-OCT device (Topcon, Tokyo,  
135 Japan). We performed the 3D+5LineCross protocol (12.0\*9.0mm + 9.00mm overlap 8), which allows  
136 100.000 A scans/sec. The DRI Triton SS-OCT provides a quality scale in the image to indicate the signal

137 strength. The quality score ranges from 0 (poor quality) to 100 (excellent quality). Only images with a  
138 score >55 were analyzed in our study, and poor-quality images prior to data analysis were rejected.  
139 We exported data of 5 layers using 3DH\_DISC (Disc5.2x5.2-Superpixelgrid-200) and the thickness of the  
140 26x26 grid were analyzed to get mean and standard deviation in the four age groups as shown in Figure 1  
141 (Fig 1. A: Location of 3D+5line cross OCT scans on retina. B: 26\*26 grid centered on optic disc, the center  
142 area is not shown because the OCT thickness is always zero. C: cross-sectional OCT image and  
143 segmentation boundaries).

144

145 Using the Data Collector software of the Triton OCT, measurements of full layers and of 5 different layers  
146 were obtained (Figure 2): Retinal thickness (from the inner limiting membrane –ILM- to the retinal  
147 pigment epithelium boundaries), Retinal nerve fiber layer (RNFL) (between the ILM to the GCL  
148 boundaries), Ganglion cell layer (GCL) + (between RNFL to the inner nuclear layer boundaries) and GCL++  
149 (between ILM to the inner nuclear layer boundaries), and choroid (from the Bruch membrane to the  
150 choroidal-scleral interface) (Fig 2. Representation of the five layers measured by Triton optical coherence  
151 tomography: Retina (from the inner limiting membrane –ILM- to the retinal pigment epithelium  
152 boundaries), Retinal nerve fiber layer (RNFL) (between the ILM to the GCL boundaries), Ganglion cell  
153 layer (GCL) + (between RNFL to the inner nuclear layer boundaries), GCL++ (between ILM to the inner  
154 nuclear layer boundaries), and choroid (from the Bruch membrane to the choroidal-scleral interface).  
155 Automated built-in calibration software, Topcon Advances Boundary Software (TABS) determined the  
156 distance between the delimiting lines in retina and choroidal plexus, establishing 7 boundaries and five  
157 layers.

158

## 159 **Data Analysis**

160 Comparison between age groups was performed using analysis of variance (ANOVA) for each thickness

161 measurement for four quadrants and four halves. Post-Hoc analysis was performed to obtain statistical  
162 differences in each comparison between the four age groups (Group 1 compared with Group 2; Group 1  
163 compared with Group 3; Group 1 compared with Group 4; Group 2 compared with Group 3; Group 2  
164 compared with Group 4; and Group 3 compared with Group 4). Correction for multiple comparisons was  
165 used in all analyses. In order to graphically see the evolution of the thickness of each segmented layer, a  
166 numerical method called the finite element method (FEM) was used. Numerical techniques such as the  
167 finite element method have been extensively implemented as effective and noninvasive methods to  
168 analyze biological tissues, and in particular in ophthalmology. <sup>[18,19,20]</sup> The finite element method is a  
169 computational tool which allows analysing the stress/strain behaviour of a structure subjected to  
170 different loads and boundary conditions. Here, this method has only been used to study the evolution of  
171 retinal layers thickness along time and to graphically see the evolution of each of them by a contour plot  
172 map. Thus, a finite element mesh using ABAQUS (Abaqus 6.14, Simulia, Rhode Island, USA) mimicking the  
173 Triton grid (Disc5.2x5.2-Superpixelgrid-200) was developed. The finite element mesh was constructed  
174 using membrane quadrilateral elements and the size of the mesh was 5.2x5.2mm. Afterwards, the  
175 thickness of each box of the grid for each group and each layer was introduced. In this way, the evolution  
176 of the thickness of each layer can be seen from a spatio-temporal point of view from Group 1 to Group 4.

## 177 **Results**

178 We analysed a total of 467 eyes from 467 healthy subjects, 71 eyes from 71 individuals between 20-34  
179 years (group 1), 65 eyes from 65 subjects between 35-49 years (group 2), 230 eyes from 230 subjects  
180 between 50-64 years (group 3) and 97 eyes from 97 individuals between 65-79 years (group 4).  
181 Mean and standard deviation for each layer were represented in Figure 3 (Fig 3. Representation of mean  
182 and standard deviation for each layer measured by Triton optical coherence tomography, for the four age  
183 groups: Group 1 (composed by 71 healthy subjects with age between 20 and 34 years); Group 2

184 (composed by 65 individuals with 35-49 years), Group 3 (with 230 healthy controls with 50-64 years) and  
185 Group 4 (composed by 97 healthy subjects with 65-79 years). On the left column, the mean and standard  
186 deviation is shown for each layer and age group. On the right column, the quartiles are plotted to show  
187 data dispersion and the presence of outliers) for the four age groups.

188

189 Figure 4 (Fig 4. Finite element contour map of the evolution of the thickness of each layer measured by  
190 Triton optical coherence tomography for the four age groups (20-34 years, 35-49 years, 50-64 years, and  
191 65-80 years). On the left, the contour bar represents the equivalence between colour and thickness value  
192 (in  $\mu\text{m}$ ) for each layer. Blue zones correspond to thicker areas and red zones correspond to thinner ones.  
193 The optic nerve is represented in grey colour. Different scales have been used to represent the thickness  
194 value for each layer. It can be seen a progressive thinning of all layers with age, especially from 50 years  
195 onwards) represents the contour map obtained by finite element modeling of the evolution of the  
196 thickness of each layer for the different age groups, which shows progressive thinning of all layers with  
197 age, especially from 50 years onwards.

198

199 A comparative analysis between age groups were performed for all layers to find thickness differences for  
200 four quadrants (temporal superior -TS-; temporal inferior -TI-; nasal superior -NS-; and nasal inferior -NI-)  
201 and four halves (superior, inferior, nasal and temporal).

202

### 203 **Retinal Full Layer analysis**

204 There are highly significant differences between groups in our analysis for each quadrant and halves. In  
205 the post-hoc analysis, a significant thickening that did not overcome the Bonferroni correction for  
206 multiple comparison was found for TI quadrant at group 2 compared with group 1 ( $p=0.038$ ) and also at  
207 temporal half ( $p=0.043$ ). Considerable differences that overcame the Bonferroni correction or multiple

208 comparison were found comparing group 2 vs group 3, in which a thinning trend is visible for TS  
 209 (p=0.004), and TI (p=0.007) quadrants and temporal (p=0.005) halves. Comparing group 3 vs group 4,  
 210 significant thinning was found for the four quadrants (p≤0.002), and the four halves (p<0.001).  
 211 Comparing group 1 vs group 3 we did not find any statistical differences between groups although there  
 212 is a presumed thinning in group 3. On the other hand, there is an obvious thinning in group 4 compared  
 213 with group 1 and group 2 for all quadrants and halves (p<0.001) (Table 1. Mean ± standard deviation of  
 214 four quadrants and halves for age groups in the full layers, retina and choroid measurement, and  
 215 comparison of thickness between age groups. The asterisks show significant levels that overcome  
 216 Bonferroni correction for multiple comparisons. Abbreviations: TS, temporal superior; TI, temporal  
 217 inferior; NS, nasal superior; NI, nasal inferior.).

		Group 1 (20-34 years)	Group 2 (35-49 years)	Group 3 (50-64 years)	Group 4 (65-79 years)	P
Full layers	TS Quadrant	498.67±40.41	517.52±71.87	485.86±79.41	458.84±52.42	<0.001*
	TI Quadrant	470.53±50.57	493.19±73.98	463.30±78.88	418.36±47.21	<0.001*
	NS Quadrant	479.50±43.65	480.96±68.32	465.49±89.01	426.43±54.78	<0.001*
	NI Quadrant	436.80±35.97	449.07±68.93	427.20±82.69	389.57±45.18	<0.001*
	Superior Half	489.09±39.43	499.24±68.04	475.68±83.03	442.63±51.55	<0.001*
	Inferior Half	453.67±40.77	471.13±69.78	445.25±79.36	403.97±44.68	<0.001*
	Nasal Half	458.15±38.27	465.02±67.74	446.35±85.07	408.00±47.52	<0.001*
	Temporal Half	484.60±44.81	505.35±71.76	474.58±78.35	438.60±47.09	<0.001*
Retina	TS Quadrant	300.15±9.62	303.03±13.05	294.89±14.05	290.65±10.68	<0.001*
	TI Quadrant	293.30±10.88	298.22±14.59	294.78±15.79	285.90±13.29	<0.001*
	NS Quadrant	274.31±12.44	272.71±14.01	266.56±18.82	262.47±13.48	<0.001*
	NI Quadrant	259.40±8.85	261.13±10.94	255.70±16.01	255.04±16.13	0.012
	Superior Half	287.23±9.01	287.87±12.24	280.73±15.29	276.56±11.16	<0.001*
	Inferior Half	277.85±8.47	279.68±12.06	275.24±14.68	270.47±13.13	<0.001*
	Nasal Half	266.85±9.31	266.92±11.81	261.13±16.75	258.76±14.06	<0.001*
	Temporal Half	298.22±9.38	300.63±12.80	294.84±14.42	288.27±11.30	<0.001*
Choroid	TS Quadrant	173.28±40.68	203.81±77.25	168.16±74.45	145.42±48.17	<0.001*
	TI Quadrant	149.75±46.90	179.46±72.31	145.66±73.86	109.60±39.44	<0.001*
	NS Quadrant	175.66±43.38	193.17±68.84	174.84±82.28	140.19±47.74	<0.001*

	NI Quadrant	147.86±34.92	169.42±68.43	147.11±77.33	110.51±35.24	<0.001*
	Superior Half	174.47±39.34	198.49±71.18	146.39±77.27	142.81±45.52	<0.001*
	Inferior Half	148.80±38.36	174.44±68.99	146.39±74.44	110.05±35.90	<0.001*
	Nasal Half	161.76±38.04	181.30±67.82	160.98±78.97	125.35±38.98	<0.001*
	Temporal Half	161.52±43.20	191.64±73.73	156.91±73.27	127.51±41.66	<0.001*

218

219 **Retinal Nerve Fiber Layer analysis**

220 Significant differences for all quadrants and halves were found between age groups, except for NS  
 221 quadrant and nasal half (Table 2. Mean ± standard deviation of four quadrants and halves for age groups  
 222 in the retinal nerve fiber layer, GCL+ and GCL++, and comparison of thickness between age groups. The  
 223 asterisks show significant levels that overcome Bonferroni correction for multiple comparisons,  
 224 Abbreviations: TS, temporal superior; TI, temporal inferior; NS, nasal superior; NI, nasal inferior). A  
 225 significant RNFL thickening that overcame Bonferroni correction was observed at group 2 compared with  
 226 group 1 in TS quadrant (p=0.001), inferior half (p<0.001) and temporal half (p=0.001). Group 3 presents a  
 227 significant thickening at inferior half (p=0.002) when compared with group 1, but a significant thinning at  
 228 TS quadrant (p=0.001) when compared with group 2. Group 4 presents just a significant thickening at NI  
 229 quadrant (p=0.002) compared with group 1, but compared with group 2, it is observed a significant  
 230 thinning at TS (p<0.001) and TI (p<0.001) quadrants and at superior (p<0.001) and temporal (p<0.001)  
 231 halves. Same conduct happens when this group is compared with group 3 at TI quadrant (p<0.001) (Table  
 232 2).

		Group 1 (20-34 years)	Group 2 (35-49 years)	Group 3 (50-64 years)	Group 4 (65-79 years)	P
RNFL	TS Quadrant	97.10±10.17	103.01±10.05	97.53±11.79	96.36±11.70	0.001*
	TI Quadrant	93.16±11.55	97.63±9.57	97.12±13.62	90.49±12.03	<0.001*
	NS Quadrant	88.89±12.20	88.70±10.66	87.13±14.22	85.19±12.04	0.222
	NI Quadrant	77.72±10.44	82.00±7.50	80.94±11.39	84.49±15.81	0.003*
	Superior Half	92.99±6.39	95.87±8.03	92.33±10.55	90.78±9.94	0.009
	Inferior Half	85.44±6.15	89.81±6.08	89.03±9.17	97.49±10.30	0.007*



	Nasal Half	83.30±9.31	85.35±8.02	84.03±11.82	84.84±13.16	0.687
	Temporal Half	95.13±9.60	100.32±7.41	97.33±11.89	93.42±10.73	<0.001*
GCL+	TS Quadrant	48.87±4.26	47.70±5.29	47.01±4.69	45.10±4.35	<0.001*
	TI Quadrant	53.07±6.21	52.36±6.07	51.11±5.51	49.70±5.63	0.001*
	NS Quadrant	40.42±2.99	39.27±3.22	39.44±4.31	38.40±3.82	0.011
	NI Quadrant	41.06±3.84	39.69±3.67	39.13±3.93	37.79±5.42	<0.001*
	Superior Half	44.65±3.05	43.49±4.3	43.23±3.76	41.75±3.38	<0.001*
	Inferior Half	47.06±4.14	46.03±4.14	45.15±3.85	43.75±4.53	<0.001*
	Nasal Half	40.47±3.15	38.48±3.17	39.29±3.72	38.09±3.87	<0.001*
	Temporal Half	50.97±4.82	50.03±5.44	49.06±4.74	47.40±4.56	<0.001*
GCL++	TS Quadrant	145.98±9.61	150.72±11.23	144.55±11.72	141.47±13.00	<0.001*
	TI Quadrant	146.23±9.25	150.01±10.43	148.25±13.14	140.20±13.29	<0.001*
	NS Quadrant	129.28±13.08	128.00±11.89	126.49±15.07	123.45±13.76	0.046
	NI Quadrant	118.78±10.08	121.70±8.98	120.01±11.65	122.10±16.72	0.263
	Superior Half	137.63±8.03	139.36±10.03	135.52±11.74	132.46±12.03	0.001*
	Inferior Half	132.51±6.73	135.85±8.45	134.13±10.16	131.15±12.68	0.015
	Nasal Half	124.03±10.07	124.85±9.62	123.25±12.53	122.78±14.55	0.709
	Temporal Half	146.10±8.40	150.36±9.29	146.40±11.79	140.83±12.39	<0.001*

233

234 **RNFL to Inner Nuclear Layer (GCL+)**

235 GCL+ appears to be significantly thicker in group 2 when comparing with group 4 at TS quadrant

236 (p=0.001), inferior and temporal halves (p=0.001), but not compared with groups 1 and 3. Group 3

237 present a significant thinner GCL+ layer at NI quadrant and inferior half (p&lt;0.001) when compared with

238 group 1, however GCL+ is significantly thicker in this group compared with older population (group 4) at

239 TS quadrant and superior half (p=0.001). Finally, group 4 exhibits a significant thinning of GCL+ layer for

240 every quadrants and halves (p&lt;0.001) (Table 2).

241

242 **From Inner Limiting Membrane to Inner Nuclear Layer (GCL++)**

243 Significant differences between groups in the GCL++ layer were found almost in every quadrant and half,

244 except for NI quadrant and nasal half, that apparently are not predictive of changes in this layer (Table 2).

245 Comparing group 3 vs group 1, significant differences were not found, but compared with group 2  
246 significant thinning appears in TS quadrant ( $p<0.001$ ). On the other hand, group 4 exhibits a thinner  
247 GCL++ layer compared with group 1 in TI quadrant ( $p=0.001$ ) and superior and temporal halves  
248 ( $p=0.002$ ). Compared with group 2 thinning gets more significant in TS and TI quadrants ( $p<0.001$ ), and  
249 superior and temporal halves ( $p<0.001$ ) (Table 2).

250

### 251 **Retina (from RNFL to photoreceptors layer)**

252 There are no significant differences when comparing group 1 with group 2, but when comparing with  
253 group 3 significant thinning is found at TS and NS quadrants ( $p=0.003$  and  $p=0.001$ ) and superior and  
254 nasal halves ( $p=0.001$  and  $p=0.006$ ). Furthermore, when comparing with group 4, significant thinning is  
255 found in all quadrants and halves ( $p<0.001$ ) except for NI quadrant ( $p=0.041$ ) (table 1).

256 By contrast comparing group 2 with group 3, there seems to be a significant thinning at TS ( $p<0.001$ ), NS  
257 ( $p=0.013$ ) and NI ( $p=0.009$ ) quadrants and all halves ( $p<0.001$ ,  $p=0.024$ ,  $p=0.008$ ,  $p=0.003$ ), but when  
258 comparing with group 4 significant thinning occurs in all quadrants ( $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.001$  and  
259  $p=0.008$ ) and all halves ( $p<0.001$ ). Finally, when comparing group 3 with group 4 significant thinning is  
260 found at TS ( $p=0.008$ ) and TI ( $p<0.001$ ) quadrants and superior ( $p=0.016$ ) and temporal ( $p<0.001$ ) halves.

261

### 262 **Choroid analysis**

263 Choroid showed significant differences between age groups for all quadrants and halves (Table 1). At  
264 second age group (35 to 49 years) it seems to exist a choroidal thickening at superior half ( $p=0.001$ ) when  
265 compared with group 1. By contrast, group 3 presents a thinner choroidal layer compared with previous  
266 groups, but this thinning is just significant when compared with group 2 for TS and TI quadrants, and for  
267 temporal half ( $p<0.001$ ). The thinnest choroidal values can be seen for group 4, which is significant when  
268 comparing with group 1, 2 of 3 for every parameter analyzed ( $p<0.001$ ).

269

270 Except the GCL+ with a linear thinning ratio of  $-0.050 \mu\text{m}/\text{year}$ , the tendency in the other layers differs. A  
271 thickening ratio of  $0.476 \mu\text{m}/\text{year}$  for the full layers complex,  $0.010 \mu\text{m}/\text{year}$  for the retina,  $0.856$   
272  $\mu\text{m}/\text{year}$  for the choroid,  $0.125 \mu\text{m}/\text{years}$  for the RNFL and  $0.087 \mu\text{m}/\text{years}$  for the GCL++ is observed  
273 until de third decade of life. Subsequently a thinning ratio of  $-1.406 \mu\text{m}/\text{year}$  for the full layers complex,  
274  $-0.058 \mu\text{m}/\text{year}$  for the retina,  $-1.364 \mu\text{m}/\text{year}$  for the choroid,  $-0.084 \mu\text{m}/\text{years}$  for the RNFL and  $-0.131$   
275  $\mu\text{m}/\text{years}$  for the GCL++ is observed from de third decade of life.

276

## 277 Discussion

278 Previous histopathological studies of the choroid have shown that choroidal thickness decreases with  
279 age; this finding has been confirmed by posterior in-vivo studies. <sup>[7,14,17,21]</sup> Choroidal thinning on OCT has  
280 been associated with ophthalmological conditions such as age-related macular degeneration, age-related  
281 choroidal atrophy, axial length, or systemic conditions such as diabetes, Alzheimer's disease, cognitive  
282 impairment, vascular diseases or obesity. <sup>[11,21,22]</sup>

283

284 In addition, the loss of vascular perfusion related to age has been described in previous studies  
285 performed with OCT-Angiography <sup>[23]</sup>, even this alteration of blood flow could be observed by magnetic  
286 resonance. <sup>[24]</sup> Furthermore, a significant reduction of retrobulbar circulation related to age has been  
287 found in Doppler studies, this reduction could be also related with the increased prevalence of  
288 cardiovascular risks related with age such as hypertension, diabetes, lipid disorders and sedentary  
289 lifestyle. <sup>[25,26,27,28]</sup>

290

291 Traditionally, the age of 40 years has been established as the age of onset of the classic ophthalmological  
292 alterations, although other pathologies such as macular alterations are more common beyond 50 years,  
293 so these changes in the choroid can be a predictive factor of future clinical alterations.<sup>[7,29,30]</sup>

294

295 In our study, we have seen that global retinal tendency is toward thickening in the third decade of life  
296 (group 2) and towards thinning after the fourth decade (group 3). Regarding the choroid, the same  
297 pattern was seen and also for the rest of layers, except at GCL+ layer, where there is a continuous  
298 thinning from group 1 to group 4. These results are consistent with those of Hanumunthadu et al. 2018,  
299 their age-stratified analysis suggested that choroidal thickness was smaller in children and younger adult  
300 population, and it appeared to decrease again in older adults.<sup>[21]</sup>

301

302 In contrast with published studies, our analysis has focused on a division by quadrants and halves in the  
303 peripapillary area. We observed that superior half and quadrants are thicker than their inferior  
304 homologous, however, it seems that there is no difference when comparing nasal and temporal  
305 orientation. As we have seen previously, group 1 seems to have a very similar choroidal thickness to  
306 group 3 in practically all the quadrants and halves, except in the superior half, where apparently the  
307 thickness of the choroid is greater in this group.

308

309 Comparing the thinning of the total retina and the one produced specifically in the choroid, we can see  
310 that it is in group 4 where the thinning of this last layer is more pronounced, especially in the inferior half  
311 of the retina. Same thing happens for groups 1 and 2, but not in 3, where thinning is symmetric when  
312 comparing the superior quadrants and halves with the inferior ones and the nasal quadrants and halves  
313 with the temporal ones.

314

315 The potential clinical application of our findings is to know which thickness values in each layer should be  
316 considered pathological. This study may be the base to build a normative database that allows health  
317 personnel to improve the interpretation of retinal measurements, even with a color scale similar to that  
318 one used by most OCT devices (red color means pathological thinning, yellow color indicated slight  
319 thinning, green color means normal, blue indicates slight thickening and purple means abnormal  
320 thickening); this helps to determine which layers are out of normal limits in each range of age. This is an  
321 important limitation of the Triton current software because we can visualize numerous measurements of  
322 all retinal layers, but ophthalmologists do not know if these values are normal for the age of each subject  
323 or patient.

324

325 Our findings suggest that there is a progressive and physiological thinning of all retinal layers from the  
326 third decade of life. In any case, it would be useful to extend this study further with a larger population of  
327 ordinary individuals across a range of different ethnicities and from longer geographic areas, to clarify the  
328 physio-pathological mechanisms that affect retinal layers.

329

330

331

332

333

334

335

336

337

338

339 **References**

- 340 1. Venhuizen FG, van Ginneken B, Liefers B, van Grinsven MJJP, Fauser, S Hoyng C, et al. Robust total  
341 retina thickness segmentation in optical coherence tomography images using convolutional neural  
342 networks. *Biomed Opt Express*. 2017; 8(7): 3292–3316.
- 343 2. Keane PA, Liakopoulos S, Jivrajka RV, Chang KT, Alasil T, Walsh AC, et al. Evaluation of optical coherence  
344 tomography retinal thickness parameters for use in clinical trials for neovascular age-related macular  
345 degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2009; 50: 3378–3385.
- 346 3. Almotiri J, Elleithy K, Elleithy A. A multi-anatomical retinal structure segmentation system for  
347 automatic eye screening using morphological adaptive fuzzy thresholding. *IEEE J Transl Eng Health Med*.  
348 2018; 6: 3800123.
- 349 4. Waldstein SM, Gerendas B S, Montuoro A, Simader C, Schmidt-Erfurth U. Quantitative comparison of  
350 macular segmentation performance using identical retinal regions across multiple spectral-domain  
351 optical coherence tomography instruments. *Br. J. Ophthalmol*. 2015; 99: 794–800.
- 352 5. Hanumunthadu D, Wang JP, Chen W, Wong EN, Chen Y, Morgan WH, et al. Impact of retinal pigment  
353 epithelium pathology on spectral-domain optical coherence tomography-derived macular thickness and  
354 volume metrics and their intersession repeatability. *Clin. Exp. Ophthalmol*. 2017; 45: 270–279.
- 355 6. Ahmad M, Kaszubski PA, Cobbs L, Reynolds H, Smith RT. Choroidal thickness in patients with coronary  
356 artery disease. *PLoS One*. 2017; 12(6): e0175691.
- 357 7. Adhi M, Ferrara D, Mullins RF, Baumal CR, Mohler KJ, Kraus MF, et al. Characterization of choroidal  
358 layers in normal aging eyes using enface swept- source optical coherence tomography. *PLoS One*. 2015;  
359 10(7): e0133080.
- 360 8. Higashiyama T, Nishida Y, Ohji M. Optical coherence tomography angiography in eyes with good visual  
361 acuity recovery after treatment for optic neuritis. *PLoS One*. 2017; 12(2): e0172168.
- 362 9. Garcia-Martin E, Pablo LE, Bambo MP, Alarcia R, Polo V, Larrosa JM, et al. Comparison of peripapillary  
363 choroidal thickness between healthy subjects and patients with Parkinson’s disease. *PLoS One*. 2017;  
364 12(5): e0177163.
- 365 10. Ulusoy MO, Kal A, Işik-Ulusoy S, Kal Ö. Choroidal thickness in patients with fibromyalgia and  
366 correlation with disease severity. *Indian J Ophthalmol*. 2018; 66(3): 428-432.

- 367 11. Abadia B, Suñen I, Calvo P, Bartol F, Verdes G, Ferreras A. Choroidal thickness measured using swept-  
368 source optical coherence tomography is reduced in patients with type 2 diabetes. *PLoS One*. 2018; 13(2):  
369 e0191977.
- 370 12. Ekinci M, Ceylan E, Cagatay HH, Keles S, Hüseyinoglu N, Tanyildiz B, et al. Retinal nerve fibre layer,  
371 ganglion cell layer and choroid thinning in migraine with aura. *BMC Ophthalmol* 2014; 14: 75.
- 372 13. Colak HN, Kantarcı FA, Tatar MG, Eryilmaz M, Uslu H, Goker H, et al. Retinal nerve fiber layer, ganglion  
373 cell complex, and choroidal thicknesses in migraine. *Arq Bras Oftalmol* 2016; 79(2): 78-81.
- 374 14. Akhtar Z, Rishi P, Srikanth R, Rishi E, Bhende M, Raman R. Choroidal thickness in normal Indian  
375 subjects using Swept source optical coherence tomography. *PLoS One*. 2018; 13(5): e0197457.
- 376 15. Michalewski J, Michalewska Z, Nawrocka Z, Bednarski M, Nawrocki J. Correlation of choroidal  
377 thickness and volume measurements with axial length and age using swept source optical coherence  
378 tomography and optical low-coherence reflectometry. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 639160.
- 379 16. Mazzaferri J, Beaton L, Hounye G, Sayah DN, Costantino S. Open-source algorithm for automatic  
380 choroid segmentation of OCT volume reconstructions. *Sci Rep*. 2017; 7: 42112.
- 381 17. Wakatsuki Y, Shinojima A, Kawamura A, Yuzawa M. Correlation of aging and segmental choroidal  
382 thickness measurement using swept source optical coherence tomography in healthy eyes. *PLoS*  
383 *One*. 2015; 10(12): e0144156.
- 384 18. Pandolfi A, Holzapfel GA. Three-dimensional modeling and computational analysis of the human  
385 cornea considering distributed collagen fibril orientations. *J Biomech Eng*. 2008; 130(6): 061006.
- 386 19. Shin A, Yoo L, Park J, Demer JL. Finite element biomechanics of optic nerve sheath traction in  
387 adduction. *J Biomech Eng*. 2017; 139(10).
- 388 20. Schutte S, van den Bedem SP, van Keulen F, van der Helm FC, Simonsz H J. A finite-element analysis  
389 model of orbital biomechanics. *Vision Res*. 2006; 46(11): 1724-31.
- 390 21. Hanumunthadu D, Ruiz-Medrano J, Dumpala S, Jabeen A, Jabeen A, Goud A, et al. Comparison  
391 of choroidal vessel thickness in children and adult eyes by enhanced-depth imaging optical coherence  
392 tomography imaging. *Int J Ophthalmol*. 2018; 11(4): 681-686.
- 393 22. Zhao J, Wang YX, Zhang Q, Wei WB, Xu L, Jonas JB. Macular choroidal small-vessel layer, Sattler's layer  
394 and Haller's layer thicknesses: The Beijing Eye Study. *Sci Rep*. 2018; 8(1): 4411.

- 395 23. Falavarjani KG, Shenazandi H, Naseri D, Anvari P, Kazemi P, et al. Foveal avascular zone and vessel  
396 density in healthy subjects: an optical coherence tomography angiography study. *J Ophthalmic Vis*  
397 *Res.* 2018; 13(3): 260-265.
- 398 24. Emeterio Nateras OS, Harrison JM, Muir ER, Zhang Y, Peng Q, Chalfin S, et al.  
399 Choroidal blood flow decreases with age: an MRI study. *Curr Eye Res.* 2014; 39(10): 1059-1067.
- 400 25. Modrzejewska M, Siesky B, Amireskandari A, Holland S, Grzesiak W, Zaborski D et al. Parameters  
401 characterizing age-dependent retrobulbar circulation in healthy subjects measured by color Doppler  
402 ultrasonography. *Curr Eye Res* 2015; 40:729–736.
- 403 26. Steigerwalt RD Jr, Belcaro GV, Laurora G, Cesarone MR, De Sanctis MT, Incandela L. Ocular and orbital  
404 blood flow in patients with essential hypertension treated with trandolapril. *Retina Phila Pa* 1998;  
405 18:539–545.
- 406 27. Foroozan R, Savino PJ, Sergott RC. Embolic central retinal artery occlusion detected by orbital color  
407 Doppler imaging. *Ophthalmology* 202; 109:744–747.
- 408 28. Costa VP, Kuzniec S, Molnar LJ, Cerri GG, Puech-Leão P, Carvalho CA. Clinical findings and  
409 hemodynamic changes associated with severe occlusive carotid artery disease. *Ophthalmology* 1997;  
410 104:1994–2002.
- 411 29. Nikolopoulou E, Lorusso M, Micelli Ferrari L, Cicinelli MV, Bandello F, Querques G, et al. Optical  
412 coherence tomography angiography versus dye angiography in age-related macular degeneration:  
413 sensitivity and specificity analysis. *Biomed Res Int.* 2018; 2018: 6724818.
- 414 30. Chalam KV, Sambhav K. Optical coherence tomography angiography in retinal diseases. *J Ophthalmic*  
415 *Vis Res.* 2016; 11(1): 84-92.

416

417

418

419

420

421



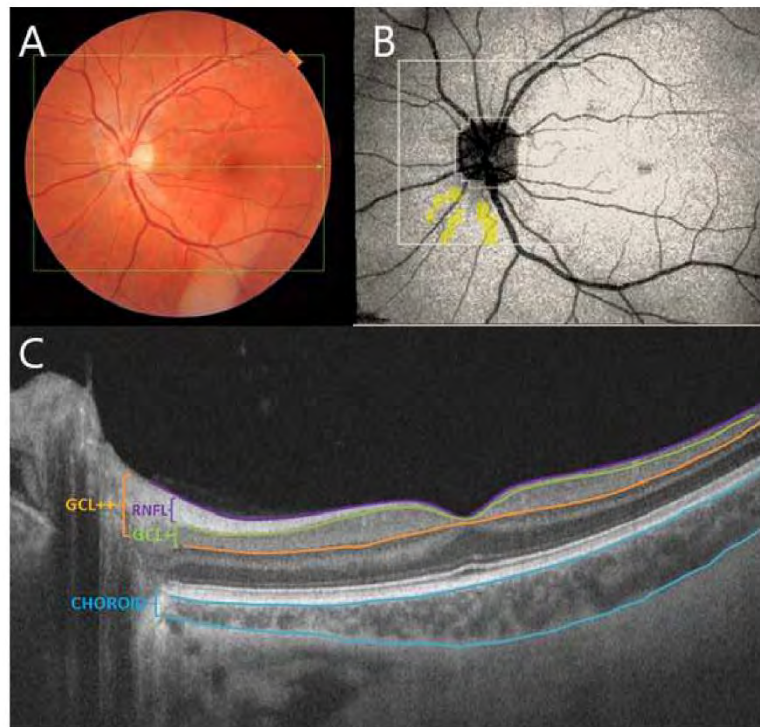


Fig 1 A: Location of 3D+5line cross OCT scans on retina. B: 26\*26 grid centered on optic disc, the center area is not shown because the OCT thickness is always zero. C: cross-sectional OCT image and segmentation boundaries

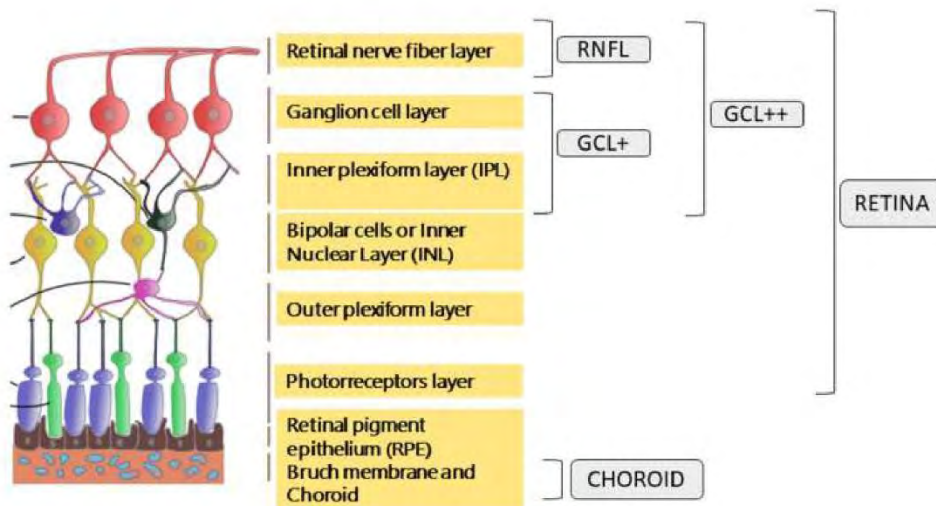
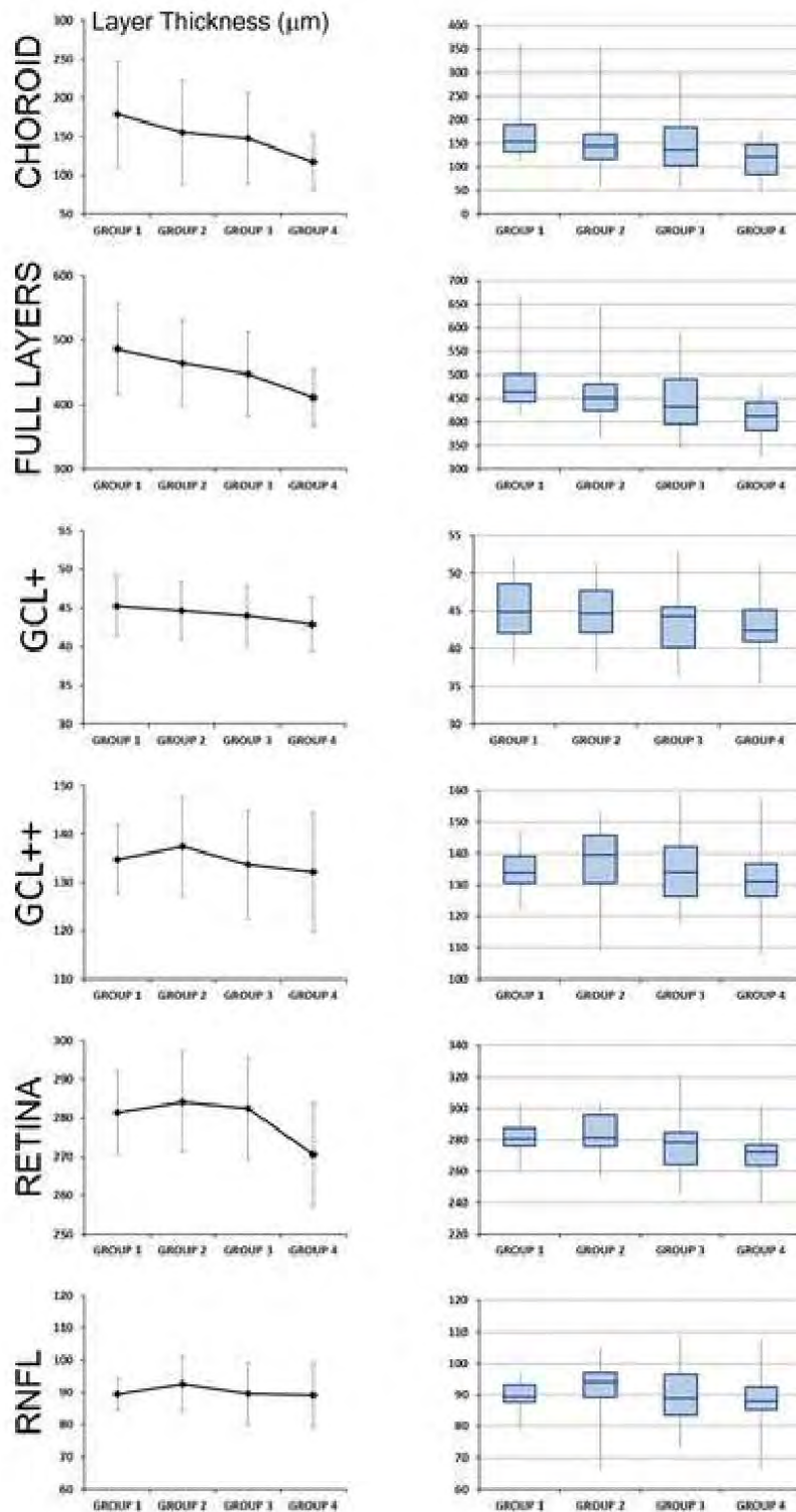
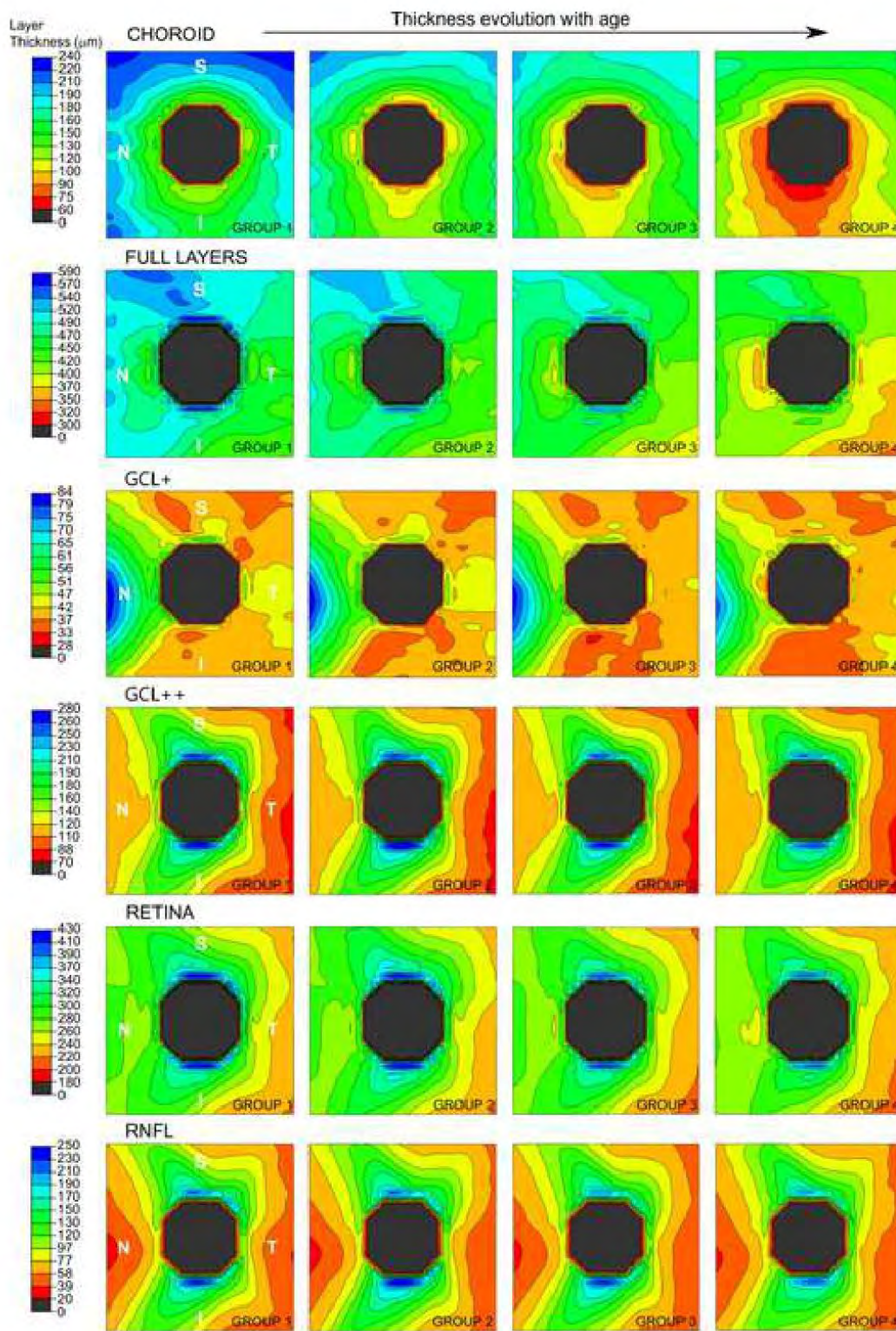


Fig 2. Representation of the five layers measured by Triton optical coherence tomography: Retina (from the inner limiting membrane –ILM– to the retinal pigment epithelium boundaries), Retinal nerve fiber layer (RNFL) (between the ILM to the GCL boundaries)







**Fig 3.** Representation of mean and standard deviation for each layer measured by Triton optical coherence tomography, for the four age groups: Group 1 (composed by 71 healthy subjects with age between 20 and 34 years); Group 2 (composed by 65 individuals with 35-49 years), Group 3 (with 230 healthy controls with 50-64 years) and Group 4 (composed by 97 healthy subjects with 65-79 years)



**Fig 4.** Finite element contour map of the evolution of the thickness of each layer measured by Triton optical coherence tomography for the four age groups (20-34 years, 35-49 years, 50-64 years, and 65-80 years)

Article

# Computer-Aided Diagnosis of Multiple Sclerosis Using a Support Vector Machine and Optical Coherence Tomography Features

Carlo Cavaliere <sup>1</sup>, Elisa Vilades <sup>2,3</sup> , M<sup>a</sup> C. Alonso-Rodríguez <sup>4</sup>, María Jesús Rodrigo <sup>2,3,5,\*</sup> , Luis Emilio Pablo <sup>2,3</sup>, Juan Manuel Miguel <sup>1</sup> , Elena López-Guillén <sup>1</sup>, Eva M<sup>a</sup> Sánchez Morla <sup>6,7,8</sup>, Luciano Boquete <sup>1,5,\*</sup>  and Elena García-Martin <sup>2,3,5,\*</sup>

<sup>1</sup> Biomedical Engineering Group, Department of Electronics, University of Alcalá, 28801 Alcalá de Henares, Spain; carlo.cavaliere@uah.es (C.C.); jmanuel.miguel@uah.es (J.M.M.); elena.lopezg@uah.es (E.L.-G.)

<sup>2</sup> Department of Ophthalmology, Miguel Servet University Hospital, 50009 Zaragoza, Spain; elisavilades@hotmail.com (E.V.); lpablo@unizar.es (L.E.P.)

<sup>3</sup> Aragon Institute for Health Research (IIS Aragon), Miguel Servet Ophthalmology Innovation and Research Group (GIMSO), University of Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain

<sup>4</sup> Department of Physics and Mathematics, University of Alcalá, 28801 Alcalá de Henares, Spain; mconcepcion.alonso@uah.es

<sup>5</sup> RETICS-Oftared: Thematic Networks for Co-operative Research in Health for Ocular Diseases, 28040 Madrid, Spain

<sup>6</sup> Department of Psychiatry, 12 Octubre University Hospital Research Institute (i+12), 28041 Madrid, Spain; emsmorla@gmail.com

<sup>7</sup> Faculty of Medicine, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>8</sup> CIBERSAM: Biomedical Research Networking Centre in Mental Health, 28029 Madrid, Spain

\* Correspondence: mariajesusrodrigo@hotmail.es (M.J.R.); luciano.boquete@uah.es (L.B.); egmvivax@me.com (E.G.-M.); Tel.: +34-976765558 (E.G.-M.); Fax: +34-97656623 (E.G.-M.)

Received: 8 October 2019; Accepted: 30 November 2019; Published: 3 December 2019



**Abstract:** The purpose of this paper is to evaluate the feasibility of diagnosing multiple sclerosis (MS) using optical coherence tomography (OCT) data and a support vector machine (SVM) as an automatic classifier. Forty-eight MS patients without symptoms of optic neuritis and forty-eight healthy control subjects were selected. Swept-source optical coherence tomography (SS-OCT) was performed using a DRI (deep-range imaging) Triton OCT device (Topcon Corp., Tokyo, Japan). Mean values (right and left eye) for macular thickness (retinal and choroidal layers) and peripapillary area (retinal nerve fibre layer, retinal, ganglion cell layer—GCL, and choroidal layers) were compared between both groups. Based on the analysis of the area under the receiver operator characteristic curve (AUC), the 3 variables with the greatest discriminant capacity were selected to form the feature vector. A SVM was used as an automatic classifier, obtaining the confusion matrix using leave-one-out cross-validation. Classification performance was assessed with Matthew's correlation coefficient (MCC) and the  $AUC_{CLASSIFIER}$ . The most discriminant variables were found to be the total GCL++ thickness (between inner limiting membrane to inner nuclear layer boundaries), evaluated in the peripapillary area and macular retina thickness in the nasal quadrant of the outer and inner rings. Using the SVM classifier, we obtained the following values: MCC = 0.81, sensitivity = 0.89, specificity = 0.92, accuracy = 0.91, and  $AUC_{CLASSIFIER}$  = 0.97. Our findings suggest that it is possible to classify control subjects and MS patients without previous optic neuritis by applying machine-learning techniques to study the structural neurodegeneration in the retina.

**Keywords:** multiple sclerosis; optical coherence tomography; support vector machine; confusion matrix

## 1. Introduction

Multiple sclerosis (MS) causes inflammation, demyelination, axonal degeneration, and neuronal loss in the central nervous system (CNS), hindering axonal conduction and provoking progressive clinical disability in patients.

A single biomarker for diagnosing MS does not exist at present. Oligoclonal bands, magnetic resonance imaging (MRI), and optical coherence tomography (OCT) are all used in clinical practice [1]. MRI is one of the clinical tests that is most widely used in the diagnosis of MS [2]. However, the lesions shown in the images only explain a small fraction of the patient's clinical symptoms (known as the clinico-radiological paradox). It is, therefore, highly worthwhile to seek new biomarkers capable of determining diagnosis of the disease.

The visual system is an extension of the central nervous system and the neurodegenerative processes of MS frequently manifest in visual pathways [3], making the analysis of them a means of diagnosing the disease and evaluating its progress. OCT uses low-coherence interferometry to produce a two-dimensional image of optical scattering from internal tissue microstructures [4], making it possible to obtain valid information with which to assess the anatomical integrity of the optic nerve and retina. OCT detects the depth at which a difference is present in the refractive index in the transition from one tissue to another. OCT is a rapid (2–3 min) [5], innocuous, cost-effective, and non-invasive test that does not require technical specialization from the practitioner.

The first generation of OCT devices worked in the time domain (time domain OCT:TD-OCT) and depth profiles were acquired by scanning the length of the reference arm to map out the tissue reflectivity [6]. The next-generation technology obtains reflectivity values by taking separate measurements in the Fourier domain for a multitude of wavelengths (Fourier domain OCT:FD-OCT). On a practical level, this is implemented using either a spectrometer and a line scan camera (spectral domain OCT:SD-OCT) or a tuneable swept laser as the light source and a single photodiode detector (swept source OCT:SS-OCT) [6]. This hardware simplification in SS-OCT enables fast scanning speeds of up to 400,000 axial scans per second in non-commercial prototypes [7]. The A-scan speed in commercial SS-OCT devices is 100,000 Hz [8], providing more accurate three-dimensional images of the retina and even the choroid, yielding 8 and 20  $\mu\text{m}$  axial and transverse resolutions in tissue, respectively [9,10]. In non-commercial systems, axial and transverse resolutions of 2  $\mu\text{m}$  over a field of view of  $1 \times 1 \text{ mm}^2$  [11] are obtained.

All these characteristics have meant that OCT has revolutionized daily clinical practice in neuro-ophthalmology, because the technique makes it possible to quantify, non-invasively, rapidly, objectively, reliably, and highly reproducibly [12], the major pathological hallmarks of the disease, specifically, inflammation and neuroaxonal degeneration [13]. It also uses the same anatomical area in the follow-up examinations of the eye, which makes it possible to monitor neurological deterioration in neurodegenerative pathologies, thereby serving as a reliable progression biomarker. Some authors consider its reliability to be as high or higher than serial MRI (a test that it is neither innocuous nor cheap, unlike OCT) [14].

The first study using OCT in MS patients was conducted in [15], observing a significant reduction in the retinal nerve fibre layer (RNFL) of patients with MS and previous optic neuritis (ON) when compared with control subjects. Many subsequent studies have confirmed these findings in patients with and without ON, even providing confirmation before clinical symptoms have been presented [16–20].

Two meta-analyses include the latest advances in application of OCT in diagnosis of MS. In the work of Britze et al. [21], it was documented that the thickness of the ganglion cell layer (GCL) was significantly reduced in MS patients both with and without previous ON compared to healthy control subjects. In this meta-analysis (involving a study of 2118 eyes), a reduction in the combined GCL and IPL (inner plexiform layer, together referred to as GCIPL) layers of 6.73  $\mu\text{m}$  was estimated in MS patients without ON. The meta-analysis by Petzold et al. [19] spans 15 studies of retinal thicknesses measured with SD-OCT (conducted in patients without ON, obtaining an estimated peripapillary thickness loss in MS patients and finding that the peripapillary RNFL and macular GCIPL are the most

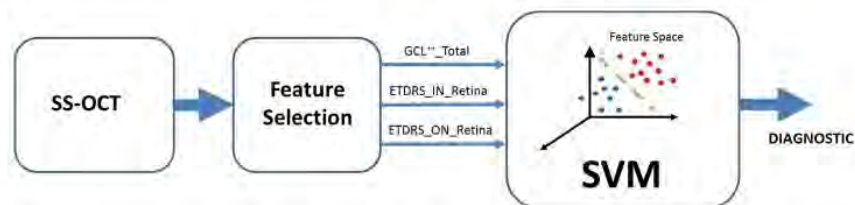
affected layers). In a recent paper [22] studying 97 MS patients without ON episodes, the authors also found, in this case, using SS-OCT, a thinning of retinal thickness in the macular and peripapillary areas in the RNFL and GCL.

Previous studies demonstrate that analysing retinal layers with the latest OCT technology is useful for distinguishing between MS patients and control subjects. None of the papers, however, have employed machine-learning techniques. In this article, the authors go one step further and use machine-learning to optimize the diagnostic capability of the OCT variables and give the technique real clinical applicability, for any population, due to the aforementioned self-learning capabilities.

Machine-learning approaches have been investigated in MS diagnosis. Among these (linear discriminant analysis, random forest, neural networks, etc.), support vector machines (SVM) have demonstrated their effectiveness.

In a classifier, the SVM algorithm maximizes the margin that separates different classes of data. In [23], a SVM acted as a classifier of functional and diffusion MRI data for characterization of relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) patients. In [24], a SVM was used to predict the course of MS, with demographic and clinical characteristics, MRI features, and characteristics of the first symptom(s) of MS being used as classifier inputs. Zhang et al. [25] diagnosed MS versus controls, comparing three machine-learning-based classifiers, namely, the decision tree, the nearest-neighbour classifier, and the support vector machine.

The objective of this paper is to use machine-learning techniques (a support vector machine) to classify variables obtained with OCT in order to differentiate between control subjects and MS patients. As shown in the general diagram in Figure 1, data were obtained from each patient using an SS-OCT system. In the feature selection stage, the OCT variables with greatest discriminant capacity, evaluated using the area under the receiver operating characteristic (ROC) curve, were selected and used in a classifier implemented in a SVM to obtain the diagnosis.



**Figure 1.** General block diagram. OCT: Optical coherence tomography. SS-OCT: Swept-source OCT; ETDRS: Early treatment diabetic retinopathy study; GCL++\_Total: Global GCL++ thickness, evaluated at the peripapillary area between the inner limiting membrane and the inner nuclear layer boundaries; ETDRS\_IN\_Retina: Macular retina thickness in the nasal quadrant of the inner ring; ETDRS\_ON\_Retina: Macular retina thickness in the nasal quadrant of the outer ring; SVM: Support vector machine.

## 2. Materials and Methods

The study procedures were performed in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki, and the study protocol was approved by the local ethics committees (Clinical Research Ethics Committee of Aragon—CEICA, Zaragoza, Spain). Written informed consent to participate in the study was obtained from all subjects.

Relapsing-remitting MS was diagnosed based on the 2010 revision of the McDonald criteria [26] and was confirmed by a neurologist specializing in MS. Patients with visual acuity less than 0.6 (Snellen scale), intraocular pressure >20 mmHg, a history of optic neuritis, and/or an active MS flare (of any neurological deficit) in the past 6 months preceding their enrolment into the study, or at any of the annual visits, were excluded. Active MS flare was considered a reason for exclusion because acute axonal loss could mask neuronal damage secondary to MS progression (i.e., chronic neurodegeneration), which was the main purpose of this study. Patient disability was analysed using the Expanded Disability Status Scale (EDSS), and the treatment received by each patient was considered.

Axial length was assessed in all individuals. Eyes longer than 25.2 mm and refractive errors  $\geq 5$  dioptres (D) of equivalent spherical diameter or  $\geq 3$  D of astigmatism were excluded from the study. The participants (MS patients and healthy control subjects) had no concomitant ocular diseases, nor any previous history of retinal pathology, glaucoma, amblyopia, or systemic conditions that could affect the visual system.

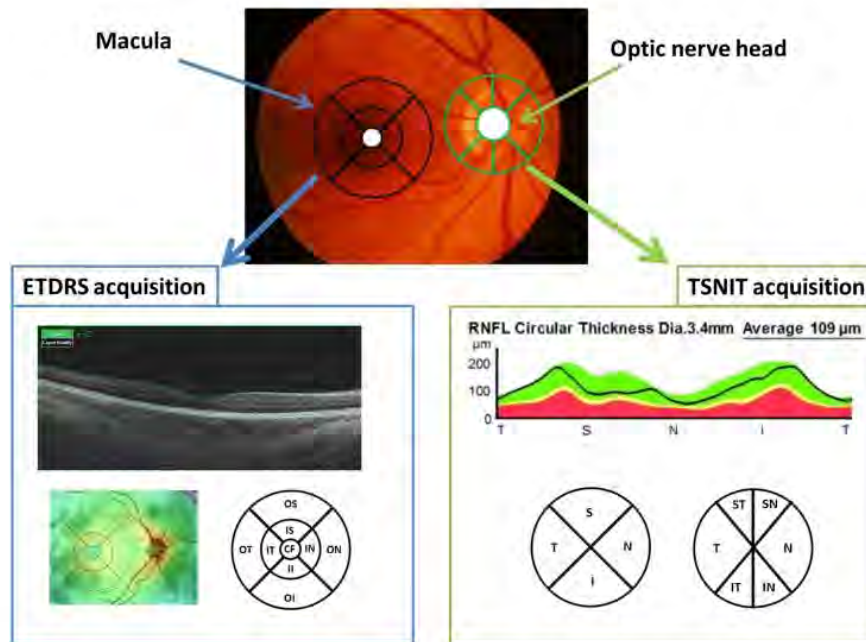
Retinal atrophy after acute ON is often more pronounced than the retinal thinning observed in the absence of ON in MS [19]. For this reason, eyes with previous ON were excluded from the analysis.

A complete neuro-ophthalmic examination, including assessment of best-corrected visual acuity using the Snellen chart, contrast sensitivity vision (CSV) using the CSV1000 test, colour vision using the Ishihara test, pupillary reflexes, ocular motility, examinations of the anterior segment, intraocular pressure measurement using the Goldmann applanation tonometer, and papillary morphology, by a fundoscopic exam, was performed on all subjects in order to detect any ocular alteration (such as primary open-angle glaucoma, prior optic neuritis, cataracts, or corneal pathology) that could affect the optic nerve or neuro-retinal structure.

### 2.1. OCT Method

The 3D wide protocol was used for all subjects. This protocol includes a wide scanning range (9 mm high  $\times$  12 mm wide) that focuses on both the macula (ETDRS: Early treatment diabetic retinopathy study scan) and the peripapillary area (TSNIT: Temporal-superior-nasal-inferior-temporal scan).

With the ETDRS scan (Figure 2), nine macular areas [21] (which include a central 1-mm circle representing the fovea, and inner and outer rings measuring 3 mm and 6 mm in diameter, respectively, the latter two divided into quadrants by two intersecting lines), central and average thickness, plus macular volume were obtained. The nine areas are denominated as follows: central fovea (CF), inner superior (IS), inner nasal (IN), inner inferior (II), inner temporal (IT), outer superior (OS), outer nasal (ON), outer inferior (OI) and outer temporal (OT).



**Figure 2.** Locations of the OCT scans in the macula and in the optic nerve head. ETDRS: Early treatment diabetic retinopathy study; CF: Central fovea, OT: Outer temporal, OS: Outer superior; ON: Outer nasal; OI: Outer inferior; IT: Inner temporal; IS: Inner superior; IN: Inner nasal; II: Inner inferior, TSNIT: Temporal-superior-nasal-inferior-temporal; ST: Superotemporal; SN: Superonasal; N: Nasal; IN: Inferonasal; IT: Inferotemporal; T: Temporal; RNFL: Retina nerve fibre layer;  $\mu\text{m}$ : Micrometres.

The diameter of the peripapillary area measured in the TSNIT scan was 3.40 mm. The TSNIT provides measurements of the 4 peripapillary quadrants (superior, nasal, inferior and temporal) and 6 sectors (superonasal, superotemporal, nasal, temporal, inferonasal and inferotemporal, Figure 2).

The ETDRS and TSNIT scans provide separate, automated measurements of different retinal layers, specifically: RNFL (between the inner limiting membrane—ILM and the GCL boundaries), GCL+ (between the RNFL and the inner nuclear layer boundaries), GCL++ (between the ILM and the inner nuclear layer boundaries), and retinal thickness (between the ILM and the retinal pigment epithelium boundaries). Additionally, both the ETDRS and TSNIT protocols provide automated choroidal thickness measurements (from the Bruch membrane to the choroidal-scleral interface).

In this study, the authors recorded the total retinal and choroid thickness in the 9 ETDRS macular areas and the RNFL, retina, GCL+, GCL++, and choroid thickness in the 4 quadrants and 6 sectors of the TSNIT peripapillary area.

All scans were obtained by the same experienced operator and were checked by an experienced rater for segmentation quality immediately after acquisition. If erroneous segmentation was observed, the scan was rejected and repeated. The DRI Triton SS-OCT (1050 nm) provides a quality scale in the image to indicate the signal strength. The quality score ranges from 0 (poor quality) to 100 (excellent quality). Only images with a score >55 were analysed in our study. Poor-quality images were rejected and recaptured prior to data analysis.

In the first phase of the work, the authors obtained the area under the receiver operator characteristic curve (AUC), as to evaluate the discriminant capacity of each of the available variables. Next, the variables with the highest AUC were selected as components of the classifier's input feature vector.

## 2.2. Support Vector Machine

In a two-class classification problem, a SVM seeks the hyperplane that separates two different classes with maximum margins (support vectors) [27]. If the original data ( $X$ ) are not linearly separable, a non-linear transformation to a higher dimensional space ( $H$ ) can be performed using a kernel function,  $\Phi(\cdot) := X \rightarrow H$ , such that  $H$  improves the separability between the two classes. Kernel function examples include linear, polynomial, radial basis, or Gaussian, etc.

In this paper, the Gaussian function below was used as the transformation kernel.

$$K_{\text{Gaussian}}(\mathbf{x}, \mathbf{c}) = \exp\left(-\|\mathbf{x} - \mathbf{c}\|^2 / 2\sigma^2\right) \quad (1)$$

where  $\mathbf{x}, \mathbf{c} \in \mathbb{R}^P$ ,  $\mathbf{c}$  is the centre of the Gaussian function, and  $P$  is the dimension of the feature vector. The  $\sigma$  parameter determines the width of the Gaussian kernel.

## 2.3. Statistical Methods and Classification Assessment

Statistical analyses were performed with the IBM SPSS Statistics 25 software package (IBM Corp., Armonk, NY, USA) and Statgraphics Centurion XVII (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA). To eliminate possible confusion factors associated with age, exhaustive comparisons were made between the control subjects and the MS patients, analysing the distribution, central trend (means and medians), and variance. A similar comparison was made with the rest of the OCT variables analysed in the study. The comparisons between groups were analysed as follows: Kolmogorov–Smirnov (K–S) tests were used to test distributions, Fisher–Snedecor distribution was used to study the differences in variances, Student's  $t$  distribution was used to analyse the means, and the Mann–Whitney Wilcoxon test was used to compare the medians.

The K–S non-parametric test determines if two samples of data are from the same distribution. The Fisher–Snedecor distribution is a parametric approach to study the equality of the variances of the samples. The analysis of means was performed with the parametric Student's  $t$  test, and the medians were analysed using the Mann–Whitney Wilcoxon non-parametric test. The parametric tests were conducted under normal conditions in the groups.



A  $p$  value  $< 0.05$  was considered statistically significant. Correlations were estimated with the Pearson rank correlation. The area under the ROC curve (calculated with SPSS Statistics 25) was employed to assess the discrimination capability of the feature proposed in this study. The AUC quantifies the overlaps between variables distributions. An AUC value of 0.5 implies that the distributions in controls and patients groups overlap. AUC values above 0.9 indicate high diagnostic accuracy [28].

The classifier was implemented using the Classification Learner app included in Statistics and Machine Learning Toolbox 11.6 from MATLAB (Mathworks Inc., Natick, MA, USA). Classification performance was assessed using Matthew's correlation coefficient (MCC), which summarizes the confusion matrix [29]. MCC ranges are between 1 and  $-1$ . A MCC value of 1 denotes a perfect classification, while a value of  $-1$  is a totally erroneous classification, and 0 indicates a random prediction. In a binary classification problem, the MCC is recommended over other parameters like the accuracy and F1 score [30]. The performance of the classifier was evaluated using leave-one-out cross-validation.

### 3. Results

Table 1 shows the results of comparison of the ages of the subjects in the sample. It compares distributions (Kolmogorov–Smirnov statistic), variances (Fisher–Snedecor distribution), means (Student's  $t$  test) and medians (Mann–Whitney Wilcoxon). The sample can be considered homogeneous in terms of age, as the comparisons made do not reveal any significant differences ( $p > 0.05$ ). Although there were no differences between groups, there was a larger proportion of females due to the greater incidence of this disease in this gender. Both MS patients and healthy control subjects were of average adult age and were similar. The groups were therefore considered comparable. The time since MS onset in the overall group (male and female) was (mean (standard deviation)): 15.28 (11.17) years. In males it was 15.70 (15.14) years, and in females it was 15.15 (9.97) years. There were no significant differences in the distribution or central trend (means:  $p = 0.893$ , medians:  $p = 0.686$ ), nor in variance ( $p = 0.079$ ). The EDSS score was 1.55 (0.57). Overall, 20% of the patients were not receiving treatment, 39% were being treated with interferons, and 33% were being treated with immune modulators (principally fingolimod).

Calculating the discriminant capacity of all the variables available in the database (Table 2), it was confirmed that the best results in the classifier (highest MCC value) were obtained by considering the first 3 variables with the highest AUC values as elements of the feature vector, namely,  $AUC_{GCL++\_Total} = 0.879$ ,  $AUC_{ETDRS\_IN\_Retina} = 0.859$ , and  $AUC_{ETDRS\_ON\_Retina} = 0.849$ .

Table 3 shows the values of the three variables used to classify the control group and the patients (GCL++\_Total, ETDRS\_IN\_Retina, ETDRS\_ON\_Retina), as well as the results of comparing the distributions, variances, means, and medians.

The values of the three variables were higher in the control subjects than in the MS patients, and there are significant differences in the distribution, variance, means, and medians (Table 3). Figure 3a–c shows, in detail, the distribution of the three variables in the control subjects and MS patients. The values in the following subgroups are also shown: C\_M: Controls\_Male; C\_F: Controls\_Female; MS\_M: MS\_Male; MS\_F: MS\_Female. In both the control group and the MS patient group, the combined GCL++\_Total and ETDRS\_ON\_Retina variables were higher in females than in males.

Figure 3d–f shows the variation with age in the three variables analysed. Of the 12 situations shown in the figures, in our database, there was only a significant correlation with age in the ETDRS\_IN\_Retina variable ( $r = 0.414$ ,  $p = 0.014$ ) in the Controls\_Female subgroup (Figure 3e).

Table 1. Comparison of subject ages.

	Controls (n = 48)	MS (n = 48)	Test to Compare Distributions	Test to Compare Variances	Test to Compare Means	Test to Compare Medians	AUC (n = 96)	AUC <sub>M</sub> (n = 24)	AUC <sub>F</sub> (n = 72)
<b>GCL++_Total (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	151.65 (10.28)	130.91 (16.63)	K-S = 3.162, p = 0.000	F = 0.381, p = 0.0009	t = 7.759, p = $4.43 \times 10^{-7}$ not assuming equal variances	W = 326.0, p = $3.27 \times 10^{-11}$	0.879	0.750	0.934
<b>ETDRS_IN_Retina (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	317.52 (11.35)	291.28 (30.71)	K-S = 3.102, p = $8.801 \times 10^{-9}$	F = 0.136, p = $1.29 \times 10^{-10}$	t = 5.937, p = $6.93 \times 10^{-7}$ not assuming equal variances	W = 379.0, p = $3.20 \times 10^{-10}$	0.859	0.845	0.853
<b>ETDRS_ON_Retina (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	291.72 (11.28)	270.62 (17.96)	K-S = 3.101, p = $8.795 \times 10^{-9}$	F = 0.394, p = 0.001	t = 7.272, p = 0.000 not assuming equal variances	W = 406.5, p = $1.00 \times 10^{-9}$	0.849	0.821	0.859

MS: Multiple sclerosis; SD: Standard deviation; C: Control; vs: Versus; n: Number of subjects; K-S: Kolmogorov–Smirnov statistic, p: significance statistics; F: Fisher–Snedecor; t: Student's t test; W: Mann–Whitney Wilcoxon.

**Table 2.** Operator characteristic curve (AUC) values obtained in the study.

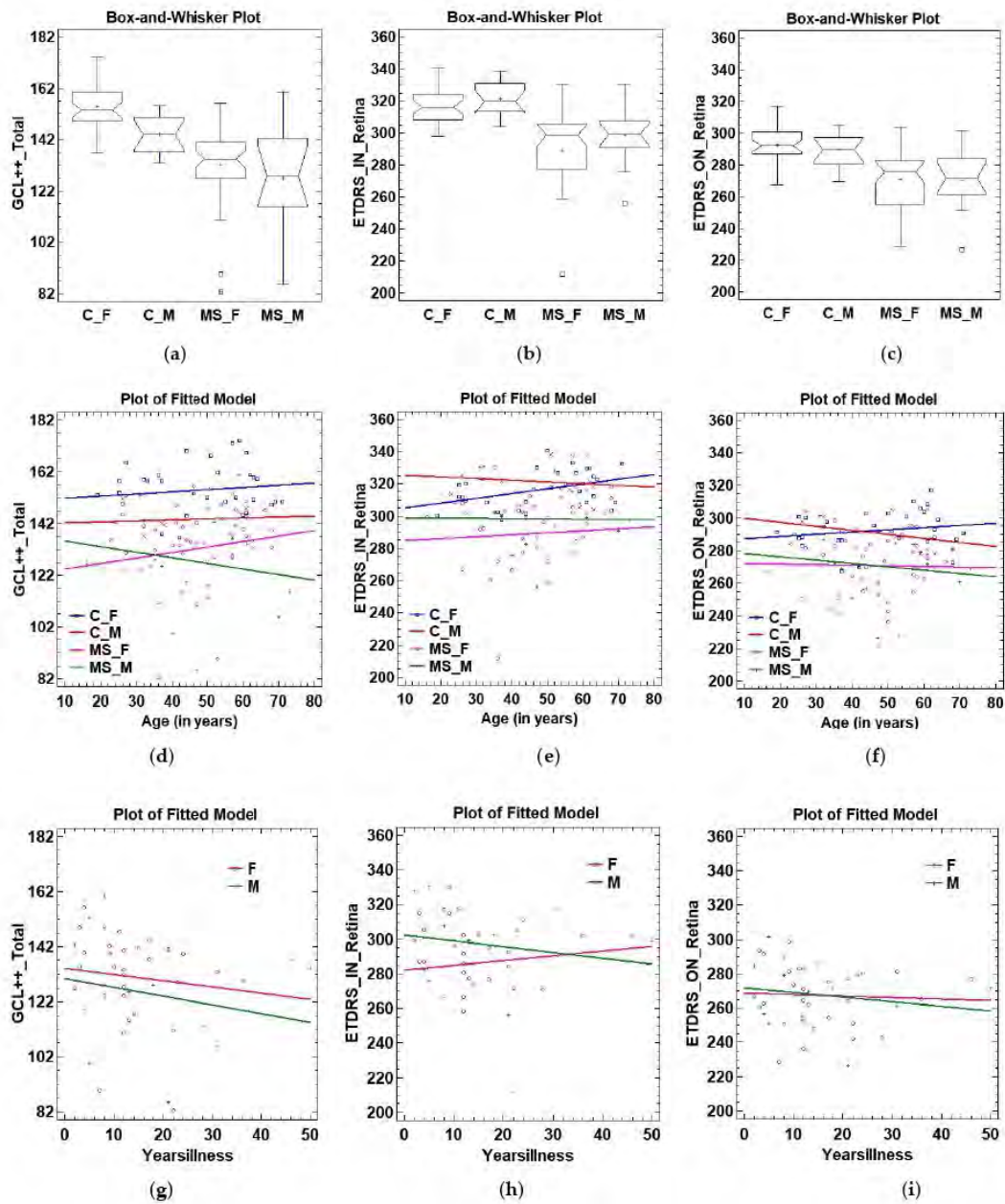
Area		Retina	Choroid	RNFL	GCL+	GCL++
ETDRS	Inner superior (IS)	0.818	0.570	–	–	–
	Inner nasal (IN)	0.859	0.520	–	–	–
	Inner inferior (II)	0.836	0.509	–	–	–
	Inner temporal (IT)	0.812	0.512	–	–	–
	Outer superior (OS)	0.755	0.541	–	–	–
	Outer nasal (ON)	0.849	0.501	–	–	–
	Outer inferior (OI)	0.751	0.512	–	–	–
	Outer temporal (OT)	0.712	0.520	–	–	–
Quadrants	Temporal (T)	0.805	0.515	0.656	0.82	0.772
	Superior (S)	0.831	0.516	0.832	0.626	0.805
	Nasal (N)	0.733	0.507	0.68	0.685	0.724
	Inferior (I)	0.823	0.52	0.766	0.668	0.805
TSNIT	Temporal (T)	0.805	0.515	0.656	0.82	0.772
	Superotemporal (ST)	0.762	0.511	0.742	0.624	0.768
	Superonasal (SN)	0.829	0.502	0.82	0.605	0.829
	Nasal (N)	0.753	0.501	0.704	0.685	0.745
	Inferonasal (IN)	0.769	0.509	0.692	0.679	0.737
	Inferotemporal (IT)	0.770	0.523	0.738	0.596	0.764
	Total	0.835	0.517	0.809	0.76	0.879

ETDRS: Early treatment diabetic retinopathy study; TSNIT: Temporal-superior-nasal-inferior-temporal; RNFL: Retina nerve fibre layer; GCL+ and GCL++: Ganglion cell layers.

**Table 3.** Values of the variables used in the feature vector.

	Controls (n = 48)	MS (n = 48)	Test to Compare Distributions	Test to Compare Variances	Test to Compare Means	Test to Compare Medians	AUC (n = 96)	AUC <sub>M</sub> (n = 24)	AUC <sub>F</sub> (n = 72)
GCL++_Total ( $\mu\text{m}$ )	151.65 (10.28)	130.91 (16.63)	K-S = 3.162, p = 0.000	F = 0.381, p = 0.0009	T = 7.759, p = $4.43 \times 10^{-7}$ , not assuming equal variances	W = 326.0, p = $3.27 \times 10^{-11}$	0.879	0.750	0.934
ETDRS_IN_Retina ( $\mu\text{m}$ )	317.52 (11.35)	291.28 (30.71)	K-S = 3.102, p = $8.801 \times 10^{-9}$	F = 0.136, p = $1.29 \times 10^{-10}$	t = 5.937, p = $6.93 \times 10^{-7}$ , not assuming equal variances	W = 379.0, p = $3.20 \times 10^{-10}$	0.859	0.845	0.853
ETDRS_ON_Retina ( $\mu\text{m}$ )	291.72 (11.28)	270.62 (17.96)	K-S = 3.101, p = $8.795 \times 10^{-9}$	F = 0.394, p = 0.001	t = 7.272, p = 0.000, not assuming equal variances	W = 406.5, p = $1.00 \times 10^{-9}$	0.849	0.821	0.859

MS: Multiple sclerosis; n: Number of subjects; K-S: Kolmogorov-Smirnov statistic; p: Significance statistics; F: Fisher-Snedecor; t: Student's t test; W: Mann-Whitney Wilcoxon; AUC<sub>M</sub>: Area under the curve for males; AUC<sub>F</sub>: Area under the curve for females; GCL++\_Total: Global GCL++ thickness evaluated at the peripapillary area between the inner limiting membrane and the inner nuclear layer boundaries; ETDRS\_IN\_Retina: Macular retina thickness in the nasal quadrant of the inner ring; ETDRS\_ON\_Retina: Macular retina thickness in the nasal quadrant of the outer ring;  $\mu\text{m}$ : Micrometres.



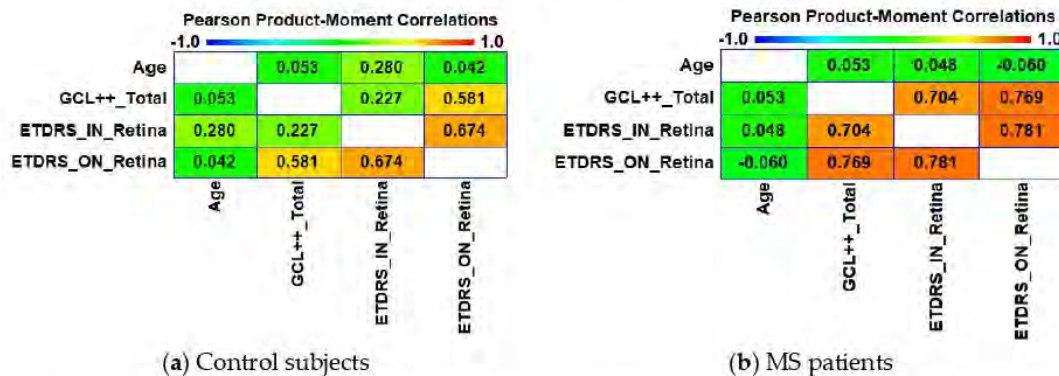
**Figure 3.** Study of the classifier input variables. (a) GCL++\_Total according to subjects subtypes. (b) ETDRS\_IN\_Retina according to subjects subtypes. (c) ETDRS\_ON\_Retina according to subjects subtypes. (d) GCL++\_Total according to age. (e) ETDRS\_IN\_Retina according to age. (f) ETDRS\_ON\_Retina according to age. (g) GCL++\_Total according to yearsillness. (h) ETDRS\_IN\_Retina according to yearsillness. (i) ETDRS\_ON\_Retina according to yearsillness. C\_M: Controls\_Male; C\_F: Controls\_Female; MS\_M: MS\_Male; MS\_F: MS\_Female; GCL++\_Total: Global GCL++ thickness evaluated at the peripapillary area between the inner limiting membrane and the inner nuclear layer boundaries; ETDRS\_IN\_Retina: Macular retina thickness in the nasal quadrant of the inner ring; ETDRS\_ON\_Retina: Macular retina thickness in the nasal quadrant of the outer ring.

The GCL++\_Total variable decreases with the years of disease in both males and females, although, in our case, not significantly ( $p_{\text{MALES}} = 0.57$ ,  $p_{\text{FEMALES}} = 0.43$ ), and mostly affecting males.

The intercepts of the regression were 130.33 and 134.24 for males and females, respectively, while the slopes were  $-0.32$  and  $-0.23$ , respectively (Figure 3g).

The variation in the variable ETDRS\_IN\_Retina (Figure 3h) with years of disease was negative in males ( $\text{slope}_{\text{MALES}} = -0.34$ ) and positive in females ( $\text{slope}_{\text{FEMALES}} = 0.27$ ), though, in our case, not significantly ( $p_{\text{MALES}} = 0.52$ ,  $p_{\text{FEMALES}} = 0.67$ ). The variable ETDRS\_ON\_Retina decreased in both sexes, though, again, not significantly ( $p_{\text{MALES}} = 0.58$ ,  $p_{\text{FEMALE}} = 0.78$ ), with the variation being more pronounced in males ( $\text{slope}_{\text{MALES}} = -0.26$ ,  $\text{slope}_{\text{FEMALES}} = -0.08$ , Figure 3i).

In the healthy subjects, we observed a significant positive correlation between ETDRS\_IN\_Retina vs. ETDRS\_ON\_Retina ( $r = 0.674$ ,  $p = 0.000$ ) and ETDRS\_ON\_Retina vs. GCL++\_Total ( $r = 0.581$ ,  $p = 0.000$ , Figure 4a). In patients, the strength of these correlations increases (Figure 4b): ETDRS\_IN\_Retina vs. ETDRS\_ON\_Retina ( $r = 0.781$ ,  $p = 0.000$ ) and ETDRS\_ON\_Retina vs. GCL++\_Total ( $r = 0.769$ ,  $p = 0.000$ ). In addition, the correlation between ETDRS\_IN\_Retina vs. GCL++\_Total ( $r = 0.704$ ,  $p = 0.000$ ) is significant. Our results suggest that the thickness of the outer and inner nasal retina correlate with the total GCL++ thickness, especially in patients with MS without previous episodes of ON and, therefore, it can be assumed that by analysing the thickness of the nasal sector of the retina (ETDRS protocol) it is possible to ascertain the thickness of the peripapillary GCL++ layer. This can be useful if OCT devices with segmentation capability are not available, since even analysing the inner nasal retina with normal OCT devices provides an idea of how the GCL++ layer is behaving.



**Figure 4.** Correlation coefficients between the age and OCT variables. (a) In control subjects. (b) In MS patients. GCL++\_Total: Global GCL++ thickness evaluated at the peripapillary area; ETDRS\_IN\_Retina: Macular retina thickness in the nasal quadrant of the inner ring; ETDRS\_ON\_Retina: Macular retina thickness in the nasal quadrant of the outer ring.

#### Automatic Classifier

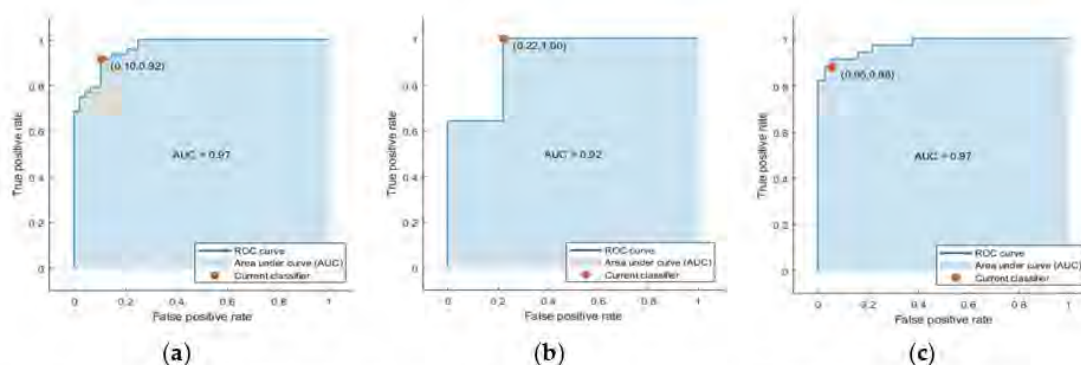
Classification was performed by taking the three variables as the inputs and the subject status (control, MS) as the output, using a SVM with a Gaussian quadratic kernel. The K-fold method ( $K = 1$ ) was used, with a cross-validation with a leave-one-out procedure.

Table 4 shows the confusion matrix obtained. The following values define the characteristics of this matrix:  $\text{MCC} = 0.81$ ,  $\text{sensitivity} = 0.89$ ,  $\text{specificity} = 0.92$  and  $\text{accuracy} = 0.91$ , with an area under the ROC curve of  $\text{AUC}_{\text{CLASSIFIER}} = 0.97$  (Figure 5a). Only the males in the sample obtain  $\text{AUC}_{\text{CLASSIFIER}_M} = 0.92$  ( $n = 24$ ) (Figure 5b), while only the females obtains  $\text{AUC}_{\text{CLASSIFIER}_F} = 0.97$  ( $n = 72$ ) (Figure 5c).

**Table 4.** Confusion matrix obtained with the Gaussian SVM.

True Class	Predicted Class (Males and Females)		Predicted Class (Males)		Predicted Class (Females)	
	Controls	MS	Controls	MS	Controls	MS
Controls	44	4	14	0	30	4
MS	5	43	3	7	3	35

MS: Multiple sclerosis; SVM: Support vector machine.

**Figure 5.** AUC of the classifiers. (a) Full sample:  $AUC_{CLASSIFIER}$ . (b) Males:  $AUC_{CLASSIFIER\_M}$ . (c) Females:  $AUC_{CLASSIFIER\_F}$ .

#### 4. Discussion

In the latest revision to the McDonald criteria [31] the evidence on which to recommend OCT as a definitive biomarker in fulfilling dissemination in space or in time in support of MS diagnosis is considered insufficient, so finding novel parameters to increase sensitivity and specificity in terms of MS is a high priority [32].

The objective of this paper has been to evaluate the MS diagnostic capability of applying machine-learning techniques to SS-OCT data. It has demonstrated that it is possible to distinguish between MS patients and healthy subjects using SVM and it is possible to do so with a high degree of sensitivity and specificity.

The applications of machine-learning techniques have demonstrated their advantages in MRI-based MS diagnosis. For example, a pattern recognition technique was used in [33] to learn a discriminant function, obtaining a sensitivity of 0.82 and a specificity of 0.86, so as to distinguish between MS patients and control subjects using functional MRI (fMRI). In [23], SVMs were used as classifiers (with diffusion tensor imaging—DTI and fMRI data input) between control subjects and relapsing-remitting MS patients, obtaining an accuracy of  $89\% \pm 2\%$ .

The analysis of OCT data for use in diagnosis of MS is an active line of research [16,20,34–36]. In a previous paper [37], the authors used a SD-OCT device to take measurements of the RNFL of 106 patients with MS (29% with previous ON) and 115 control subjects. The 768 points registered during circular peripapillary scan acquisition were grouped to obtain 24 uniformly divided locations ( $15^\circ$  per location) that formed the feature vector of a multilayer perceptron trained by the back-propagation algorithm. Here, the area under the ROC curve of the classification was 0.945. The novel features of this paper were that the authors studied patients without ON, the measurements were obtained with more sensitive equipment (SS-OCT), the thickness of the GCL was evaluated at peripapillary level, the total retinal thicknesses were evaluated at a macular level, a study of the discriminant capacity of the measurements obtained was conducted to reduce the feature vector to 3 dimensions, and a SVM was used as classifier.

In the initial stages of the study, the authors analysed the variables obtained from SS-OCT that showed the greatest capacity to discriminate between the control subjects and MS patients:

GCL++\_Total (global GCL++ thickness evaluated at the peripapillary area), ETDRS\_IN\_Retina (macular retina thickness in the nasal quadrant of the inner ring), and ETDRS\_ON\_Retina (macular retina thickness in the nasal quadrant of the outer ring).

It is known that retinal layer thickness decreases in humans from the age of 40 onwards. Our results show that when analysing neuroretinal thickness by sex, healthy males suffer an expected loss of inner and outer nasal retinal thickness with age. In contrast, in healthy females, there is an increase in thickness with age, which may be associated with the macular changes and age-associated degeneration produced in this part of the retina, resulting in the appearance of drusen and cellular waste and the accumulation of liquid occurring more frequently in females [38].

In MS patients, males suffered a more pronounced loss with age than females, which would demonstrate greater neurodegenerative damage, an observation that concurs with those of other authors who have found that RRMS is generally more aggressive in males and that male relapse-onset patients accumulate disability faster than female patients [39,40]. MS is at least two to three times more common in females than in males, suggesting that hormones may also play a significant role in determining susceptibility to MS. There is increasing evidence that oestrogen may impact neuroprotection. Grey matter atrophy is an important correlate to clinical disability in MS. In MS animal models, mice treated with the oestrogen receptor (ER)- $\alpha$  ligand or ER- $\beta$  ligand showed preservation of cerebellar grey matter and Purkinje cells in MRI and histopathological studies [41].

Males with MS showed a tendency towards greater loss in peripapillary GCL++ in the outer retinal sector and, finally, in the inner retinal sector, exhibiting a pattern of topographic and sequential anterograde degeneration corresponding to the papillomacular bundle. In addition, a direct correlation of statistical significance was demonstrated in MS patients between the GCL++ values and those of the outer nasal retina (strong) ( $r = 0.769$ ,  $p = 0.000$ ) and the inner nasal retina (moderate) ( $r = 0.704$ ,  $p = 0.000$ ).

This loss is reflected in the anterograde degeneration, producing a reduction in average thickness in the macular area. Consequently, it can be deduced that in its early stages, MS manifests principally in the papillomacular bundle.

In addition, females with MS exhibited an upward trend in peripapillary GCL++ thickness. This may have been a reflection of increased immune infiltration by anterograde axonal spread from the brain, as immune diseases such as MS are known to have a greater incidence in females [42,43].

In regard to the years of disease, similar findings have been made. Males present a greater tendency to lose thickness than females, this being mainly evident in the inner retina in the form of greater loss of thickness when compared with females. This suggests more advanced anterograde degeneration in males after the same number of years of disease progression. This more obvious difference in the inner retina may be due to the combination of a female protective role as well as to alterations in the pigment epithelium of the retina and the macular outer retina associated with age.

Conversely, it was also observed that in the variables in which males suffered a more pronounced loss of thickness than females, the males presented greater thicknesses at earlier ages. In this regard, volumetric brain analyses recorded higher measurements in young/adolescent males, with lower measurements at later ages [44]. This suggests that neuroretinal loss is greater when the initial thickness is greater, as suggested in relation to other neurodegenerative diseases, such as glaucoma [45].

In addition, MS patients of both sexes presented lower thicknesses in the 3 most discriminant variables from early ages when compared with healthy subjects, suggesting that the development of the disease could be detected by minor neuroretinal quantification from childhood.

The values recorded in our study in the variables that comprise the feature vector of the classifier are in general agreement with the findings of other similar papers. In [46], the authors observed with SD-OCT that a decrease in peripapillary RNFL thickness was identified in the temporal quadrant ( $56.6 \mu\text{m}$  vs.  $67.8 \mu\text{m}$ ), mean macular thickness diminished ( $280$  vs.  $287 \mu\text{m}$ ,  $p < 0.05$ ), and there was a moderate and statistically significant direct correlation between RNFL and mean macular thickness ( $r = 0.69$ ,  $p < 0.01$ ) in individuals with MS without previous ON ( $p < 0.05$ ). Petzold et al. [19] analysed

papers evaluating SD-OCT. In total, 15 studies (3154 eyes) have been conducted on patients without ON, obtaining an estimated peripapillary thickness loss in MS patients compared with control subjects of  $7.08 \mu\text{m}$  with a 95% CI (8.65 to 5.52) and finding that the peripapillary RNFL and macular GCIPL are the most affected layers. Our findings with an SS-OCT device, which is more powerful and achieves greater penetration of the layers, are similar. The ability of the SS-OCT to generate thousands of cuts quickly increases the resolution of the image and, therefore, it is more sensitive to the detection of very subtle or early changes. Although this loss of  $7.08 \mu\text{m}$  will naturally depend on the number of years that the patient has had the disease and the aggressiveness of it (e.g., patients with progressive forms present greater loss of peripapillary thickness), this paper endeavours to identify the utility of the OCT thickness variables in the early diagnosis of MS without previous ON, even when that 7-micron loss has not yet occurred. It is in this case that SVMs can optimize certain specific variables' capacity to discriminate between healthy subjects and recent patients.

In [22], it was concluded, using SS-OCT technology, that in MS patients without ON episodes, significant macular thinning was observed in all ETDRS areas in MS patients, and peripapillary GCL++ measurements were found to be reduced in all sectors ( $p < 0.001$ ) except the nasal quadrant ( $p > 0.05$ ). In this study, we have demonstrated that the most appropriate variable for optimizing the MCC parameter is GCL++\_Total ( $AUC_{\text{GCL++\_Total}} = 0.879$ ). Although GCL+ is the layer that has been shown to offer most specific value for measuring neurodegeneration in MS [21,47], our results found GCL++ to be more discriminatory. This may be a consequence of the fact that obtaining this variable using OCT also obtains RNFL thickness, which, as discussed above, has proven to reflect the neurodegenerative process in MS disease to a significant extent. In addition, after a prior evaluation using the AUC, the authors found that the best macular results in the classification were obtained in the outer and inner ETDRS nasal sectors ( $AUC_{\text{ETDRS\_IN\_Retina}} = 0.859$ ,  $AUC_{\text{ETDRS\_ON\_Retina}} = 0.849$ ), which correspond to the papillomacular bundle, and were also correlated in strength, showing a pattern of anterograde neurodegeneration.

There are several reasons why, in this paper, the layers indicated in [19,22] have not been used as a feature vector for the SVM classifier. The meta-analysis conducted by Petzold et al. refers to papers that used SD-OCT devices, and the measurements of retinal layers are different in terms of the Fourier-domain and swept-source technologies [48,49]. In relation to [22], it should be noted that the ultimate objective of this paper has been to obtain the best MCC parameter for classification. For that reason, the feature vector variables selected for the classifier are the combination that maximizes this parameter.

From the point of view of the practical application of the proposed method, the retina measurements were recorded using an SS-OCT device that, in a single take, using the 3D wide protocol, analyses a  $12 \times 9 \text{ mm}$  area of the posterior pole, including the macula (ETDRS scan) and optic nerve head (TSNIT scan). The feature vector is made up of data from the macula and the optic nerve and, therefore, if the positive results produced by the classifier are confirmed in a more extensive study, it would be viable to implement the method set out in this paper in OCT software and receive a proposed diagnosis in real time.

OCT has been shown to be a useful tool for diagnosing and monitoring progressive neuroretinal loss in neurodegenerative pathologies such as Alzheimer's or Parkinson's disease, as well as for detecting dynamic changes in neuroinflammatory diseases such as MS. Structural variables obtained using OCT help differential diagnosis in disorders that overlap clinically with MS, such as neuromyelitis optic spectrum disorders (NMOSD), myelin-oligodendrocyte-glycoprotein (MOG) seropositive autoimmunity or Susac syndrome (SuS). However, definitive OCT biomarkers for diagnosing MS in early-onset or difficult cases, or for differentiating between the various MS-like entities, have not yet been found [32]. This study has made it possible to detect the 3 most discriminant variables for use in an early-onset MS SVM classifier that could serve as differential parameters in MS-like pathologies or in difficult cases where MRI is not effective.



## 5. Conclusions

Currently, MS diagnosis is based on clinical and standard neuroimaging symptoms defined by the updated McDonald criteria [31]. However, it is accepted that the information provided by OCT plays a relevant role in ascertaining the degree of axonal damage. Definitive MS diagnosis based on the fulfilment of the McDonald criteria can take many years from the appearance of the first symptoms. Accelerating diagnosis has many benefits for patients, as there are several new disease-modifying treatments (alemtuzumab, cladribine, or ocrelizumab) that, if administered at an early stage, would help halt the progression of MS and the associated neural damage.

In this paper, we have demonstrated that it is possible to classify control subjects and MS patients without previous ON by applying machine-learning techniques to study structural neurodegeneration in the retina. Our findings suggest that including OCT in MS diagnostic criteria could help expedite definitive diagnosis.

This study has several limitations that can be overcome in the future. Firstly, it would be desirable to have a database of patients and control subjects from various centres. Secondly, the possible correlations between the OCT variables analysed and the MRI results were not analysed. If the findings were corroborated, the OCT technique would be a more accessible and cost-efficient biomarker. It would also be beneficial to replicate the study using variables obtained with SD-OCT devices, which are those which are currently used in clinical practice.

In addition, and as future lines of research, applying the methods developed for the structural analysis of the retina in other diseases (e.g., Alzheimer's or Parkinson's disease), analysing other layers of the retina, and looking for areas with maximum discriminant capacity that do not follow the morphology defined by the ETDRS or TSNIT grids [50] are suggested.

**Author Contributions:** Conceptualization, E.G.-M., M.J.R., E.L.-G., C.C. and L.B.; Methodology, E.V., E.L.-G., C.C., E.M.S.M., M.C.A.-R. and J.M.M.; Software C.C., E.L.G. and J.M.M.; Writing—original draft preparation, L.B., E.M.S.M., E.G.-M. and M.J.R.; Writing—review and Editing, L.B., E.G.-M., E.L.-G., C.C., E.V., M.C.A.-R., J.M.M., L.E.P. and M.J.R.; Supervision L.B. and E.G.-M.; Project administration, L.B. and E.G.-M.; Funding acquisition, L.B. and E.G.-M.

**Funding:** This research was supported by the Secretariat of State for Research, Development and Innovation [grant number DPI2017-88438-R (AEI/FEDER, EU), awarded to L.B.], the Carlos III Health Institute [grant number PII7/01726 for “Neuro-ophthalmological evaluation as biomarker of diagnosis, monitoring and prognosis in multiple sclerosis”, awarded to EGM] and RETICS Oftared, RD16/0008/020, awarded to L.B. and RD16/0008/029, awarded to E.G.-M.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Yamout, B.; Sahraian, M.; Bohlega, S.; Al-Jumah, M.; Goueider, R.; Dahdaleh, M.; Inshasi, J.; Hashem, S.; Alsharoqi, I.; Khoury, S.; et al. Consensus recommendations for the diagnosis and treatment of multiple sclerosis: 2019 revisions to the MENACTRIMS guidelines. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **2020**, *37*, 101459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Kaunzner, U.W.; Gauthier, S.A. MRI in the assessment and monitoring of multiple sclerosis: An update on best practice. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* **2017**, *10*, 247–261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Sakai, R.E.; Feller, D.J.; Galetta, K.M.; Galetta, S.L.; Balcer, L.J. Vision in multiple sclerosis: The story, structure-function correlations, and models for neuroprotection. *J. Neuroophthalmol.* **2011**, *31*, 362–373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Huang, D.; Swanson, E.A.; Lin, C.P.; Schuman, J.S.; Stinson, W.G.; Chang, W.; Hee, M.R.; Flotte, T.; Gregory, K.; Puliafito, C.A. Optical coherence tomography. *Science* **1991**, *254*, 1178–1181. [[CrossRef](#)]
5. Pérez Del Palomar, A.; Cegoñino, J.; Montolio, A.; Orduna, E.; Vilades, E.; Sebastián, B.; Pablo, L.E.; García-Martin, E. Swept source optical coherence tomography to early detect multiple sclerosis disease. The use of machine learning techniques. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0216410. [[CrossRef](#)]

6. de Boer, J.F.; Leitgeb, R.; Wojtkowski, M. Twenty-five years of optical coherence tomography: The paradigm shift in sensitivity and speed provided by Fourier domain OCT [Invited]. *Biomed. Opt. Express* **2017**, *8*, 3248. [CrossRef]
7. Potsaid, B.; Baumann, B.; Huang, D.; Barry, S.; Cable, A.E.; Schuman, J.S.; Duker, J.S.; Fujimoto, J.G. Ultrahigh speed 1050nm swept source/Fourier domain OCT retinal and anterior segment imaging at 100,000 to 400,000 axial scans per second. *Opt. Express* **2010**, *18*, 20029–20048. [CrossRef]
8. Yasin Alibhai, A.; Or, C.; Witkin, A.J. Swept Source Optical Coherence Tomography: A Review. *Curr. Ophthalmol. Rep.* **2018**, *6*, 7–16. [CrossRef]
9. Hirata, M.; Tsujikawa, A.; Matsumoto, A.; Hangai, M.; Ooto, S.; Yamashiro, K.; Akiba, M.; Yoshimura, N. Macular choroidal thickness and volume in normal subjects measured by swept-source optical coherence tomography. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2011**, *52*, 4971–4978. [CrossRef]
10. Copete, S.; Flores-Moreno, I.; Montero, J.A.; Duker, J.S.; Ruiz-Moreno, J.M. Direct comparison of spectral-domain and swept-source OCT in the measurement of choroidal thickness in normal eyes. *Br. J. Ophthalmol.* **2014**, *98*, 334–338. [CrossRef]
11. Cogliati, A.; Canavesi, C.; Hayes, A.; Tankam, P.; Duma, V.-F.; Santhanam, A.; Thompson, K.P.; Rolland, J.P. MEMS-based handheld scanning probe with pre-shaped input signals for distortion-free images in Gabor-domain optical coherence microscopy. *Opt. Express* **2016**, *24*, 13365. [CrossRef] [PubMed]
12. Garcia-Martin, E.; Pueyo, V.; Pinilla, I.; Ara, J.-R.; Martin, J.; Fernandez, J. Fourier-domain OCT in multiple sclerosis patients: Reproducibility and ability to detect retinal nerve fiber layer atrophy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2011**, *52*, 4124–4131. [CrossRef] [PubMed]
13. Wicki, C.A.; Hanson, J.V.M.; Schippling, S. Optical coherence tomography as a means to characterize visual pathway involvement in multiple sclerosis. *Curr. Opin. Neurol.* **2018**, *31*, 662–668. [CrossRef] [PubMed]
14. Martinez-Lapiscina, E.H.; Arnow, S.; Wilson, J.A.; Saidha, S.; Preiningerova, J.L.; Oberwahrenbrock, T.; Brandt, A.U.; Pablo, L.E.; Guerrieri, S.; Gonzalez, I.; et al. Retinal thickness measured with optical coherence tomography and risk of disability worsening in multiple sclerosis: A cohort study. *Lancet Neurol.* **2016**, *15*, 574–584. [CrossRef]
15. Parisi, V.; Manni, G.; Spadaro, M.; Colacino, G.; Restuccia, R.; Marchi, S.; Bucci, M.G.; Pierelli, F. Correlation between morphological and functional retinal impairment in multiple sclerosis patients. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **1999**, *40*, 2520–2527.
16. Alonso, R.; Gonzalez-Moron, D.; Garcea, O. Optical coherence tomography as a biomarker of neurodegeneration in multiple sclerosis: A review. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **2018**, *22*, 77–82. [CrossRef]
17. Satue, M.; Obis, J.; Rodrigo, M.J.; Otin, S.; Fuertes, M.I.; Vilades, E.; Gracia, H.; Ara, J.R.; Alarcia, R.; Polo, V.; et al. Optical Coherence Tomography as a Biomarker for Diagnosis, Progression, and Prognosis of Neurodegenerative Diseases. *J. Ophthalmol.* **2016**, *2016*, 8503859. [CrossRef]
18. Kucharczuk, J.; Maciejek, Z.; Sikorski, B.L. Optical coherence tomography in diagnosis and monitoring multiple sclerosis. *Neurol. Neurochir. Pol.* **2018**, *52*, 140–149. [CrossRef]
19. Petzold, A.; Balcer, L.J.; Calabresi, P.A.; Costello, F.; Frohman, T.C.; Frohman, E.M.; Martinez-Lapiscina, E.H.; Green, A.J.; Kardon, R.; Outteryck, O.; et al. Retinal layer segmentation in multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Lancet. Neurol.* **2017**, *16*, 797–812. [CrossRef]
20. Fisher, J.B.; Jacobs, D.A.; Markowitz, C.E.; Galetta, S.L.; Volpe, N.J.; Nano-Schiavi, M.L.; Baier, M.L.; Frohman, E.M.; Winslow, H.; Frohman, T.C.; et al. Relation of visual function to retinal nerve fiber layer thickness in multiple sclerosis. *Ophthalmology* **2006**, *113*, 324–332. [CrossRef]
21. Britze, J.; Pihl-Jensen, G.; Frederiksen, J.L. Retinal ganglion cell analysis in multiple sclerosis and optic neuritis: A systematic review and meta-analysis. *J. Neurol.* **2017**, *264*, 1837–1853. [CrossRef] [PubMed]
22. Garcia-Martin, E.; Jarauta, L.; Vilades, E.; Ara, J.R.; Martin, J.; Polo, V.; Larrosa, J.M.; Pablo, L.E.; Satue, M. Ability of Swept-Source Optical Coherence Tomography to Detect Retinal and Choroidal Changes in Patients with Multiple Sclerosis. *J. Ophthalmol.* **2018**, *2018*, 7361212. [CrossRef] [PubMed]
23. Zurita, M.; Montalba, C.; Labbé, T.; Cruz, J.P.; Dalboni da Rocha, J.; Tejos, C.; Ciampi, E.; Cárcamo, C.; Sitaram, R.; Uribe, S. Characterization of relapsing-remitting multiple sclerosis patients using support vector machine classifications of functional and diffusion MRI data. *NeuroImage Clin.* **2018**, *20*, 724–730. [CrossRef] [PubMed]

24. Zhao, Y.; Healy, B.C.; Rotstein, D.; Guttmann, C.R.G.; Bakshi, R.; Weiner, H.L.; Brodley, C.E.; Chitnis, T. Exploration of machine learning techniques in predicting multiple sclerosis disease course. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0174866. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Zhang, Y.; Lu, S.; Zhou, X.; Yang, M.; Wu, L.; Liu, B.; Phillips, P.; Wang, S. Comparison of machine learning methods for stationary wavelet entropy-based multiple sclerosis detection: Decision tree, k-nearest neighbors, and support vector machine. *Simulation* **2016**, *92*, 861–871. [[CrossRef](#)]
26. Polman, C.H.; Reingold, S.C.; Banwell, B.; Clanet, M.; Cohen, J.A.; Filippi, M.; Fujihara, K.; Havrdova, E.; Hutchinson, M.; Kappos, L.; et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann. Neurol.* **2011**, *69*, 292–302. [[CrossRef](#)]
27. Vapnik, V.N. An overview of statistical learning theory. *IEEE Trans. Neural Netw.* **1999**, *10*, 988–999. [[CrossRef](#)]
28. Bamber, D. The area above the ordinal dominance graph and the area below the receiver operating characteristic graph. *J. Math. Psychol.* **1975**, *12*, 387–415. [[CrossRef](#)]
29. Matthews, B.W. Comparison of the predicted and observed secondary structure of T4 phage lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta-Protein Struct.* **1975**, *405*, 442–451. [[CrossRef](#)]
30. Chicco, D. Ten quick tips for machine learning in computational biology. *BioData Min.* **2017**, *10*, 35. [[CrossRef](#)]
31. Thompson, A.J.; Banwell, B.L.; Barkhof, F.; Carroll, W.M.; Coetzee, T.; Comi, G.; Correale, J.; Fazekas, F.; Filippi, M.; Freedman, M.S.; et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* **2018**, *17*, 162–173. [[CrossRef](#)]
32. Oertel, F.C.; Zimmermann, H.G.; Brandt, A.U.; Paul, F. Novel uses of retinal imaging with optical coherence tomography in multiple sclerosis. *Expert Rev. Neurother.* **2019**, *19*, 31–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Richiardi, J.; Gschwind, M.; Simioni, S.; Annoni, J.-M.; Greco, B.; Hagmann, P.; Schlupe, M.; Vuilleumier, P.; Van De Ville, D. Classifying minimally disabled multiple sclerosis patients from resting state functional connectivity. *Neuroimage* **2012**, *62*, 2021–2033. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Costello, F.; Burton, J.M. Retinal imaging with optical coherence tomography: A biomarker in multiple sclerosis? *Eye Brain* **2018**, *10*, 47–63. [[CrossRef](#)]
35. Srinivasan, S.; Efron, N. Optical coherence tomography in the investigation of systemic neurologic disease. *Clin. Exp. Optom.* **2019**, *102*, 309–319. [[CrossRef](#)]
36. Britze, J.; Frederiksen, J.L. Optical coherence tomography in multiple sclerosis. *Eye* **2018**, *32*, 884–888. [[CrossRef](#)]
37. Garcia-Martin, E.; Pablo, L.E.; Herrero, R.; Ara, J.R.; Martin, J.; Larrosa, J.M.; Polo, V.; Garcia-Feijoo, J.; Fernandez, J. Neural networks to identify multiple sclerosis with optical coherence tomography. *Acta Ophthalmol.* **2013**, *91*, e628–e634. [[CrossRef](#)]
38. Rudnicka, A.R.; Jarrar, Z.; Wormald, R.; Cook, D.G.; Fletcher, A.; Owen, C.G. Age and gender variations in age-related macular degeneration prevalence in populations of European ancestry: A meta-analysis. *Ophthalmology* **2012**, *119*, 571–580. [[CrossRef](#)]
39. Harbo, H.F.; Gold, R.; Tintoré, M. Sex and gender issues in multiple sclerosis. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* **2013**, *6*, 237–248. [[CrossRef](#)]
40. Ribbons, K.A.; McElduff, P.; Boz, C.; Trojano, M.; Izquierdo, G.; Duquette, P.; Girard, M.; Grand'Maison, F.; Hupperts, R.; Grammond, P.; et al. Male Sex Is Independently Associated with Faster Disability Accumulation in Relapse-Onset MS but Not in Primary Progressive MS. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0122686. [[CrossRef](#)]
41. MacKenzie-Graham, A.J.; Rinek, G.A.; Avedisian, A.; Morales, L.B.; Umeda, E.; Boulat, B.; Jacobs, R.E.; Toga, A.W.; Voskuhl, R.R. Estrogen treatment prevents gray matter atrophy in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurosci. Res.* **2012**, *90*, 1310–1323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. González, H.; Elgueta, D.; Montoya, A.; Pacheco, R. Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *J. Neuroimmunol.* **2014**, *274*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Desai, M.K.; Brinton, R.D. Autoimmune Disease in Women: Endocrine Transition and Risk Across the Lifespan. *Front. Endocrinol.* **2019**, *10*, 265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Herting, M.M.; Sowell, E.R. Puberty and structural brain development in humans. *Front. Neuroendocrinol.* **2017**, *44*, 122–137. [[CrossRef](#)]
45. Guo, L.; Normando, E.M.; Nizari, S.; Lara, D.; Cordeiro, M.F. Tracking longitudinal retinal changes in experimental ocular hypertension using the cSLO and spectral domain-OCT. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2010**, *51*, 6504–6513. [[CrossRef](#)]

46. Fjeldstad, C.; Bembem, M.; Pardo, G. Reduced retinal nerve fiber layer and macular thickness in patients with multiple sclerosis with no history of optic neuritis identified by the use of spectral domain high-definition optical coherence tomography. *J. Clin. Neurosci.* **2011**, *18*, 1469–1472. [[CrossRef](#)]
47. Garcia-Martin, E.; Polo, V.; Larrosa, J.M.; Marques, M.L.; Herrero, R.; Martin, J.; Ara, J.R.; Fernandez, J.; Pablo, L.E. Retinal layer segmentation in patients with multiple sclerosis using spectral domain optical coherence tomography. *Ophthalmology* **2014**, *121*, 573–579. [[CrossRef](#)]
48. Sull, A.C.; Vuong, L.N.; Price, L.L.; Srinivasan, V.J.; Gorczynska, I.; Fujimoto, J.G.; Schuman, J.S.; Duker, J.S. Comparison of spectral/Fourier domain optical coherence tomography instruments for assessment of normal macular thickness. *Retina* **2010**, *30*, 235–245. [[CrossRef](#)]
49. Miller, A.R.; Roisman, L.; Zhang, Q.; Zheng, F.; Rafael de Oliveira Dias, J.; Yehoshua, Z.; Schaal, K.B.; Feuer, W.; Gregori, G.; Chu, Z.; et al. Comparison Between Spectral-Domain and Swept-Source Optical Coherence Tomography Angiographic Imaging of Choroidal Neovascularization. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2017**, *58*, 1499–1505. [[CrossRef](#)]
50. Del Castillo, M.O.; Cordon, B.; Sánchez Morla, E.M.; Vilades, E.; Rodrigo, M.J.; Cavaliere, C.; Boquete, L.; Garcia-Martin, E. Identification of clusters in multifocal electrophysiology recordings to maximize discriminant capacity (patients vs. control subjects). *Doc. Ophthalmol.* **2019**. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

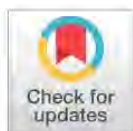
RESEARCH ARTICLE

# Diagnostic ability of multifocal electroretinogram in early multiple sclerosis using a new signal analysis method

L. Boquete<sup>1,2</sup>, E. López-Guillén<sup>1</sup>, E. Vilades<sup>2,3,4</sup>, J. M. Miguel-Jiménez<sup>1</sup>, L. E. Pablo<sup>3,4</sup>, L. De Santiago<sup>1</sup>, M. Ortiz del Castillo<sup>1</sup>, M. C. Alonso-Rodríguez<sup>5</sup>, E. M. Sánchez Morla<sup>6</sup>, A. López-Dorado<sup>1</sup>, E. García-Martin<sup>2,3,4\*</sup>

**1** Biomedical Engineering Group, Electronics Department, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, Spain, **2** RETICS: Thematic Networks for Co-operative Research in Health for Ocular Diseases, Madrid, Spain, **3** Ophthalmology Department, Miguel Servet University Hospital, Zaragoza, Spain, **4** Aragon Institute for Health Research (IIS Aragon), Innovative and Research Group Miguel Servet Ophthalmology (GIMSO), University of Zaragoza, Zaragoza, Spain, **5** Physics and Mathematics Department, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, Spain, **6** Institute for Health Research 12 de Octubre Hospital (i+12), Madrid, Spain

\* [egmvivax@yahoo.com](mailto:egmvivax@yahoo.com)



**OPEN ACCESS**

**Citation:** Boquete L, López-Guillén E, Vilades E, Miguel-Jiménez JM, Pablo LE, De Santiago L, et al. (2019) Diagnostic ability of multifocal electroretinogram in early multiple sclerosis using a new signal analysis method. PLoS ONE 14(11): e0224500. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224500>

**Editor:** William H. Merigan, Jr., University of Rochester Medical Center, UNITED STATES

**Received:** May 15, 2019

**Accepted:** October 15, 2019

**Published:** November 8, 2019

**Copyright:** © 2019 Boquete et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by the Carlos III Health Institute [grant number PI17/01726, "Neuro-ophthalmological evaluation as a biomarker of diagnosis, monitoring and prognosis in multiple sclerosis", to EGM]; Secretary of State for Research, Development and Innovation [grant number DPI2017-88438-R (AEI/FEDER, UE) to LB]

## Abstract

### Purpose

To determine if a novel analysis method will increase the diagnostic value of the multifocal electroretinogram (mfERG) in diagnosing early-stage multiple sclerosis (MS).

### Methods

We studied the mfERG signals of OD (Oculus Dexter) eyes of fifteen patients diagnosed with early-stage MS (in all cases < 12 months) and without a history of optic neuritis (ON) (F: M = 11:4), and those of six controls (F:M = 3:3). We obtained values of amplitude and latency of N1 and P1 waves, and a method to assess normalized root-mean-square error ( $F_{NRMSE}$ ) between model signals and mfERG recordings was used. Responses of each eye were analysed at a global level, and by rings, quadrants and hemispheres. AUC (area under the ROC curve) is used as discriminant factor.

### Results

The standard method of analysis obtains further discrimination between controls and MS in ring R3 (AUC = 0.82), analysing N1 waves amplitudes. In all of the retina analysis regions,  $F_{NRMSE}$  value shows a greater discriminating power than the standard method. The highest AUC value (AUC = 0.91) was in the superior temporal quadrant.

### Conclusion

By analysing mfERG recordings and contrasting them with those of healthy controls it is possible to detect early-stage MS in patients without a previous history of ON.

and RETICS Oftared, RD16/0008/020 to LB and RD16/0008/029 to EGM. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Introduction

The multifocal electroretinogram (mfERG) technique obtains objective and qualitative measurements regarding the functioning of the retina excited with different types of visual stimuli, and was developed for the simultaneous detection of the electrical activity from specific sectors of the retina [1]. A major advantage of the mfERG technique is that it reveals bipolar cell functionality (mainly) and photoreceptor contribution, as well as the spatial distribution of the aforementioned sensitivity [2].

In the mfERG recordings, the retina is divided into a defined number of sectors with hexagonal shape (61 or 103). In the ISCEV standard stimulus array is scaled to elicit comparable response amplitudes from each stimulus sector, resulting in larger hexagons with increasing eccentricity [3]. Visual stimulation between black and white in each hexagon is regulated by a pseudo-randomized sequence (m-sequence) [4]. It is possible to obtain an individualized response in each sector through the correlation between the continuous signal registered in the electrodes and the m-sequence.

The standard stimulus of the mfERG provides the first-order kernel (FOK), a response to a dark-to-light or light-to-dark stimulus. The response in the FOK comes from the receptor cells and the “on” or “off” bipolar cells in each hexagon [1].

In past studies, the diagnostic measurements most commonly taken in mfERG recordings were the amplitudes and latencies of N1 and P1 waves [5]. It is possible to form groups (Fig 1) of answers from the trace arrays of the full visual field (SUM), rings (R1...R5), quadrants (ST: superior temporal, IT: inferior temporal, IN: inferior nasal, SN: superior nasal) and hemiretinal areas: SH (superior hemifield = ST+SN), IH (inferior hemifield = IT+IN), TH (temporal hemifield = ST+IT) and NH (nasal hemifield = IN+SN).

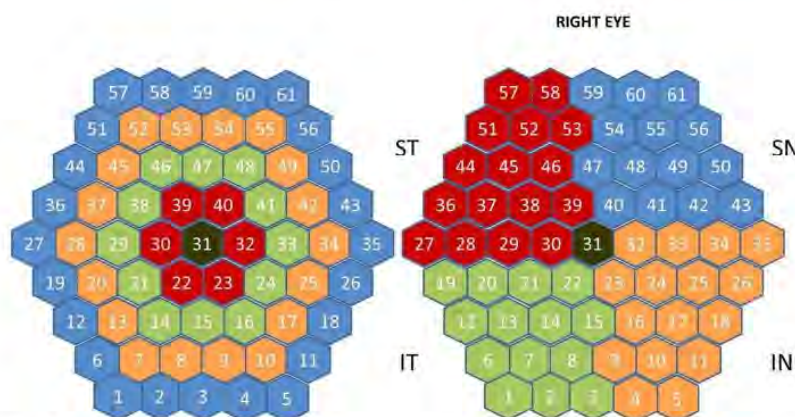
Multiple sclerosis (MS) is a neurodegenerative disease characterized by chronic demyelination of the central nervous system and which, as it develops, severely compromises patients' quality of life. There is no single biomarker which is valid for diagnosis of MS; several are used instead, including clinical diagnosis, magnetic resonance imaging (MRI), cerebrospinal fluid data and evoked potentials. MRI can be considered the most important tool to diagnose and monitor multiple sclerosis [6]. However, the last review of the McDonald criteria [7] highlighted the need to perform further research into optic nerve involvement, validation in diverse populations and incorporation of advanced imaging and neurophysiological and body fluid markers. Evoked potentials are more closely related to clinical disability than structural data [8], making it possible to anticipate clinical deterioration based on the high correlation observed with the Expanded Disability Status Scale [9], even in progressive forms of MS [10].

The aim of this study is to analyse the ability of mfERGs to diagnose MS at an early stage of the disease. Two methods of analysis were investigated; the first one based on standard measures of amplitudes and latencies of N1 and P1 waves; the second method consists of building a signal model from subject control recordings and comparing these under assessment with this model.

## Methods

The study procedures were performed in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki, and the study protocol was approved by the local ethics committees [Clinical Research Ethic Committee of Aragon (CEICA, Zaragoza, Spain)]. Written informed consent to participate in the study was obtained from all subjects.

Recordings were acquired in the Ophthalmology Service of the University Hospital Miguel Servet (Zaragoza, Spain). mfERG signals of both eyes in 15 subjects (F:M = 11:4) with early diagnosis (inferior to 12 months) without previous history in optic neuritis and 6 healthy



**Fig 1. Stimulated visual field.** In this figure the hexagons are not scaled with retinal eccentricity. (a) Definition of the rings (R1, . . . R5). (b) Definition for OD of the quadrants: ST, IT, SN, IN.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224500.g001>

controls (F:M = 3:3) were used. The mean age (SD) was 44.47 (8.24) years for the patients and 35.75 (10.57) years for the controls. There was no significant difference between the two groups with respect to age.

MS was diagnosed based on the 2010 revision of the McDonald Criteria [11] confirmed by a neurologist specializing in MS. Patients with a visual acuity of less than 20/32 on the Snellen scale or 0.2 on the ETDRS scale, intraocular pressure > 20 mmHg, and/or active MS flare (of any neurologic deficit) in the 3 months preceding their enrolment into the study or at any of the annual visits were excluded from the study. Active MS flare was considered a reason for exclusion because acute axonal loss could mask neuronal damage secondary to MS progression (i.e., chronic neurodegeneration), which was the main purpose of this study.

The participants had no concomitant ocular diseases, nor any previous history of retinal pathology, glaucoma, amblyopia or significant refractive errors (more than 5 dioptres of spherical equivalent refraction or 3 dioptres of astigmatism), or systemic conditions that could affect the visual system.

A complete neuro-ophthalmic examination, including assessment of best-corrected visual acuity using the Snellen and ETDRS charts, contrast sensitivity with CSV1000 test, colour vision with Ishihara, pupillary reflexes, ocular motility; examinations of the anterior segment, intraocular pressure (IOP) with the Goldmann applanation tonometer, and papillary morphology by funduscopic exam was performed in all subjects in order to detect any ocular alteration (such as primary open angle glaucoma, cataract, corneal pathology) that may affect functional vision or mfERG results.

The first order mfERG kernel was obtained according to the ISCEV standard [5] using a Roland Retiscan system. The stimulus configuration used was the 61 hexagon array (Fig 1) scaled with eccentricity (the area of the hexagons increases towards periphery to compensate for lower cone density).

A monocular recording of both eyes was carried out randomly, selecting in first place OD (Oculus Dexter) or OS (Oculus Sinister) in each subject. To improve fixation stability, sessions were broken into 47-s segments and 8 trials were recorded in total. The frame rate was 59.81 Hz, the amplifier gain  $10^4$  and bandwidth 10–200 Hz. The signals have been digitized with a sampling rate of 1017 samples/sg, being 84 the number of samples in each recording (length 82.61 ms).

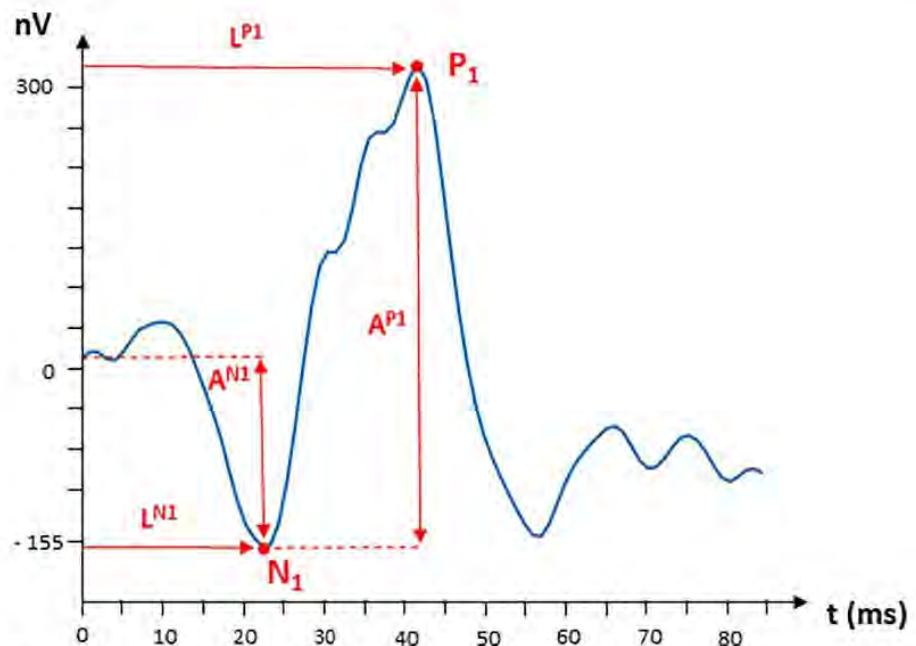


Fig 2. Waveform of first order kernel multifocal electroretinogram (mfERG) response (nV); SUM aggregation of a control subject. Definition of the measurements of the parameters of waves N1 and P1.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224500.g002>

The mfERG recordings from OD eyes were used. Individual mfERG responses for the 61 hexagons were grouped all together (whole field: SUM), into five concentric rings centred on the fovea for analysis: R1 (0–1.75°, 16 degrees<sup>2</sup>, 1 hexagon), R2 (6.25°, 23 degrees<sup>2</sup>, 6 hexagons, perifoveal ring), R3 (11.5°, 36 degrees<sup>2</sup>, 12 hexagons), R4 (17.85°, 51 degrees<sup>2</sup>, 18 hexagons) and R5 (25.3°, 69 degrees<sup>2</sup>, 24 hexagons) (Fig 1A), in four quadrants (ST, IT, IN, SN) and in the nasal (NH), temporal (TH), superior (SH) and inferior (IH) hemifields (Fig 1B).

### Recordings' analysis

In this study, two methods of analysis of the mfERG recordings are compared: a) standard method based on the amplitudes and latencies of N1 and P1 waves' measuring, and b) method of averaging of the controls database.

### Standard method

Using functions we developed in Matlab, the amplitudes ( $A^{N1}$ ,  $A^{P1}$ ) and latencies of waves N1 and P1 ( $L^{N1}$ ,  $L^{P1}$ ) are calculated according to Hood et al. [5]. The location of N1 corresponds to the minimum recording inside the temporal window of 9 to 32 ms and P1 location is the maximum in the interval: ( $\max\{19, L^{N1}\}$  to 50) ms. The definition of the parameters is shown in Fig 2.

### Control recording averaging

The signals from OD eyes of 6 control subjects ( $x_1, \dots, x_M = 6$ ) have been used to obtain a model signal of each mfERG averaging signal: sum, rings, quadrants and hemifields. The model signal



$y_M(k)$  is built averaging  $M = 6$  signals in the temporal domain.

$$y_M(k) = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M x_i(k) \quad (k = 1 \dots 84)$$

A model signal is obtained for each grouping under assessment:  $y_M^{SUM}(k)$ ,  $y_M^{R1}(k)$ ,  $\dots$ ,  $y_M^{R5}(k)$ ,  $y_M^{ST}(k)$ ,  $\dots$ ,  $y_M^{SN}(k)$ ,  $y_M^{SH}(k)$ ,  $\dots$ ,  $y_M^{NH}(k)$ . In Fig 3 the averaging signals for the following groupings are shown: R5 and ST.

In order to characterize a signal in a defined group, it is compared to the model signal of that region using a standardized root-mean-square error ( $F_{NRMSE}$ ):

$$F_{NRMSE} = 100 \left( 1 - \frac{\|y_M - y\|}{\|y_M - \text{mean}(y_M)\|} \right)$$

where  $y_M$  is the averaging signal and  $y$  the one whose evaluation is required. In case the fitting is perfect,  $F_{NRMSE} = 100$ .

### Statistical analysis

All statistical analyses were performed using the SPSS 25.0 software (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA) and STATGRAPHICS Centurion XVII. The results were expressed as the mean and the standard deviation. A p value below 0.05 was considered statistically significant.

The normality of the results was assessed using the Shapiro-Wilk (W) test. The differences between groups were evaluated using the independent t-test in normal distributions or the U-Mann-Whitney (Wilcoxon) test in non-normal distributions. The differences between methods were evaluated using the dependent t-test in normal distributions (paired-samples t-test).

## Results

### Standard method

In Fig 4 mfERG signals (in amplitude units: nV) of a healthy control and a patient with MS are shown.

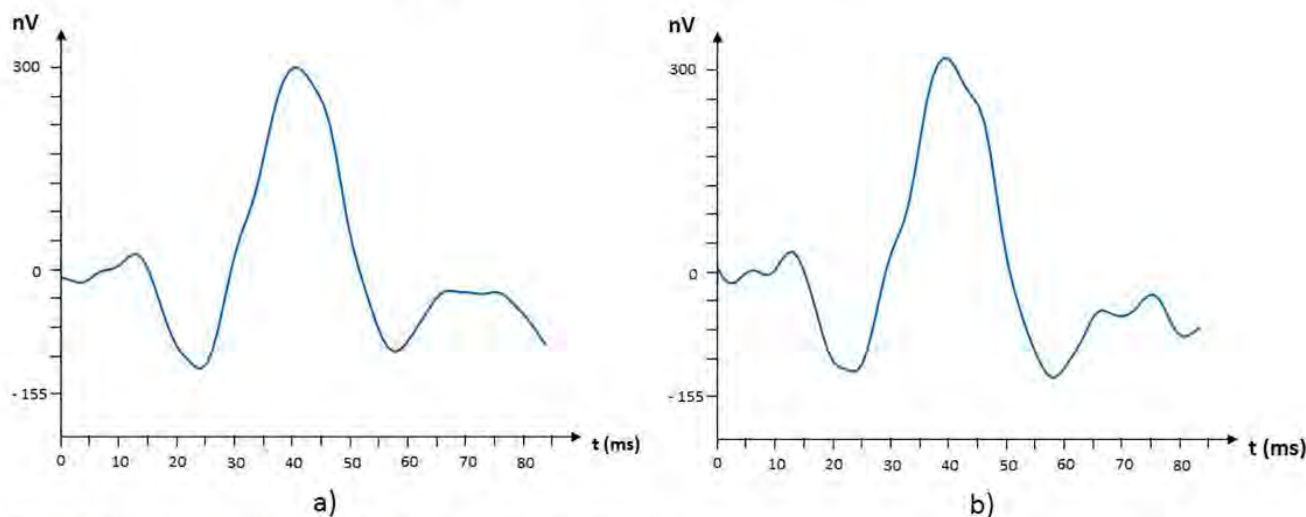
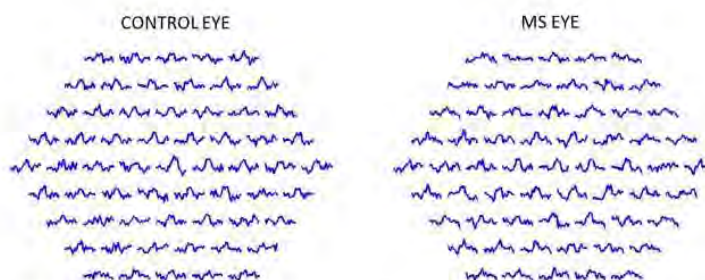


Fig 3. Model signals corresponding to the following regions: (a) R5 and (b) ST quadrant.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224500.g003>



**Fig 4.** Multifocal electroretinogram (mfERG) first order kernel (nV) trace array obtained from a control subject (a) and a multiple sclerosis (MS) patient (b).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224500.g004>

The mean values of amplitude and latency of N1 and P1 peaks obtained for each database are shown in Table 1 (standard method).

The four parameters  $A^{N1}$ ,  $L^{N1}$ ,  $A^{P1}$  and  $L^{P1}$  present a Pearson correlation positive and significant ( $p < 0.05$ ) among themselves, being the highest correlation  $r = 0.867$  between  $A^{N1}$  and  $A^{P1}$ , and therefore being the behaviour in both amplitudes very similar, as it is shown in (Fig 5A and 5B). In the ring analysis, amplitudes  $A^{N1}$  and  $A^{P1}$  have a maximum value in R1 (fovea) and progressively decrease to the exterior (parafovea, perifovea) due to the existence of a maximum concentration of cones in the fovea that decreases towards the periphery [12]. Only amplitude N1 significantly discriminated between controls and MS patients (U Mann-Whitney test) in Ring3 ( $p = 0.023$ ) and IN ( $p = 0.036$ ).

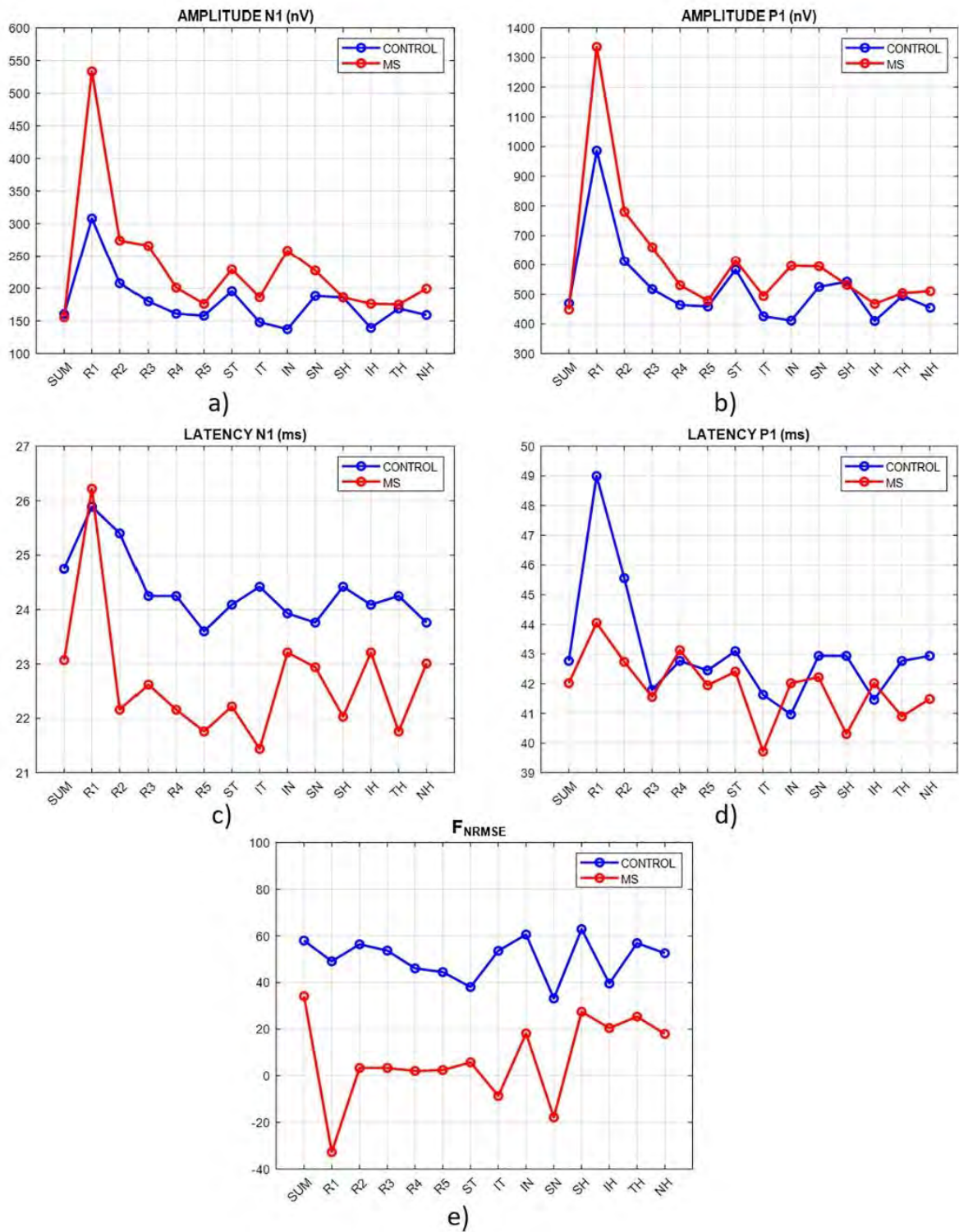
There is no significant difference in any analysis regions between controls and MS in the N1 latency (U Mann-Whitney,  $p > 0.095$ ) and P1 amplitude (U Mann-Whitney,  $p > 0.132$ ) parameters.

**Table 1.** Mean and standard deviation (SD) values of amplitudes and latencies in controls (C) and multiple sclerosis (MS) patients.

Region	$A^{N1}$ (nV)		$L^{N1}$ (ms)		$A^{P1}$ (nV)		$L^{P1}$ (ms)	
	C	MS	C	MS	C	MS	C	MS
SUM	160.41(53.87)	155.44(82.84)	24.75(0.74)	23.07(3.52)	469.09(134.02)	448.30(199.04)	42.77(2.13)	42.02(3.40)
R1	308.17(79.95)	533.49(456.84)	25.89(4.60)	26.22(4.18)	986.50(196.80)	1336.15(757.21)	49.00(0.40)	44.05(7.85)
R2	207.73(59.18)	274.29(130.37)	25.40(2.60)	22.16(4.94)	612.22(139.13)	780.36(264.38)	45.56(1.72)	42.74(3.86)
R3	179.97(45.95)	266.06(96.70)	24.25(1.48)	22.62(3.83)	517.28(101.32)	660.74(242.30)	41.79(2.55)	41.56(4.31)
R4	161.17(58.22)	201.03(92.54)	24.25(1.02)	22.16(3.42)	464.08(150.25)	530.63(199.18)	42.77(2.13)	43.13(2.65)
R5	158.06(63.45)	176.27(90.63)	23.60(2.06)	21.76(5.90)	458.38(131.61)	478.24(167.64)	42.45(2.28)	41.95(4.10)
ST	195.55(41.52)	228.98(200.02)	24.09(1.36)	22.22(3.73)	583.38(83.32)	613.89(341.15)	43.10(1.80)	42.41(3.40)
IT	148.12(67.56)	186.46(95.40)	24.42(1.80)	21.44(5.90)	425.81(161.75)	493.95(177.68)	41.63(3.15)	39.72(5.17)
IN	137.41(66.43)	258.50(136.53)	23.93(2.12)	23.21(4.28)	411.36(174.57)	596.14(249.49)	40.97(3.66)	42.02(3.25)
SN	188.45(70.19)	227.41(88.25)	23.76(1.15)	22.94(4.80)	524.81(137.57)	594.56(161.51)	42.94(1.72)	42.22(5.56)
SH	186.06(56.03)	186.20(73.51)	24.42(0.74)	22.03(3.95)	542.37(115.97)	531.38(181.87)	42.94(1.61)	40.31(6.74)
IH	139.34(62.06)	176.39(73.96)	24.09(1.73)	23.21(3.71)	409.97(160.61)	467.64(171.50)	41.46(3.20)	42.02(3.61)
TH	169.01(45.16)	175.22(71.61)	24.25(1.48)	21.76(4.89)	494.17(109.44)	503.73(180.31)	42.77(2.13)	40.90(4.53)
NH	159.17(64.36)	199.50(79.04)	23.76(1.15)	23.01(3.77)	454.31(152.16)	510.18(178.36)	42.94(1.93)	41.49(5.40)

$A^{N1}$ : amplitude of wave N1;  $L^{N1}$ : latency of wave N1;  $A^{P1}$ : amplitude of wave P1;  $L^{P1}$ : latency of wave P1; C: controls; MS: patients; SUM: whole field; R1...R5: Ring 1...Ring 5; ST: superior temporal quadrant; IT: inferior temporal quadrant; IN: inferior nasal quadrant; SN: superior nasal quadrant; SH: superior hemifield; IH: inferior hemifield; TH: temporal hemifield; NH: nasal hemifield.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224500.t001>



**Fig 5. Principal results of the multifocal electroretinogram (mfERG) analysis.**

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224500.g005>

The latency of wave P1 only presents significant differences between controls and MS in Ring1 (U Mann-Whitney,  $p = 0.018$ ) (Fig 5C and 5D).  $L^{P1}$  presents a value significantly superior in the fovea, progressively decreasing to the parafovea and the perifovea in both MS and controls.

Table 2 shows  $F_{NRMSE}$  values in controls and MS patients. To obtain  $F_{NRMSE}$  values in the 6 control eyes, the averaging signal has been built by means of cross-validation in 6 folds (leave-one-out cross-validation:  $M = 5$ , the analysed signal is not used to construct the model). To obtain the  $F_{NRMSE}$  values of MS patients, the averaging signal has been implemented with all the eyes of controls ( $M = 6$ ).

$F_{NRMSE}$  values in controls exceed significantly (t-student independent samples test,  $p < 0.0001$ ) (Fig 5E) the values obtained from MS signals, since the model signal is built from control signals.  $F_{NRMSE}$  presents a significant negative correlation with both amplitudes and latency of P1 wave.  $F_{NRMSE}$  regional behaviour can be seen in Fig 5E.

The capacity of discrimination between controls and MS for the standard analysis method and the averaging method is shown in Table 3.

In the study of amplitudes and latencies (standard method) and considering the average value in every possible region as criteria for comparability, the most discriminant parameter is the amplitude of N1 wave ( $mean(AUC_{R1}^{N1}) = 0.62$ ). The visual field region analysed with greater AUC value in mean value is R2 ( $mean(AUC_{R2}) = 0.71$ ). As best option using the standard method, the maximum capacity of discrimination could be obtained just analysing the N1 amplitude in R3: ( $AUC_{R3}^{N1} = 0.82$ ).

$F_{NRMSE}$  value synthesizes in just one parameter the comparison of the shapes of the wave, against the 4 parameters used in the traditional method. In the study of the different regions, in all cases the AUC value with  $F_{NRMSE}$  parameter exceeds or evens (IN region) the mean value in the standard method.

**Table 2. Mean and standard deviation (SD) of normalized root-mean-square error function ( $F_{NRMSE}$ ) in controls and multiple sclerosis (MS) patients.**

Region	Controls	MS	p value
SUM	58.0(16.9)	34.2(28.4)	0.086
R1	49.1(9.5)	-32.7(122.3)	0.014
R2	56.4(13.1)	3.4(70.6)	0.010
R3	53.7(12.5)	3.4(69.4)	0.018
R4	46.1(21.1)	2.1(59.5)	0.035
R5	44.5(14.9)	2.5(50.7)	0.036
IN	38.1(27.0)	5.8(56.5)	0.127
SN	53.6(16.9)	-8.6(91.9)	0.025
ST	60.6(12.2)	18.2(54.8)	0.013
IT	33.2(19.3)	-17.8(75.9)	0.097
SH	62.9(13.6)	27.5(35.3)	0.036
IH	39.6(22.8)	20.5(36.5)	0.087
TH	56.9(13.5)	25.4(31.5)	0.126
NH	52.6(21.5)	18.0(51.0)	0.045

SUM: whole field; R1, ..., R5: Ring 1, ..., Ring 5; ST: superior temporal quadrant; IT: inferior temporal quadrant; IN: inferior nasal quadrant; SN: superior nasal quadrant; SH: superior hemifield; IH: inferior hemifield; TH: temporal hemifield; NH: nasal hemifield.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224500.t002>

**Table 3.** Measurements of area under ROC (receiver operating characteristic curve) (AUC) using standard method and normalized root-mean-square error function ( $F_{NRMSE}$ ) to discriminate between multiple sclerosis patients and controls.

Region	AUC values					
	Parameters				Methods	
	$A^{N1}$	$L^{N1}$	$A^{P1}$	$L^{P1}$	Mean by region (standard method)	$F_{NRMSE}$
SUM	0.50	0.65	0.57	0.53	0.56	0.76
R1	0.54	0.51	0.64	0.83	0.63	0.69
R2	0.67	0.68	0.74	0.73	0.71	0.78
R3	0.82	0.64	0.71	0.53	0.68	0.80
R4	0.64	0.72	0.61	0.56	0.63	0.76
R5	0.54	0.54	0.56	0.53	0.54	0.81
IN	0.80	0.54	0.71	0.61	0.67	0.67
SN	0.66	0.55	0.59	0.56	0.59	0.80
ST	0.52	0.58	0.54	0.52	0.54	0.91
IT	0.61	0.61	0.60	0.60	0.61	0.74
SH	0.53	0.70	0.51	0.54	0.57	0.84
IH	0.64	0.53	0.58	0.59	0.58	0.67
TH	0.69	0.54	0.59	0.53	0.59	0.81
NH	0.56	0.62	0.51	0.59	0.57	0.71
Mean by parameter	0.62	0.60	0.60	0.59	0.60	0.76

$A^{N1}$ : amplitude of wave N1;  $L^{N1}$ : latency of wave N1;  $A^{P1}$ : amplitude of wave P1;  $L^{P1}$ : latency of wave P1; SUM: whole field; R1, . . . R5: Ring 1, . . . Ring 5; ST: superior temporal quadrant; IT: inferior temporal quadrant; IN: inferior nasal quadrant; SN: superior nasal quadrant; SH: superior hemifield; IH: inferior hemifield; TH: temporal hemifield; NH: nasal hemifield.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224500.t003>

The mean value of AUC values using  $F_{NRMSE}$  parameter is 0.76 ( $\text{mean}(AUC^{F_{NRMSE}}) = 0.76$ ) in comparison with the average value obtained with the standard method:  $\text{mean}(AUC^{STANDARD}) = 0.60$ . The greatest discriminant value is obtained in the ST quadrant analysis ( $AUC_{ST}^{F_{NRMSE}} = 0.91$ ) and the SH hemisphere ( $AUC_{SH}^{F_{NRMSE}} = 0.84$ ).

### Discussion

In this study, the differences in mfERG signals in control subjects and MS patients have been analysed using the standard method of measure for amplitudes and latencies of N1 and P1 waves, as well as a method based on the comparison of recordings with a reference template obtained from control signals.

There are few previous studies which analyse mfERG signals in patients with MS, and due to its heterogeneity (different types of patients, acquisition systems and analysis of recordings, reduced databases, etc.) the results are contradictory. On the other hand, in our study the most innovative and ambitious aspect is the use of patients with an early diagnosis (less than 6 months from their first symptom) and with no symptoms of visual acuity loss nor optic neuritis, since our aim was to assess the effects of the disease themselves and the existence of axonal degeneration and the affectation of the nerve impulse conduction in the visual canal since the beginning of the pathology. For this reason, we avoided patients with previous optic neuritis, in order to avoid biases including eyes in which inflammation of the optic nerve or visual atrophy can affect the nervous conduction of the visual channel significantly.

Gundogan et al [13] reported that there was no significant difference in P1 and N1 amplitude and implicit times in different rings, between patients with MS (without a history of optic neuritis) and control subjects. Nevertheless, in Saidha et al [14] it is valued that all waves of the

first-order kernel showed normal latencies in all MS patients but a reduction of P1 amplitude is detected in 5 of 7 patients with predominant macular thinning. In Neroev et al [15] the use of the wave P1 latency in the parafovea as a marker of MS progression is suggested. Recently Hanson et al [16] observed that in a typical MS cohort, latency of wave P1 increases (in ring 2) whereas there is no difference observed in amplitudes.

In the present study, it can be observed that on average the most discriminant parameter to detect signals from MS patients is the amplitude of the N1 wave ( $mean(AUC^{A_{N1}}) = 0.62$ ). The most valuable region of the visual field for discriminating between controls and MS patients is ring R2 ( $mean(AUC_{R2}) = 0.71$ ). As a general idea, in the standard method the capacity of discrimination is low (AUCs always below 0.71).

In the second part of our study, the use of an averaging method is proposed to generate a signal template of controls which can be used to verify the degree of fitting, evaluated by means of mean squared error.  $F_{NRMSSE}$  in controls is superior to MS patients ( $p < 0.0001$ ). With this new method, we observe that AUC between healthy controls and MS patients increases in most regions of the retina analysis (except in region IN). An advantage of the  $F_{NRMSSE}$  parameter is that this one models the mfERG signal form through a characteristic that defines the global wave form of the acquired signals, in comparison with the control subject signals.

With the obtained results of the averaging parameter  $F_{NRMSSE}$ , we have observed that the greatest discriminating power is produced in the ST region ( $AUC_{ST}^{F_{NRMSSE}} = 0.91$ ), improving results obtained in the analysis of amplitudes and latencies. Previous studies carried out with OCT also point to temporal sectors as the ones which present an early affectation at early stages of the disease [17].

Our population was composed of patients with early-stage MS, so markedly delayed transmission of nerve stimulation was not yet apparent. We also detected more subclinical alterations in mfERG amplitudes than in mfERG latencies. Probably, when MS progresses in our population or MS outbreaks causes myelin loss, we will detect more alterations in mfERG latencies.

In our patients, we found affectation in the superior temporal quadrant. This concurs with the findings of previous authors who demonstrated early damage in the temporal RNFL quadrant using OCT [18]. This temporal quadrant corresponds topographically to the papillomacular bundle and is formed by the superior temporal and inferior temporal sectors. Early neurodegeneration of the RNFL usually begins in the thickest superior temporal sector. This occurs not only in MS [19] but also in other neurodegenerative processes such as glaucoma [20,21], Parkinson's disease [22] and Alzheimer's disease [23].

In conclusion, the correct analysis of mfERG recordings can be an effective biomarker for diagnosis of MS in subjects at early diagnosis and without previous history of optic neuritis, which helps to accelerate the diagnosis and to apply the treatment from the early stages of the pathology, avoiding the reduction of patients' quality of life and the appearance of new flare-ups.

The main limitation of our study is the small size of our database. In spite of this, we found significant differences between control subjects and patients, suggesting that the diagnostic capacity of the method may increase with sample size. Another limitation is that follow-up of these patients and controls was not carried out. To avoid bias derived from differences between databases, these should be extended to include subjects from other centres and signals recorded using other commercially available equipment. In addition, this study must be extended to other types of MS because so far just the Relapsing Remitting type has been studied.

## Supporting information

**S1 Dataset. Minimal Dataset (Minimal data set).**  
(XLSX)

## Author Contributions

**Conceptualization:** L. Boquete, E. Garcia-Martin.

**Data curation:** E. López-Guillén, L. De Santiago, M. C. Alonso-Rodríguez, E. M. Sánchez Morla, E. Garcia-Martin.

**Formal analysis:** L. Boquete, J. M. Miguel-Jiménez, M. Ortiz del Castillo, E. M. Sánchez Morla, A. López-Dorado, E. Garcia-Martin.

**Funding acquisition:** L. Boquete, M. C. Alonso-Rodríguez, A. López-Dorado, E. Garcia-Martin.

**Investigation:** E. López-Guillén, E. Vilades, L. De Santiago, M. Ortiz del Castillo, M. C. Alonso-Rodríguez.

**Methodology:** L. Boquete, E. Vilades, J. M. Miguel-Jiménez, L. De Santiago, M. Ortiz del Castillo, M. C. Alonso-Rodríguez, E. Garcia-Martin.

**Project administration:** L. Boquete, E. Garcia-Martin.

**Resources:** L. E. Pablo.

**Software:** E. Vilades, J. M. Miguel-Jiménez, E. M. Sánchez Morla, A. López-Dorado.

**Supervision:** L. E. Pablo, E. Garcia-Martin.

**Validation:** E. López-Guillén.

**Writing – original draft:** L. Boquete, E. López-Guillén, E. Vilades, E. Garcia-Martin.

**Writing – review & editing:** L. Boquete, E. López-Guillén, E. Vilades, J. M. Miguel-Jiménez, L. E. Pablo, L. De Santiago, M. Ortiz del Castillo, M. C. Alonso-Rodríguez, E. M. Sánchez Morla, A. López-Dorado, E. Garcia-Martin.

## References

1. Lai TYY, Chan W-M, Lai RYK, Ngai JWS, Li H, Lam DSC. The Clinical Applications of Multifocal Electroretinography: A Systematic Review. *Surv Ophthalmol.* 2007; 52: 61–96. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2006.10.005> PMID: 17212991
2. Chan HH-L, Ng Y, Chu PH. Applications of the multifocal electroretinogram in the detection of glaucoma. *Clin Exp Optom.* 2011; 94: 247–58. <https://doi.org/10.1111/j.1444-0938.2010.00571.x> PMID: 21323730
3. Robson AG, Nilsson J, Li S, Jalali S, Fulton AB, Tomene AP, et al. ISCEV guide to visual electrodiagnostic procedures. *Doc Ophthalmol.* 2018; 136: 1–26. <https://doi.org/10.1007/s10633-017-9621-y>
4. Müller PL, Meigen T. M-sequences in ophthalmic electrophysiology. *J Vis.* 2016; 16: 15. <https://doi.org/10.1167/16.1.15>
5. Hood DC, Bach M, Brigell M, Keating D, Kondo M, Lyons JS, et al. ISCEV standard for clinical multifocal electroretinography (mfERG) (2011 edition). *Doc Ophthalmol.* 2012; 124: 1–13. <https://doi.org/10.1007/s10633-011-9296-8>
6. Kaunzner UW, Gauthier SA. MRI in the assessment and monitoring of multiple sclerosis: an update on best practice. *Ther Adv Neurol Disord.* 2017; 10: 247–261. <https://doi.org/10.1177/1756285617708911> PMID: 28607577
7. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 2018; 17: 162–173. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30470-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30470-2) PMID: 29275977

8. Hardmeier M, Leocani L, Fuhr P. A new role for evoked potentials in MS? Repurposing evoked potentials as biomarkers for clinical trials in MS. *Mult Scler J*. 2017; 23: 1309–1319. <https://doi.org/10.1177/1352458517707265>
9. Giffroy X, Maes N, Albert A, Maquet P, Crielaard J-M, Dive D. Multimodal evoked potentials for functional quantification and prognosis in multiple sclerosis. *BMC Neurol*. 2016; 16: 83. <https://doi.org/10.1186/s12883-016-0608-1> PMID: 27245221
10. Canham LJW, Kane N, Oware A, Walsh P, Blake K, Inglis K, et al. Multimodal neurophysiological evaluation of primary progressive multiple sclerosis—An increasingly valid biomarker, with limits. *Mult Scler Relat Disord*. 2015; 4: 607–613. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2015.07.009> PMID: 26590670
11. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 2011; 69: 292–302. <https://doi.org/10.1002/ana.22366> PMID: 21367374
12. Kretschmann U, Seeliger M, Ruether K, Usui T, Zrenner E. Spatial cone activity distribution in diseases of the posterior pole determined by multifocal electroretinography. *Vision Res*. 1998; 38: 3817–3828. [https://doi.org/10.1016/S0042-6989\(98\)00071-6](https://doi.org/10.1016/S0042-6989(98)00071-6) PMID: 9893810
13. Gundogan FC, Demirkaya S, Sobaci G. Is Optical Coherence Tomography Really a New Biomarker Candidate in Multiple Sclerosis?—A Structural and Functional Evaluation. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2007; 48: 5773. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-0834>
14. Saidha S, Syc SB, Ibrahim MA, Eckstein C, Warner C V., Farrell SK, et al. Primary retinal pathology in multiple sclerosis as detected by optical coherence tomography. *Brain*. 2011; 134: 518–533. <https://doi.org/10.1093/brain/awq346> PMID: 21252110
15. Neroev V V., Eliseeva EK, Zueva M V., Lysenko VS, Zakharova MN, Tsapenko I V., et al. Demyelinating optic neuritis: Optical coherence tomography and multifocal electroretinography data correlation. *Hum Physiol*. 2016; 42: 879–884. <https://doi.org/10.1134/S0362119716080090>
16. Hanson JVM, Hediger M, Manogaran P, Landau K, Hagenbuch N, Schippling S, et al. Outer Retinal Dysfunction in the Absence of Structural Abnormalities in Multiple Sclerosis. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2018; 59: 549. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-22821>
17. Garcia-Martin E, Pueyo V, Almarcegui C, Martin J, Ara JR, Sancho E, et al. Risk factors for progressive axonal degeneration of the retinal nerve fibre layer in multiple sclerosis patients. *Br J Ophthalmol*. 2011; 95: 1577–82. <https://doi.org/10.1136/bjo.2010.199232> PMID: 21785155
18. Garcia-Martin E, Ara JR, Martin J, Almarcegui C, Dolz I, Vilades E, et al. Retinal and Optic Nerve Degeneration in Patients with Multiple Sclerosis Followed up for 5 Years. *Ophthalmology*. 2017; 124: 688–696. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2017.01.005> PMID: 28187977
19. Garcia-Martin E, Pablo LE, Herrero R, Satue M, Polo V, Larrosa JM, et al. Diagnostic Ability of a Linear Discriminant Function for Spectral-Domain Optical Coherence Tomography in Patients with Multiple Sclerosis. *Ophthalmology*. 2012; 119: 1705–1711. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2012.01.046> PMID: 22480742
20. Brusini P. OCT Glaucoma Staging System: a new method for retinal nerve fiber layer damage classification using spectral-domain OCT. *Eye*. 2018; 32: 113–119. <https://doi.org/10.1038/eye.2017.159> PMID: 28776589
21. Mousa MF, Cubbidge RP, Al-Mansouri F, Bener A. Evaluation of hemifield sector analysis protocol in multifocal visual evoked potential objective perimetry for the diagnosis and early detection of glaucomatous field defects. *Korean J Ophthalmol*. 2014; 28: 49–65. <https://doi.org/10.3341/kjo.2014.28.1.49> PMID: 24511212
22. Satue M, Obis J, Alarcia R, Orduna E, Rodrigo MJ, Vilades E, et al. Retinal and Choroidal Changes in Patients with Parkinson's Disease Detected by Swept-Source Optical Coherence Tomography. *Curr Eye Res*. 2018; 43: 109–115. <https://doi.org/10.1080/02713683.2017.1370116> PMID: 29111842
23. Polo V, Garcia-Martin E, Bambo MP, Pinilla J, Larrosa JM, Satue M, et al. Reliability and validity of Cirrus and Spectralis optical coherence tomography for detecting retinal atrophy in Alzheimer's disease. *Eye*. 2014; 28: 680–690. <https://doi.org/10.1038/eye.2014.51> PMID: 24625377





# Retinal and Optic Nerve Degeneration in Patients with Multiple Sclerosis Followed up for 5 Years

Elena Garcia-Martin, PhD,<sup>1,2</sup> Jose R. Ara, PhD,<sup>2,3</sup> Jesus Martin, PhD,<sup>2,3</sup> Carmen Almarcegui, PhD,<sup>2,4</sup> Isabel Dolz, PhD,<sup>2,4</sup> Elisa Vilades, MD,<sup>1,2</sup> Laura Gil-Arribas, PhD,<sup>1,2</sup> Francisco J. Fernandez, PhD,<sup>1,2</sup> Vicente Polo, PhD,<sup>1,2</sup> Jose M. Larrosa, PhD,<sup>1,2</sup> Luis E. Pablo, PhD,<sup>1,2</sup> Maria Satue, PhD<sup>1,2</sup>

**Purpose:** To quantify retinal nerve fiber layer (RNFL) changes in patients with multiple sclerosis (MS) and healthy controls with a 5-year follow-up and to analyze correlations between disability progression and RNFL degeneration.

**Design:** Observational and longitudinal study.

**Participants:** One hundred patients with relapsing-remitting MS and 50 healthy controls.

**Methods:** All participants underwent a complete ophthalmic and electrophysiologic exploration and were re-evaluated annually for 5 years.

**Main Outcome Measures:** Visual acuity (Snellen chart), color vision (Ishihara pseudoisochromatic plates), visual field examination, optical coherence tomography (OCT), scanning laser polarimetry (SLP), and visual evoked potentials. Expanded Disability Status Scale (EDSS) scores, disease duration, treatments, prior optic neuritis episodes, and quality of life (QOL; based on the 54-item Multiple Sclerosis Quality of Life Scale score).

**Results:** Optical coherence tomography (OCT) revealed changes in all RNFL thicknesses in both groups. In the MS group, changes were detected in average thickness and in the mean deviation using the GDx-VCC nerve fiber analyzer (Laser Diagnostic Technologies, San Diego, CA) and in the P100 latency of visual evoked potentials; no changes were detected in visual acuity, color vision, or visual fields. Optical coherence tomography showed greater differences in the inferior and temporal RNFL thicknesses in both groups. In MS patients only, OCT revealed a moderate correlation between the increase in EDSS and temporal and superior RNFL thinning. Temporal RNFL thinning based on OCT results was correlated moderately with decreased QOL.

**Conclusions:** Multiple sclerosis patients exhibit a progressive axonal loss in the optic nerve fiber layer. Retinal nerve fiber layer thinning based on OCT results is a useful marker for assessing MS progression and correlates with increased disability and reduced QOL. *Ophthalmology* 2017;124:688-696 © 2017 by the American Academy of Ophthalmology.

The main cause of disability in patients with multiple sclerosis (MS) is axonal loss.<sup>1-3</sup> Axonal deterioration in the retinal nerve fiber layer (RNFL) can be detected and quantified using optical coherence tomography (OCT) or scanning laser polarimetry (SLP).<sup>3-8</sup> Typical ophthalmic findings in MS patients are optic nerve atrophy and peripapillary RNFL thinning.<sup>8</sup>

The effects of MS on the central nervous system generally are difficult to examine directly, but the RNFL, which is made up of mainly nonmyelinated retinal ganglion cell axons, provides easy access for clinical examination. The RNFL thickness can be measured to assess axons and axonal damage directly. Even in MS patients without preceding symptoms of optic neuritis show decreases in RNFL thickness.<sup>4-8</sup> Visual evoked potential (VEP) tests also reveal abnormalities in MS patients.<sup>9-11</sup>

Optical coherence tomography has been used to measure RNFL thickness as a biologic marker of axonal damage<sup>12-14</sup> and to monitor disease progression in patients

with MS.<sup>7,8</sup> In fact, some authors suggest that OCT may be an efficient and less expensive substitute for magnetic resonance imaging as a method of monitoring the disease.<sup>15-17</sup> In this study, we compared structural and functional changes in the RNFL in MS patients with those in healthy controls. We further evaluated the correlation of the RNFL changes with disease progression and changes in quality of life (QOL) over 5 years.

## Methods

### Participants

This prospective longitudinal study included patients with definite relapsing-remitting MS and healthy controls with a 5-year follow-up. A total of 204 eyes of 102 patients and 100 eyes of 50 healthy controls were evaluated at baseline and then every year for 5 years. Multiple sclerosis was diagnosed based on the 2010 revision of the McDonald criteria and confirmed by a neurologist specializing in

MS.<sup>18</sup> Patients with a visual acuity less than 0.1 (Snellen scale), intraocular pressure more than 20 mmHg, active MS flare (of any neurologic deficit), or a combination thereof in the 6 months preceding their enrollment into the study or at any of the annual visits were excluded from the study. Active MS flare was considered a reason for exclusion because acute axonal loss could mask neuronal damage secondary to MS progression (i.e., chronic neurodegeneration), which was the main purpose of this study. Patients with refractive errors of more than 5 diopters of spherical equivalent refraction or 3 diopters of astigmatism also were excluded from the study.

### Standard Protocol Approvals, Registrations, and Patient Consents

The study procedures were performed in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki, and the study protocol was approved by the local ethics committees. Written informed consent to participate in the study was obtained from all participants.

### Main Outcome Measures

All participants underwent a complete neuro-ophthalmic examination, including assessment of best-corrected visual acuity using the Snellen chart, pupillary reflexes, and ocular motility; examinations of the anterior segment, intraocular pressure (IOP) with the Goldmann applanation tonometer, and papillary morphologic features by fundoscopic examination; and OCT, SLP, and VEP. Each eye was considered separately. In addition, the Expanded Disability Status Scale (EDSS) score, disease duration, treatments, prior episodes of optic neuritis, and QOL (using the 54-item Multiple Sclerosis Quality of Life Scale [MSQOL-54] score) were evaluated. Every year for 5 years, patients were re-examined and changes in all parameters were recorded. An increase in the EDSS score during the follow-up was considered a sign of disease progression.

Visual acuity was measured with the Snellen chart at a distance of 6 m and best-corrected monocular vision. The papilla morphologic features were assessed with a 78-diopter lens and classified as normal, diffuse, or sectorial atrophy or edema.

Peripapillary RNFL and macular volume measurements were obtained using the Cirrus 3000 HD OCT (Carl Zeiss Meditec, Jena,

Germany). The same experienced operator (E.V.) performed all scans, and no manual correction was applied to the OCT output. An internal fixation target was used to ensure the highest reproducibility, and poor-quality scans were rejected before analysis of the data. For the Cirrus OCT scans, image quality was assessed based on the signal strength measurement, which is a combination of the signal-to-noise ratio and the uniformity of the signal within a scan (scale of 1–10, where 1 is categorized as poor image quality and 10 as excellent image quality). We analyzed only those images with a score of more than 7. The Cirrus OCT optic disc protocol generates 200×200 cube images with 200 lineal scans that enable analysis of a 6-mm<sup>3</sup> area around the optic nerve, and the Cirrus OCT macular cube 512×128 protocol provides macular volume measure. For each scan series, mean RNFL thickness, quadrant RNFL thicknesses (superior, inferior, temporal, and nasal), and macular volume were assessed using Cirrus software version 5.0.

Cirrus segmentation analysis for retinal layers also provides measurements of ganglion cell layer (GCL) thickness (evaluating 6 areas of the macular cube: superior, superonasal, inferonasal, inferior, inferotemporal, and superotemporal sectors) and measurements of the mean and minimum GCL plus inner plexiform layer value of a set of 360 spokes, where each average represents the mean number of the pixels along the spoke that lies within the measurement annulus. The minimum was selected because the thinnest portion of the GCL plus inner plexiform layer in the perifoveal region is considered to indicate the status of the ganglion cells (the most important cells in the visual pathway).

The GDx-VCC (Laser Diagnostic Technologies, San Diego, CA), consisting of a confocal scanning laser ophthalmoscope, was used to determine RNFL thickness by directing polarized light onto the Henle fiber layer and assessing 5 parameters: nerve fiber indicator, temporal–superior–nasal–inferior–temporal (TSNIT) average, superior average, inferior average, and TSNIT standard deviation.

Study investigators recorded VEPs, with electrodes fixed (with collodion) at the midoccipital and midfrontal locations and Cz (Z-center is the equidistant point between both ear points) as ground, using a Neuronix SenseWitness 4.0 device (Neuronix, Zaragoza, Spain) in a dark room and with full-refraction correction if necessary. Monocular stimulation and visual stimuli followed a checkerboard pattern (contrast, 80%; check size, 47 feet; mean luminance, 93 cd/m<sup>2</sup>) and reversed contrast patterns with a

Table 1. Epidemiologic and Neurologic Parameters Obtained at Baseline and 5-Year Examinations in Multiple Sclerosis Patients and in Healthy Controls

	Multiple Sclerosis Patients (n = 100)		Healthy Controls (n = 50), Basal Exploration	P Value
	Basal Exploration	5-Year Exploration		
Age (yrs)	41.12 (11.45)	46.11 (11.40)	41.40 (13.33)	0.145*
Gender (female:male)	68:32	68:32	35:15	0.223*
Intraocular pressure (mmHg)	14.26	14.98	14.77	0.452*
MS disease duration (yrs)	9.26 (6.68)	14.25 (6.67)	—	<0.001 <sup>†</sup>
EDSS score	2.59 (2.13)	2.65 (2.14)	—	0.016 <sup>†</sup>
EDSS visual function score	1.00 (1.20)	0.98 (1.15)	—	0.098 <sup>†</sup>
MSQOL-54 score	60.04 (21.55)	56.76 (24.65)	—	0.003 <sup>†</sup>
Eyes with history of ON, n (%)	51 (25.5)	51 (25.5)	—	0.901 <sup>†</sup>
Time since last ON episode (yrs)	7.74 (6.28)	12.69 (6.98)	—	<0.001 <sup>†</sup>

EDSS = Expanded Disability Status Scale; MS = multiple sclerosis; MSQOL-54 = 54-item Multiple Sclerosis Quality of Life Scale; ON = optic neuritis. Boldface values indicate a statistically significant difference.

Data are mean (standard deviation) unless otherwise indicated.

\*Multiple sclerosis patients versus controls.

<sup>†</sup>Multiple sclerosis patients versus multiple sclerosis patients at 5 years.

frequency of 1 Hz. Latency and peak-to-peak amplitude were recorded for the P100 wave. We obtained at least 2 records of 100 events and calculated the mean amplitude.

The MSQOL-54 is a multidimensional health-related measure of QOL that combines generic and MS-specific items into a single instrument.<sup>19</sup> This test is based on the 36-item Short Form Health Survey, and 18 items were added by the test developer to assess MS-specific issues, such as fatigue and cognitive function. The resultant 54-item instrument generates 12 subscales along with 2 summary scores and 2 additional single-item measures. The subscales are physical function, role limitations—physical, role limitations—emotional, pain, emotional well being, energy, health perceptions, social function, cognitive function, health distress, overall QOL, and sexual function. All dimension scores were transformed linearly to a 0-to-100 scale. The summary scores are the physical health composite summary and the mental health composite summary; in addition, a global index score was computed as the mean of the dimension scores. Single-item measures are sexual satisfaction and change in health. The MSQOL-54 is considered both valid and reliable and is accepted widely to assess QOL accurately.<sup>19</sup> The validity of the test also has been confirmed in European patients,<sup>19</sup> and it is currently the most frequently used MS-specific questionnaire.<sup>19–21</sup>

### Statistical Analysis

Data were analyzed using SPSS software version 20.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). The Kolmogorov-Smirnov test was used to assess sample distribution. The changes registered in MS and healthy participants over the 5-year study period were parametrically distributed and thus compared using a paired Student *t* test. Changes detected in the MS patients were compared with those detected in healthy controls using a Student *t* test. Values of *P* < 0.05 were considered to indicate statistical significance; Bonferroni's correction for multiple comparisons was applied and a *P* value of less than 0.009 was considered statistically significant. The linear correlation between changes in the structural and functional parameters of the RNFL and changes in the MSQOL-54 or EDSS scores was determined using Pearson's correlation coefficient. Regression analysis was performed to identify basal RNFL parameters that were predictors of QOL or reduced functional ability in MS patients. Changes in the ophthalmologic parameters, QOL, and disability parameters over the 5-year follow-up were compared between patients with and without prior optic neuritis using a Student *t* test and with healthy controls by analysis of variance. Finally, following the Advised Protocol for OCT Study Terminology and Elements recommendations for

Table 2. Functional and Structural Parameters Obtained at Baseline and 5-Year Examinations in Multiple Sclerosis Patients and in Healthy Controls and Comparison of the Change in Each Group and between Both Groups (Multiple Sclerosis Patients vs. Healthy Controls)

	Multiple Sclerosis Patients (n = 200 Eyes)				Healthy Controls (n = 100 Eyes)				P Value (Change in Multiple Sclerosis Patients vs. Healthy Controls)
	Baseline	5 Years	Annual Change	P Value	Baseline	5 Years	Annual Change	P Value	
BCVA	0.91 (0.22)	0.90 (0.19)	-0.002	0.340	0.98 (0.04)	0.99 (0.02)	0.002	0.549	0.094
Ishihara test	18.06 (3.78)	17.89 (3.11)	-0.034	0.439	19.40 (2.81)	19.38 (2.74)	-0.004	0.699	0.122
Visual field, MD (dB)	-3.05 (2.67)	-3.11 (3.40)	0.012	0.441	0.31 (1.41)	0.29 (1.31)	-0.004	0.105	0.550
OCT RNFL thicknesses									
Average (μm)	94.82 (17.45)	86.61 (14.90)	-1.642	<0.001*	98.21 (10.50)	95.79 (9.53)	-0.484	0.032	<0.001*
Superior (μm)	115.95 (22.01)	104.34 (21.04)	-2.322	<0.001*	122.49 (16.93)	120.27 (14.93)	-0.444	0.035	<0.001*
Nasal (μm)	74.34 (18.99)	68.11 (14.33)	-1.246	<0.001*	78.50 (21.76)	76.59 (10.70)	-0.382	0.044	<0.001*
Inferior (μm)	120.89 (23.17)	111.34 (23.63)	-1.910	<0.001*	126.10 (18.36)	124.73 (17.94)	-0.274	0.075	<0.001*
Temporal (μm)	64.57 (19.67)	53.65 (13.13)	-2.184	<0.001*	68.14 (9.82)	65.87 (9.56)	-0.454	0.028	<0.001*
Macular volume (mm <sup>3</sup> )	6.55 (0.33)	6.43 (0.29)	-0.024	<0.001*	8.29 (0.44)	8.23 (0.55)	-0.012	0.009*	<0.001*
OCT GCL analysis (μm)									
Average IPL+GCL	78.45 (3.55)	74.89 (3.71)	-0.712	<0.001*	83.12 (3.20)	81.56 (3.43)	-0.312	0.079	<0.001*
Minimum IPL+GCL	79.09 (3.07)	77.55 (3.70)	-0.308	0.209	81.23 (3.69)	80.00 (3.11)	-0.246	0.106	0.065
Fovea	252.97 (7.49)	248.97 (8.87)	-0.800	<0.001*	256.12 (7.98)	253.38 (8.21)	-0.548	0.014	<0.001*
Inferior	80.73 (3.28)	78.16 (2.95)	-0.514	0.011	82.45 (3.33)	80.66 (2.98)	-0.358	0.056	0.125
Inferonasal	82.97 (3.98)	81.08 (4.06)	-0.378	0.123	84.54 (4.34)	82.32 (3.45)	-0.444	0.035	0.354
Nasal	84.73 (3.86)	81.01 (3.99)	-0.744	<0.001*	85.25 (4.21)	83.22 (3.87)	-0.406	0.078	0.512
Superior	80.95 (3.87)	77.49 (3.73)	-0.692	0.007	83.21 (3.66)	80.98 (3.27)	-0.446	0.028	0.034
Inferotemporal	78.81 (3.76)	74.33 (3.41)	-0.896	<0.001*	82.02 (3.41)	80.56 (3.70)	-0.292	0.230	0.001*
Temporal	78.86 (3.60)	74.12 (4.00)	-0.948	<0.001*	81.11 (3.93)	79.82 (4.11)	-0.258	0.177	0.003
SLP (μm)									
NFI	25.15 (8.53)	25.45 (8.09)	0.060	0.145	18.70 (6.87)	19.04 (7.80)	0.068	0.349	0.975
TSNIT average	51.87 (10.22)	50.87 (11.65)	-0.020	0.045	52.33 (6.01)	52.61 (7.71)	0.056	0.451	0.623
Superior average	62.14 (12.43)	62.43 (11.19)	0.058	0.137	65.32 (5.98)	64.87 (5.50)	-0.090	0.559	0.458
Inferior average	59.65 (9.48)	59.34 (11.50)	-0.062	0.299	65.00 (7.09)	64.76 (6.96)	-0.048	0.683	0.872
TSNIT SD	21.95 (5.03)	23.14 (5.44)	0.238	0.016	20.03 (4.21)	20.61 (4.16)	0.116	0.078	0.055
VEP									
Amplitude (mV)	11.22 (2.71)	10.89 (3.33)	-0.066	0.103	14.54 (2.67)	14.49 (2.55)	-0.010	0.449	0.088
Latency (ms)	116.33 (10.21)	124.03 (11.02)	1.540	0.009*	102.03 (7.49)	101.89 (6.90)	-0.028	0.618	0.014

BCVA = best-corrected visual acuity; GCL = ganglion cell layer; IPL = inner plexiform layer; MD = mean deviation; NFI = nerve fiber indicator; OCT = optical coherence tomography; RNFL = retinal nerve fiber layer; SD = standard deviation; SLP = scanning laser polarimetry; TSNIT = temporal-superior-nasal-inferior-temporal; VEP = visual evoked potential.

Data are mean (SD) unless otherwise indicated. *P* < 0.05 was considered to indicate statistical significance.

\*Statistical significance using Bonferroni's correction for multiple comparisons.

reporting quantitative OCT studies,<sup>22</sup> comparison of the change registered during the 5-year follow-up between patients and controls was repeated using the mean of eyes with nonoptic neuritis in the MS group.

## Results

A total of 204 eyes of 102 MS patients (mean age, 41.12±11.45 years) and 100 eyes of 50 healthy controls (mean age, 41.40±13.33 years) were included in the study. The female-to-male ratio was 3:1 in both groups (70 women and 32 men in the MS group, and 35 women and 15 men in controls group). Age, gender, and intraocular pressure were not significantly different between groups ( $P = 0.145, 0.223, \text{ and } 0.452$ , respectively). Two patients progressed from relapsing-remitting MS type to secondary progressive type during the study, and the data for these patients were excluded from the final statistical analysis.

The mean EDSS score was 2.59±2.13 at the baseline examination and 2.65±2.14 at the 5-year visit, with an annual change of 0.012±0.003 ( $P = 0.016$ ). The MSQOL-54 score was 60.04±21.55 at the baseline examination and 56.76±24.65 at the 5-year visit, with an annual change of -0.65±0.21 ( $P = 0.003$ ). Fifty-two (25.5%) of the MS eyes had had at least 1 optic neuritis episode before beginning the study, and the mean time after these episodes to the beginning of the study was 7.74±6.28 years. Age, gender, intraocular pressure, EDSS score, MSQOL-54 score, duration of disease, and time since last episode of optic neuritis are shown in Table 1.

Interferon  $\beta$ -1b was the most frequently prescribed drug for MS (21.3%) at the beginning of the study, followed by subcutaneous interferon  $\beta$ -1a (15.7%), intramuscular interferon  $\beta$ -1a (11.4%), and glatiramer acetate (10.1%). The percentage of patients not receiving any treatment at the beginning of the study was 38.0%, and that at the end of the follow-up was 37.6%. A total of 61 patients continued to receive their initially prescribed treatment throughout the study.

Significant thinning of all parameters of the peripapillary RNFL thickness and reduced macular volume based on OCT was detected at the 5-year follow-up visit in both patients and controls (except inferior RNFL thickness in healthy controls; Table 2).

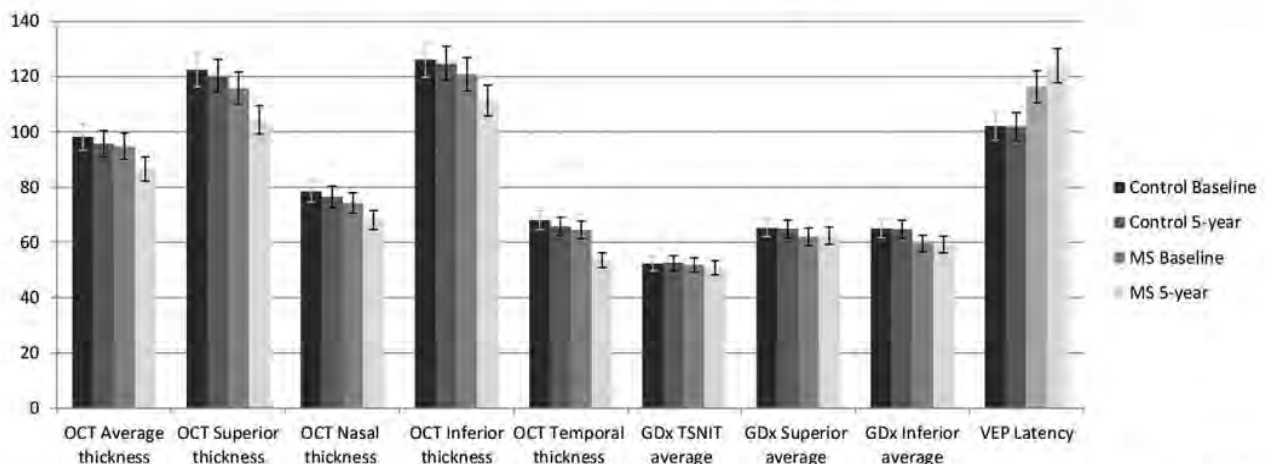
Ganglion cell layer analysis of Cirrus OCT showed significant thinning of all but 2 parameters in MS patients (minimum inner plexiform layer plus GCL and inferotemporal quadrant). The change in fovea, temporal, and inferotemporal measurements of the GCL correlated significantly with the change in the EDSS score over the 5-year follow-up ( $r = -0.341$  and  $P = 0.047$ ,  $r = -0.497$  and  $P = 0.009$ , and  $r = -0.507$  and  $P = 0.002$ , respectively).

Scanning laser polarimetry revealed a significant decrease in TSNIT average and a significant increase in the TSNIT standard deviation in the MS patient group, but these changes during the follow-up did not differ significantly compared with those of the healthy control group. A significant delay in the P100 wave latency in VEP was observed in the MS group during the follow-up and differed significantly from the control group throughout the study (Table 2).

In the MS group, annual mean RNFL thickness measured by OCT tended to decrease over the 5 years (Fig 1). The superior and temporal RNFL thicknesses exhibited greater changes between baseline and the 5-year follow-up in MS patients, with a decrease in annual mean thickness of 2.32  $\mu\text{m}$  (2.0%) and 2.18  $\mu\text{m}$  (3.4%), respectively ( $P < 0.001$ ; Table 2; Fig 1).

Changes in the structural variables revealed by OCT and SLP were not correlated significantly with changes in the functional ophthalmologic variables over the 5-year follow-up (best-corrected visual acuity, chromatic vision, visual field). The change in the temporal and average RNFL sectors based on OCT was moderately negatively correlated with the EDSS score over the 5-year follow-up ( $r = -0.426$  and  $P = 0.007$ , and  $r = -0.398$  and  $P = 0.010$ , respectively). In addition, the change in the temporal RNFL sector based on OCT was correlated moderately positively with the change in the MSQOL-54 score over the 5-year follow-up ( $r = 0.533$  and  $P = 0.031$ ). The change in SLP parameters was not correlated significantly with the neurologic scale scores. The change in the inferior and average RNFL sectors based on OCT was correlated moderately with the change in the inferior and TSNIT averages of SLP over the 5-year follow-up ( $r = 0.701$  and  $P = 0.021$ , and  $r = 0.742$  and  $P = 0.009$ , respectively).

Changes in the functional and structural parameters over the 5-year follow-up were compared between eyes with and without a

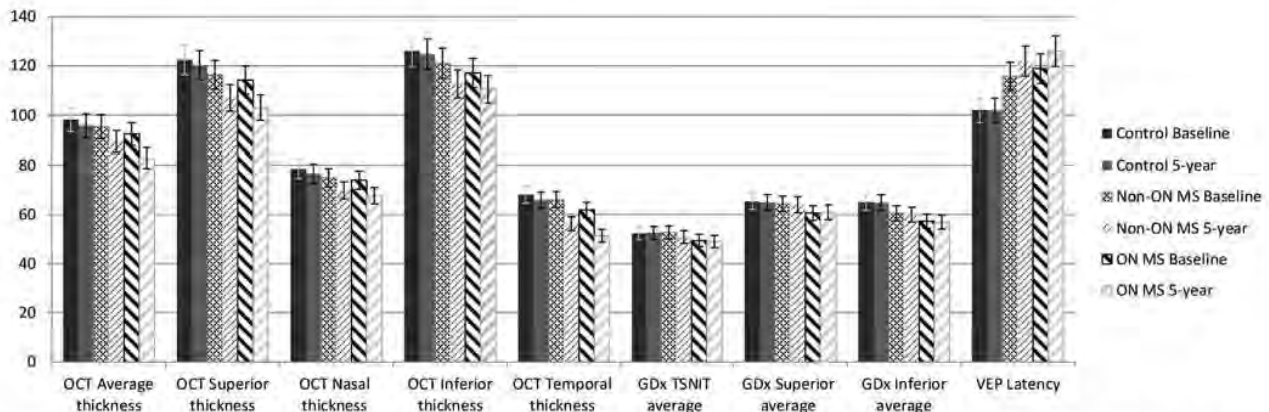


**Figure 1.** The mean retinal nerve fiber layer thickness measured by optical coherence tomography (OCT) and scanning laser polarimetry (SLP) and the mean P100 wave latency in visual evoked potentials (VEPs) in healthy controls and multiple sclerosis (MS) patients during 5 years of follow-up. The MS group showed more thinning of the retinal nerve fiber layer thickness during the follow-up and higher delays in the P100 wave latency. TSNIT = temporal–superior–nasal–inferior–temporal.

Table 3. Functional and Structural Parameters Obtained at Baseline and 5-Year Examinations in Multiple Sclerosis Patients with and without Optic Neuritis Antecedent and Comparisons of the Change in Each Group (Paired Student *t* test), between Both Groups (Multiple Sclerosis Patients with and without Optic Neuritis; Student *t* test), and between Both Groups and Healthy Controls (Analysis of Variance)

	Multiple Sclerosis Patients with Optic Neuritis (n = 51 Eyes)			Multiple Sclerosis Patients without Optic Neuritis (n = 149 Eyes)			P Value (Change in Multiple Sclerosis Patients with Optic Neuritis vs. Multiple Sclerosis Patients without Optic Neuritis)		P Value (Change vs. Multiple Sclerosis Groups and Controls)
	Baseline	5 Years	Annual Change	P Value	Baseline	5 Years	Annual Change	P Value	
BCVA	0.86 (0.24)	0.85 (0.26)	-0.002	0.650	0.96 (0.19)	0.95 (0.18)	-0.002	0.700	0.539
Ishihara test	15.33 (4.75)	15.70 (4.19)	0.074	0.707	19.11 (2.34)	18.90 (2.49)	-0.042	0.821	0.397
Visual field, MD (dB)	-5.54 (3.98)	-5.22 (4.31)	0.064	0.542	-2.00 (2.11)	-2.17 (2.67)	-0.034	0.218	0.487
OCT RNFL thicknesses									
Average (μm)	92.34 (18.68)	82.71 (16.71)	-1.926	<0.001*	95.33 (17.45)	89.31 (18.09)	-1.204	<0.001*	0.340
Superior (μm)	114.22 (21.72)	103.04 (20.80)	-2.236	<0.001*	116.44 (22.43)	107.02 (21.95)	-1.884	<0.001*	0.546
Nasal (μm)	74.01 (17.60)	67.69 (15.18)	-1.264	<0.001*	74.87 (18.04)	69.84 (15.28)	-1.006	<0.001*	0.405
Inferior (μm)	117.20 (22.77)	110.55 (24.14)	-1.330	<0.001*	121.11 (25.23)	112.76 (25.34)	-1.670	<0.001*	0.306
Temporal (μm)	61.88 (21.54)	51.43 (18.75)	-2.090	<0.001*	66.04 (19.01)	56.30 (18.01)	-1.948	<0.001*	0.388
Macular volume (mm <sup>3</sup> )	6.53 (0.33)	6.40 (0.30)	-0.026	0.002*	6.57 (0.34)	6.45 (0.30)	-0.024	0.003*	0.243
SLP									
NFI	26.33 (7.83)	26.58 (7.44)	0.005	0.220	24.87 (8.86)	25.02 (8.48)	0.030	0.438	0.549
TSNIT average (μm)	49.47 (10.67)	49.07 (11.29)	-0.080	0.060	52.76 (10.21)	50.91 (11.41)	-0.370	0.039	0.600
Superior average (μm)	60.51 (12.76)	60.93 (11.59)	0.084	0.138	64.33 (11.99)	64.02 (11.56)	-0.062	0.238	0.547
Inferior average (μm)	57.31 (10.10)	56.87 (11.65)	-0.088	0.165	60.57 (9.21)	59.99 (10.99)	-0.116	0.550	0.763
TSNIT SD (μm)	23.54 (12.51)	24.33 (13.56)	0.158	0.039	21.12 (9.85)	22.03 (11.43)	0.182	0.044	0.346
VEP									
Amplitude (mV)	8.54 (3.37)	8.76 (3.90)	0.044	0.302	12.11 (2.22)	11.93 (2.42)	-0.036	0.769	0.120
Latency (ms)	118.96 (12.41)	126.05 (13.16)	1.418	0.034	115.77 (9.75)	122.00 (9.27)	1.246	0.029	0.156

BCVA = best-corrected visual acuity; MD = mean deviation; NFI = nerve fiber indicator; OCT = optical coherence tomography; SD = standard deviation; RNFL = retinal nerve fiber layer; SLP = scanning laser polarimetry; TSNIT = temporal-superior-nasal-inferior-temporal; VEP = visual evoked potential.  
Data are mean (SD) unless otherwise indicated. *P* < 0.05 was considered to indicate statistical significance.  
\*Statistical significance using Bonferroni's correction for multiple comparisons. All statistical differences in change between 3 groups using analysis of variance showed differences between multiple sclerosis eyes with or without optic neuritis antecedent and healthy controls, but not between multiple sclerosis eyes with optic neuritis antecedent and multiple sclerosis eyes without optic neuritis antecedent.



**Figure 2.** The mean retinal nerve fiber layer thickness measured by optical coherence tomography (OCT) and scanning laser polarimetry (SLP) and the mean P100 wave latency in visual evoked potentials (VEPs) in the 3 groups (healthy controls, multiple sclerosis [MS] patients without prior optic neuritis episode, and MS patients with prior optic neuritis episode) during 5 years of follow-up. Multiple sclerosis patients showed more shrinking of the retinal nerve fiber layer thicknesses during the follow-up and a greater delay in the P100 wave latency compared with healthy controls, but the changes were similar between both groups of MS patients (with and without prior optic neuritis episode). ON = optic neuritis; TSNIT = temporal–superior–nasal–inferior–temporal.

prior optic neuritis episode and with healthy controls. Both groups of patients exhibited a greater decrease in the RNFL parameters and greater increase in the VEP latency than healthy controls, but no differences were detected between eyes with and without prior optic neuritis (Table 3; Fig 2).

The mean annual change was compared with the change during the first year of the study in the MS cohort and no differences were detected. A greater decrease of structural variables revealed by OCT and SLP and a greater increase of VEP latency in the MS group during the 5-year follow-up were confirmed using the mean of eyes with nonoptic neuritis in the MS group (Table 4) to account for intereye within-patient dependencies.<sup>22</sup> All the significant correlations described above were confirmed using the mean of eyes with nonoptic neuritis in the MS group.

## Discussion

The findings of the present study based on OCT, SLP, and VEP indicate that quantification of RNFL thinning in patients with MS over a 5-year period can be used as a biomarker of disease progression and impaired QOL. Retinal nerve fiber layer thinning occurs not only in eyes with a prior episode of optic neuritis, but also in patients with MS with no history of acute optic neuritis.<sup>15,23</sup> Retinal nerve fiber layer thickness measurements by OCT are considered a useful indirect marker of the progression of brain atrophy in patients with MS.<sup>2,16,24</sup> Optical coherence tomography also is used to measure macular volume. The macula comprises ganglion cell bodies, and thus macular volume could be a useful indicator of axonal loss resulting from neuronal degeneration.<sup>25</sup>

In VEP, the P100 wave latency is highly diagnostic in patients with MS. An episode of optic neuritis can result in a delay in the P100 latency, with the delay lasting for years.<sup>11</sup> In this study, the P100 latency increased over the 5-year follow-up because of MS progression and the loss of visual pathway function in the MS patients. The lack of a reduction in VEP amplitude despite thinning of the RNFL as

assessed by OCT may be the result of small signals from the optic nerve (that may be amplified in the cortex, essentially obscuring or possibly compensating for small differences in input). Interestingly, the control group also showed a nonsignificant increase in the P100 latency, which may be the result of the variability of the device. Thus, although the VEP P100 wave latency is useful for monitoring MS progression, it is less sensitive than the OCT measurements. In our study, we found a very small decrease in the VEP amplitude and latency in the healthy controls, which was not significant, and we consider that the VEP variability explains the small change during the 5-year follow-up.

Functional parameters did not show a significant change during the follow-up, suggesting that the RNFL loss detected by OCT was not severe enough to affect functionality or that compensatory mechanisms could attenuate the neurodegenerating effects and avoid relevant clinical deficits measured by visual acuity, visual field, or color vision.

This is a prospective study with a 5-year follow up in MS and healthy controls using OCT, SLP, and VEP. Axonal loss in the RNFL was demonstrated in both healthy controls and MS patients, but was greater in the MS patients. Consistent with previous studies, MS patients with and without a prior optic neuritis episode in the present study exhibited similar RNFL thinning.<sup>15,23,26,27</sup> These findings indicate that a prior optic neuritis episode is not a risk factor for higher axonal loss in the optic nerve. Our results confirmed the findings by Herrero et al<sup>26</sup> of a progressive decrease in RNFL thicknesses and macular volume by OCT in MS patients compared with healthy controls. However, Herrero et al found an annual reduction of 0.152  $\mu\text{m}$  in the RNFL average thickness of the MS population, whereas we registered a greater decrease (an annual reduction, 1.642  $\mu\text{m}$ ). In the study by Herrero et al, patients were followed up only for 3 years. Balk et al<sup>27</sup> found that the RNFL decrease is independent of previous episodes of optic neuritis, which is similar to our findings.

Table 4. Functional and Structural Parameters Obtained at Baseline and 5-Year Examinations in Multiple Sclerosis Patients Using the Mean of Both Eyes in Nonoptic Neuritis Eyes and in Healthy Controls and Comparison of the Change in Each Group and between Both Groups (Multiple Sclerosis Patients Using the Mean of Both Eyes per Patient vs. Healthy Controls)

	Multiple Sclerosis Patients Using Mean of Both Eyes in Nonoptic Neuritis Patients (n = 125)			Healthy Controls (n = 100)			P Value (Change in Multiple Sclerosis Patients vs. Healthy Controls)	
	Baseline	5 Years	Annual Change	P Value	Baseline	5 Years		Annual Change
BCVA	0.91 (0.20)	0.90 (0.21)	-0.002	0.441	0.98 (0.04)	0.99 (0.02)	0.002	0.549
Ishihara test	18.04 (3.98)	17.91 (3.65)	-0.026	0.576	19.40 (2.81)	19.38 (2.74)	-0.004	0.699
Visual field, MD (dB)	-3.09 (3.01)	-3.12 (3.87)	0.006	0.670	0.31 (1.41)	0.29 (1.31)	-0.004	0.105
OCT RNFL thicknesses								
Average (µm)	94.43 (15.91)	86.75 (16.23)	-1.536	<0.001*	98.21 (10.50)	95.79 (9.53)	-0.484	0.032
Superior (µm)	115.93 (21.66)	104.30 (20.09)	-2.326	0.001*	122.49 (16.93)	120.27 (14.93)	-0.444	0.035
Nasal (µm)	74.32 (20.29)	68.07 (18.41)	-1.250	0.002	78.50 (21.76)	76.59 (10.70)	-0.382	0.044
Inferior (µm)	119.59 (21.54)	111.65 (21.55)	-1.588	<0.001*	126.10 (18.36)	124.73 (17.94)	-0.274	0.075
Temporal (µm)	64.49 (20.19)	53.64 (17.76)	-2.170	<0.001*	68.14 (9.82)	65.87 (9.56)	-0.454	0.028
Macular volume (mm <sup>3</sup> )	6.54 (0.34)	6.43 (0.32)	-0.022	<0.001*	8.29 (0.44)	8.23 (0.55)	-0.012	0.009*
OCT GCL analysis (µm)								
Average IPL+GCL	78.47 (3.62)	74.93 (3.70)	-0.708	0.003*	83.12 (3.20)	81.56 (3.43)	-0.312	0.079
Minimum IPL+GCL	79.12 (4.87)	77.54 (3.54)	-0.316	0.301	81.23 (3.69)	80.00 (3.11)	-0.246	0.106
Fovea	253.01 (9.43)	249.03 (9.00)	-0.796	0.008*	256.12 (7.98)	253.38 (8.21)	-0.548	0.014
Inferior	80.70 (3.11)	78.12 (3.44)	-0.516	0.023	82.45 (3.33)	80.66 (2.98)	-0.358	0.056
Inferonasal	83.04 (3.70)	81.11 (4.76)	-0.386	0.453	84.54 (4.34)	82.32 (3.45)	-0.444	0.035
Nasal	84.69 (3.35)	80.87 (4.22)	-0.764	0.011	85.25 (4.21)	83.22 (3.87)	-0.406	0.078
Superior	80.93 (3.24)	77.50 (4.57)	-0.686	0.031	83.21 (3.66)	80.98 (3.27)	-0.446	0.028
Inferotemporal	78.77 (3.64)	74.30 (4.01)	-0.894	0.006*	82.02 (3.41)	80.56 (3.70)	-0.292	0.230
Temporal	78.88 (3.37)	74.12 (4.33)	-0.952	0.003*	81.11 (3.93)	79.82 (4.11)	-0.258	0.177
SLP								
NFI	25.19 (9.18)	25.46 (8.65)	0.054	0.541	18.70 (6.87)	19.04 (7.80)	0.068	0.349
TSNIT average (µm)	51.85 (9.13)	50.92 (12.40)	-0.014	0.904	52.33 (6.01)	52.61 (7.71)	0.056	0.451
Superior average (µm)	62.16 (10.76)	62.47 (11.61)	0.062	0.332	65.32 (5.98)	64.87 (5.50)	-0.090	0.559
Inferior average (µm)	59.66 (9.67)	59.33 (10.12)	-0.066	0.421	65.00 (7.09)	64.76 (6.96)	-0.048	0.683
TSNIT SD (µm)	21.96 (4.88)	23.13 (5.31)	0.234	0.040	20.03 (4.21)	20.61 (4.16)	0.116	0.078
VEP								
Amplitude (mV)	11.19 (2.80)	10.90 (3.44)	-0.058	0.412	14.54 (2.67)	14.49 (2.55)	-0.010	0.449
Latency (ms)	117.11 (12.93)	123.43 (12.99)	1.264	0.006*	102.03 (7.49)	101.89 (6.90)	-0.028	0.618

BCVA = best-corrected visual acuity; GCL = ganglion cell layer; IPL = inner plexiform layer; MD = mean deviation; NFI = nerve fiber indicator; OCT = optical coherence tomography; RNFL = retinal nerve fiber layer; SD = standard deviation; SLP = scanning laser polarimetry; TSNIT = temporal-superior-nasal-inferior-temporal; VEP = visual evoked potential.  
Data are mean (SD) unless otherwise indicated. P < 0.05 was considered to indicate statistical significance.  
\*Statistical significance using Bonferroni's correction for multiple comparisons.

Although we detected no significant correlation between the changes in SLP parameters and MS progression, the potential ability of SLP to identify changes in axonal cytoskeletal processes before neuronal loss and peripapillary RNFL axon bundles has been described by other authors.<sup>28</sup> We found an association between changes in SLP and OCT in our study, and thus it may be that increasing the sample size would demonstrate that SLP changes correlate with disease progression.

Recent studies demonstrate the usefulness of monitoring peripapillary RNFL thickness by OCT for predicting the likelihood of increased disability in MS patients over time<sup>17</sup> and for predicting a decrease in the quality of life.<sup>21</sup> Our findings are in accordance with these previous reports, because we found an association between RNFL thinning and an increased EDSS score (RNFL reduction in the temporal sector or average thicknesses was associated with higher disability in these patients) and between a decrease in the temporal RNFL sector and a decrease in the MSQOL-54 score (patients with higher temporal RNFL sector thinning show impaired QOL).

In addition, our study demonstrates an association between decreases in the fovea, temporal, and inferotemporal measurements of the GCL provided by OCT and an increase in the EDSS score over 5 years. As recent studies suggest, changes in GCL are even more appropriate markers of clinical neurodegeneration in the visual pathway.<sup>29,30</sup>

Each eye was analyzed separately in this study because the eyes can be affected differentially, especially in patients with unilateral episodes of optic neuritis. Moreover, OCT devices compare the 3-dimensional profile of the RNFL thickness of each eye to a normative database. Finally, in MS patients, a reduction in the macular volume correlates with neuronal necrosis, demyelination, and axonal damage.<sup>21</sup> The loss of ganglion cells also leads to a reduction of the macular volume (independently in each eye).<sup>2,6,31–33</sup> However, some authors consider the inclusion of only 1 eye of each patient adequate for statistical analysis because RNFL measurements correlate significantly between the 2 eyes. In our study, we reanalyzed the data using the mean of eyes with nonoptic neuritis in the MS group (Table 4) to account for intereye within-patient dependencies, as recommended by the International Multiple Sclerosis Visual consortium,<sup>22</sup> and the results of this analysis confirmed the progressive axonal loss in MS patients compared with healthy controls, and the correlation between the increase in the EDSS and temporal and superior RNFL thinning detected by OCT, and between decreased QOL and temporal RNFL thinning measured by OCT.

Previous studies indicate that a time lapse of 6 months after an optic neuritis episode is required to detect retrograde degeneration based on measurements made using digital image analysis techniques.<sup>31</sup> Here we excluded patients with an optic neuritis episode during the 6 months preceding the study, so all participants were considered to have stable MS. We might have detected greater differences if we had included patients with active acute relapsing MS episodes in the analysis. However, we

excluded these patients because the purpose of the study was to assess only axonal damage secondary to the progression of MS. The RNFL changes we observed were the result of only MS-related chronic neurodegeneration, and not of the acute heavy axonal loss found in acute relapsing MS episodes. The change in the evaluated parameters during the first few years was similar to the mean annual change, suggesting that progressive RNFL loss is continuous.

A potential limitation of this study is that our population mainly comprised a mildly affected relapsing-remitting MS cohort with low EDSS scores, high rates of no or first-line therapy, stable clinical disease activity without relapse within 5 years of observation, and a high mean age and disease duration at inclusion, because our intention was to reveal neurodegeneration independently of disease activity, so RNFL thinning may be higher in an MS cohort with normal disease activity. This should be kept in mind when interpreting the clinical findings. In conclusion, OCT measurements of RNFL thickness are useful for detecting axonal damage in MS patients and can be used to monitor disease progression and changes in QOL.

## References

1. Fisher JB, Jacobs DA, Markowitz CE, et al. Relation of visual function to retinal nerve fiber layer thickness in multiple sclerosis. *Ophthalmology*. 2006;113:324-332.
2. Gordon-Lipkin E, Chodkowski B, Reich DS, et al. Retinal nerve fiber layer is associated with brain atrophy in multiple sclerosis. *Neurology*. 2007;69:1603-1609.
3. Garcia-Martin E, Pueyo V, Pinilla I, et al. Fourier-domain OCT in multiple sclerosis patients: reproducibility and ability to detect retinal nerve fiber layer atrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52:4124-4131.
4. Khanifar AA, Parlitsis GJ, Ehrlich JR, et al. Retinal nerve fiber layer evaluation in multiple sclerosis with spectral domain optical coherence tomography. *Clin Ophthalmol*. 2010;4:1007-1013.
5. Sergott RC. Optical coherence tomography: measuring in-vivo axonal survival and neuroprotection in multiple sclerosis and optic neuritis. *Curr Opin Ophthalmol*. 2005;16:346-350.
6. Zaveri MS, Conger A, Salter A, et al. Retinal imaging by laser polarimetry and optical coherence tomography evidence of axonal degeneration in multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 2008;65:924-928.
7. Gundogan FC, Demirkaya S, Sobaci G. Is optical coherence tomography really a new biomarker candidate in multiple sclerosis? A structural and functional evaluation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48:5773-5781.
8. Garcia-Martin E, Pueyo V, Martin J, et al. Progressive changes in the retinal nerve fiber layer in patients with multiple sclerosis. *Eur J Ophthalmol*. 2010;20:167-173.
9. Trip SA, Schlottmann PG, Jones SJ, et al. Retinal nerve fiber layer axonal loss and visual dysfunction in optic neuritis. *Ann Neurol*. 2005;58:383-391.
10. Weinstock-Guttman B, Baier M, Stockton R, et al. Pattern reversal visual evoked potentials as a measure of visual pathway pathology in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2003;9:529-534.



11. Rodriguez-Mena D, Almarcegui C, Dolz I, et al. Electrophysiologic evaluation of the visual pathway in patients with multiple sclerosis. *J Clin Neurophysiol*. 2013;30:376-381.
12. Henderson AP, Trip SA, Schlottmann PG, et al. A preliminary longitudinal study of the retinal nerve fiber layer in progressive multiple sclerosis. *J Neurol*. 2010;257:1083-1091.
13. Ratchford JN, Quigg ME, Conger A, et al. Optical coherence tomography helps differentiate neuromyelitis optica and MS optic neuropathies. *Neurology*. 2009;73:302-308.
14. Syc SB, Warner CV, Hiremath GS, et al. Reproducibility of high-resolution optical coherence tomography in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2010;16:829-839.
15. Garcia-Martin E, Pueyo V, Ara JR, et al. Effect of optic neuritis on progressive axonal damage in multiple sclerosis patients. *Mult Scler*. 2011;17:830-837.
16. Frohman EM, Dwyer MG, Frohman T, et al. Relationship of optic nerve and brain conventional and non-conventional MRI measures and retinal nerve fiber layer thickness, as assessed by OCT and GDx: a pilot study. *J Neurol Sci*. 2009;282:96-105.
17. Martinez-Lapiscina EH, Arnow S, Wilson JA, et al. Retinal thickness measured with optical coherence tomography and risk of disability worsening in multiple sclerosis: a cohort study. *Lancet Neurol*. 2016;15:574-584.
18. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 2011;69:292-302.
19. Vickrey BG, Hays RD, Harooni R, et al. A health-related quality of life for multiple sclerosis. *Qual Life Res*. 1995;4:187-206.
20. Meyers AR, Gage H, Hendricks A. Health-related quality of life in neurology. *Arch Neurol*. 2000;57:1224-1227.
21. Garcia-Martin E, Rodriguez-Mena D, Herrero R, et al. Neuro-ophthalmologic evaluation, quality of life, and functional disability in patients with MS. *Neurology*. 2013;81:76-83.
22. Cruz-Herranz A, Balk LJ, Oberwahrenbrock T, et al. The APOSTEL recommendations for reporting quantitative optical coherence tomography studies. *Neurology*. 2016;86:2303-2309.
23. Talman LS, Bisker ER, Sackel DJ, et al. Longitudinal study of vision and retinal nerve fiber layer thickness in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2010;67:749-760.
24. Dörr J, Wernecke KD, Bock M, et al. Association of retinal and macular damage with brain atrophy in multiple sclerosis. *PLoS One*. 2011;6:e18132.
25. Burkholder BM, Osborne B, Loguidice MJ, et al. Macular volume determined by optical coherence tomography as a measure of neuronal loss in multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 2009;66:1366-1372.
26. Herrero R, Garcia-Martin E, Almarcegui C, et al. Progressive degeneration of the retinal nerve fiber layer in patients with multiple sclerosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(13):8344-8349.
27. Balk LJ, Cruz-Herranz A, Albrech P, et al. Timing of retinal neuronal and axonal loss in MS: a longitudinal OCT study. *J Neurol*. 2016;263(7):1323-1331.
28. Fortune B, Burgoyne CF, Cull GA, et al. Structural and functional abnormalities of retinal ganglion cells measured in vivo at the onset of optic nerve head surface change in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(7):3939-3950.
29. Saidha S, Al-Louzi O, Ratchford JN, et al. Optical coherence tomography reflects brain atrophy in multiple sclerosis: a four-year study. *Ann Neurol*. 2015;78(5):801-813.
30. Saidha S, Sotirchos ES, Ibrahim MA, et al. Microcystic macular oedema, thickness of the inner nuclear layer of the retina, and disease characteristics in multiple sclerosis: a retrospective study. *Lancet Neurol*. 2012;11(11):963-972.
31. Costello F, Coupland S, Hodge W, et al. Quantifying axonal loss after optic neuritis with optical coherence tomography. *Ann Neurol*. 2006;59:963-969.
32. Klistorner A, Arvind H, Garrick R, et al. Interrelationship of optical coherence tomography and multifocal visual-evoked potentials after optic neuritis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:2770-2777.
33. Grazioli E, Zivadinov R, Weinstock-Guttman B, et al. Retinal nerve fiber layer thickness is associated with brain MRI outcomes in multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2008;268:12-17.

## Footnotes and Financial Disclosures

Originally received: September 21, 2016.

Final revision: January 3, 2017.

Accepted: January 3, 2017.

Available online: February 7, 2017.

Manuscript no. 2016-387.

<sup>1</sup> Department of Ophthalmology, Miguel Servet University Hospital, Zaragoza, Spain.

<sup>2</sup> Aragon Institute for Health Research (Instituto de Investigación Sanitaria [IIS] Aragon), University of Zaragoza, Zaragoza, Spain.

<sup>3</sup> Department of Neurology, Miguel Servet University Hospital, Zaragoza, Spain.

<sup>4</sup> Department of Neurophysiology, Miguel Servet University Hospital, Zaragoza, Spain.

Financial Disclosure(s):

The author(s) have no proprietary or commercial interest in any materials discussed in this article.

Author Contributions:

Conception and design: Garcia-Martin, Polo, Larrosa

Analysis and interpretation: Garcia-Martin, Polo, Larrosa, Pablo, Satue

Data collection: Garcia-Martin, Ara, Martin, Almarcegui, Dolz, Vilades, Gil-Arribas, Fernandez, Satue

Obtained funding: none

Overall responsibility: Garcia-Martin, Ara, Martin, Almarcegui, Dolz, Satue

Abbreviations and Acronyms:

**Cz** = Z-center, equidistant point between both ear points; **EDSS** = Expanded Disability Status Scale; **GCL** = ganglion cell layer; **MS** = multiple sclerosis; **MSQOL-54** = 54-item Multiple Sclerosis Quality of Life Scale; **OCT** = optical coherence tomography; **QOL** = quality of life; **RNFL** = retinal nerve fiber layer; **SLP** = scanning laser polarimetry; **TSNIT** = superior-nasal-inferior-temporal; **VEP** = visual evoked potential.

Correspondence:

Elena Garcia-Martin, PhD, C/ Padre Arrupe, Consultas Externas de Oftalmología Edificio de consultas externas, Planta 1, 50009 Zaragoza, Spain. E-mail: egmvivax@yahoo.com.



## 10. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

A continuación, se enumeran las principales limitaciones observadas en los estudios que componen la presente tesis doctoral:

- 1) La falta de colaboración debido al estado físico y emocional del paciente, que podría verse reflejada en resultados de función visual inferiores a los que corresponderían para dicho paciente, puede aparecer en algunos casos, presumiblemente en los pacientes con fases más avanzadas de la EM, pero en nuestra población el grado de deterioro no era elevado, y creemos que no fue relevante.
- 2) Podrían darse pequeñas pérdidas o alteraciones de datos en los espesores de las capas de la retina en la OCT, debido a pequeños artefactos o errores de segmentación casi inapreciables al observar la imagen en face y los scans. Como hemos descrito en la metodología, excluimos imágenes con artefactos o de baja calidad en el análisis.
- 3) El tamaño muestral del estudio de mfERG fue bajo, lo cual implica una limitación a la hora de emitir conclusiones que se apliquen a la población general. Un mayor tamaño muestral podría haber detectado mayores significaciones estadísticas y habría dotado al estudio de mayor validez externa.
- 4) En el estudio de seguimiento de EM a 5 años se utilizó el OCT Cirrus High Definition, puesto que las imágenes basales se habían tomado previamente con dicho dispositivo, pero debemos reconocer que su resolución es menor a la que se logra con los actuales Spectralis SD-OCT o SS-OCT y su capacidad analítica también es más limitada.
- 5) A excepción del estudio citado anteriormente, en los demás solo se usó SS-OCT. Sería interesante analizar si las conclusiones de estos trabajos se pueden extrapolar a los dispositivos SD-OCT.
- 6) Los cuatro estudios son monocéntricos, y todos los sujetos eran blancos caucásicos, por lo que sería deseable disponer de una base de datos de pacientes y sujetos de control de varios centros y valorar si los resultados varían en función de la etnia y/o raza y de los condicionantes geográficos.
- 7) No se han analizado las posibles correlaciones entre las variables OCT analizadas y los resultados de la RM. Si se corroboraran los hallazgos de neurodegeneración mediante RM (considerado gold estándar en esta patología), la técnica OCT se postularía como un biomarcador más accesible y rentable.
- 8) En el primer estudio, a pesar de que se tuvo en cuenta la longitud axial del ojo como criterio de inclusión/exclusión, no se analizó la prevalencia de sujetos miopes dentro de cada grupo. Sabiendo que los espesores de la CFNR, la CCG y la coroides se ven

influenciados por la longitud axial, analizar la prevalencia de defectos de refracción enriquecería el estudio.

## 11. CONCLUSIONES

- I. Existe un adelgazamiento progresivo continuo del espesor de la capa de células ganglionares a lo largo de la vida y del resto de capas de la retina y la coroides a partir de la tercera década de vida.
- II. Los varones jóvenes, tanto con esclerosis múltiple como sanos, muestran un espesor mayor de las capas de la retina que las mujeres de su misma edad.
- III. El espesor de la capa de células ganglionares peripapilar analizado mediante tomografía de coherencia óptica tipo swept-source es el parámetro que muestra una mayor especificidad para detectar la neurodegeneración, aunque es el conjunto de capa de células ganglionares y capa de fibras nerviosas de la retina peripapilar el que mejor discrimina entre sujetos sanos y pacientes con esclerosis múltiple.
- IV. Los varones con esclerosis múltiple sufren una pérdida más pronunciada que las mujeres en el espesor del conjunto capa de células ganglionares - capa de fibras nerviosas de la retina con la edad, lo que demuestran un mayor daño neurodegenerativo en varones, pudiendo deberse a que la esclerosis múltiple remitente recidivante es generalmente más agresiva en los hombres, quienes acumulan discapacidad más rápidamente que las mujeres.
- V. Existe una pérdida del conjunto capa de células ganglionares - capa de fibras nerviosas de la retina en los sectores nasales externos a nivel macular, y posteriormente en los sectores internos, lo que refleja una degeneración anterógrada, por lo que podemos deducir que en sus estadios iniciales la esclerosis múltiple afecta principalmente al haz papilomacular.
- VI. Las máquinas de vectores de soporte (*Support vector machine*) son capaces de distinguir entre sujetos sanos y pacientes con esclerosis múltiple con un alto grado de sensibilidad y especificidad, incluso en ausencia de episodios previos de neuritis óptica.
- VII. El electroretinograma multifocal es capaz de detectar la presencia de esclerosis múltiple incluso en sujetos en estadios tempranos de la enfermedad y sin antecedentes de neuritis ópticas. El análisis de los electroretinogramas multifocales en sujetos sanos y en pacientes con esclerosis múltiple demuestra que el parámetro más discriminante para distinguir entre ellos es la amplitud de la onda N1, mientras que la región más eficiente del campo visual para dicha discriminación es el anillo R2.
- VIII. Los pacientes con esclerosis múltiple presentan una pérdida axonal progresiva en la capa de fibras nerviosas peripapilar, detectable mediante tomografía de coherencia óptica, que es un marcador útil para evaluar la progresión de la enfermedad.
- IX. El adelgazamiento de la capa de fibras nerviosas se correlaciona con una mayor discapacidad y una menor calidad de vida (medida con el test MSQOL-54) y la pérdida de espesor de la capa de células ganglionares a nivel macular se correlaciona con el incremento de la discapacidad en la esclerosis múltiple (medida con la escala ampliada del estado de discapacidad EDSS) tras 5 años de seguimiento.
- X. La pérdida anual media de espesor de la capa de fibras nerviosas de la retina en la esclerosis múltiple sugiere que existe una pérdida progresiva continua debido a la

neurodegeneración crónica propia de la enfermedad, y no sólo por la pérdida axonal intensa aguda que se produce en episodios recurrentes de esclerosis múltiple.

## 12. APORTACIONES DEL DOCTORANDO

Los artículos que abarcan la presente tesis aportan un nuevo análisis de los parámetros funcionales y estructurales en la EM gracias al uso de la inteligencia artificial, logrando nuevos métodos de optimización del diagnóstico incluso en fases precoces de la EM.

Si bien ya era conocida la alteración estructural de la retina en la EM, nuestros estudios han demostrado que también existe un adelgazamiento fisiológico de las capas de la retina en sujetos sanos, y que por tanto el daño estructural en la EM varía en función de la edad, habiendo observado que éste se produce en las etapas más precoces de la enfermedad, incluso en ausencia de neuritis óptica.

Por otro lado, hemos demostrado que la inteligencia artificial, en este caso con SVM es capaz de distinguir entre pacientes con EM y sujetos sanos con un alto grado de sensibilidad y especificidad. Las técnicas de aprendizaje automático ya habían demostrado sus ventajas en el diagnóstico de EM basado en resonancia magnética (RM), sin embargo, hoy en día, en comparación con la OCT sigue siendo una prueba invasiva, más cara y tiene un mayor tiempo de duración.

Además, hemos demostrado que la CCG en el área nasal de la macula muestra la mayor capacidad de discriminación entre sujetos sanos y pacientes con EM. Tradicionalmente han sido utilizados los protocolos de análisis peripapilar que, aunque también exhiben daño principalmente en el sector temporal, requieren de un daño más extenso para que la pérdida de CFNR sea detectable, y sin embargo nuestro análisis macular ha sido capaz de discriminar a los pacientes en las etapas más precoces de la enfermedad, incluso con un adelgazamiento inferior a las 7 micras.

Como curiosidad, aunque ya había sido observado por apenas un par de autores, hemos observado que los varones sufren una pérdida más pronunciada de los espesores de la CCG y de la CFNR con la edad que las mujeres, y es que a pesar de que la EM afecta preferentemente a las mujeres, generalmente es más agresiva en los varones, que acumulan discapacidad más rápido.

Otra de las aportaciones de esta tesis ha sido un estudio electrofisiológico completo y modernizado. Los PEV utilizados tradicionalmente para el estudio de la onda P100 ya habían demostrado un retraso en la latencia de ésta. Sin embargo, la utilidad clínica de los PEV se encuentra limitada por la fuerte influencia del área macular, pudiendo pasar por alto defectos locales. Por tanto, parece ser que, aunque los PEV están estrechamente relacionados con la discapacidad clínica, no parecen estarlo con los datos estructurales y no presentan una progresión evidente a lo largo de la evolución de la enfermedad, a diferencia de los espesores de la OCT que sí se muestran útiles para monitorización la progresión de la EM.

Nuestro estudio ha demostrado la capacidad diagnóstica del mfERG en etapas precoces de la EM, no obstante, una de las características de nuestro estudio es que por un lado nos hemos basado en el análisis tradicional de la señal y, por otro lado, hemos desarrollado un nuevo modelo de señal basado en datos de sujetos sanos, ya que no existe una base de normalidad aún para esta prueba. Hemos observado que en estadios precoces de la enfermedad y en

ausencia de episodios previos de neuritis óptica, la mfERG es capaz de detectar alteraciones subclínicas en las amplitudes de onda que concuerdan con el daño estructural.

A tenor de los resultados obtenidos en esta tesis, nos reafirmamos en que la OCT es una herramienta de gran utilidad en la práctica clínica diaria para el manejo de pacientes con EM, ya que ha demostrado su capacidad diagnóstica en etapas precoces de la enfermedad, es capaz de detectar pérdidas de apenas micras de espesor y de monitorizarlas en el tiempo, su herramienta de follow-up permite hacer un seguimiento muy preciso en el tiempo en el mismo punto anatómico de la retina, es una técnica no invasiva que puede repetirse tantas veces como sea necesario y por supuesto no debemos olvidar que se trata de una técnica coste-eficiente para el sistema de salud y muy cómoda para el paciente.



## 13. BIBLIOGRAFIA

- 1) Lamb TD, Collin SP, Pugh EN Jr. Evolution of the vertebrate eye: opsins, photoreceptors, retina and eye cup. *Nat Rev Neurosci.* 2007 Dec;8(12):960-76. doi: 10.1038/nrn2283. PMID: 18026166; PMCID: PMC3143066.
- 2) Nilsson DE. Eye evolution and its functional basis. *Vis Neurosci.* 2013 Mar;30(1-2):5-20. doi: 10.1017/S0952523813000035. PMID: 23578808; PMCID: PMC3632888.
- 3) Ohuchi H. Molecular aspects of eye evolution and development: from the origin of retinal cells to the future of regenerative medicine. *Acta Med Okayama.* 2013;67(4):203-12. doi: 10.18926/AMO/51064. PMID: 23970318.
- 4) Wei W, Feller MB. Organization and development of direction-selective circuits in the retina. *Trends Neurosci.* 2011 Dec;34(12):638-45. doi: 10.1016/j.tins.2011.08.002. Epub 2011 Aug 26. PMID: 21872944; PMCID: PMC4538999.
- 5) Nguyen-Ba-Charvet KT, Chédotal A. Development of retinal layers. *C R Biol.* 2014 Mar;337(3):153-9. doi: 10.1016/j.crvi.2013.11.010. Epub 2014 Mar 5. PMID: 24702841.
- 6) Morgan J, Wong R. Development of Cell Types and Synaptic Connections in the Retina. 2005 May 1 [updated 2007 May 29]. In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, editors. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System [Internet]*. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; 1995-. PMID: 21413410.
- 7) Fligor CM, Langer KB, Sridhar A, Ren Y, Shields PK, Edler MC, Ohlemacher SK, Sluch VM, Zack DJ, Zhang C, Suter DM, Meyer JS. Three-Dimensional Retinal Organoids Facilitate the Investigation of Retinal Ganglion Cell Development, Organization and Neurite Outgrowth from Human Pluripotent Stem Cells. *Sci Rep.* 2018 Sep 28;8(1):14520. doi: 10.1038/s41598-018-32871-8. PMID: 30266927; PMCID: PMC6162218.
- 8) Boya P, Esteban-Martínez L, Serrano-Puebla A, Gómez-Sintes R, Villarejo-Zori B. Autophagy in the eye: Development, degeneration, and aging. *Prog Retin Eye Res.* 2016 Nov; 55:206-245. doi: 10.1016/j.preteyeres.2016.08.001. Epub 2016 Aug 23. PMID: 27566190.
- 9) Nag TC, Wadhwa S. Ultrastructure of the human retina in aging and various pathological states. *Micron.* 2012 jul; 43(7):759-81. doi: 10.1016/j.micron.2012.01.011. Epub 2012 Feb 13. PMID: 22445096.
- 10) Yu DY, Cringle SJ. Retinal degeneration and local oxygen metabolism. *Exp Eye Res.* 2005 jun;80(6):745-51. doi: 10.1016/j.exer.2005.01.018. PMID: 15939030.
- 11) Chauhan BC, Vianna JR, Sharpe GP, Demirel S, Girkin CA, Mardin CY, Scheuerle AF, Burgoyne CF. Differential Effects of Aging in the Macular Retinal Layers, Neuroretinal Rim, and Peripapillary Retinal Nerve Fiber Layer. *Ophthalmology.* 2020 Feb;127(2):177-185. doi: 10.1016/j.ophtha.2019.09.013. Epub 2019 Sep 21. PMID: 31668716; PMCID: PMC6982591.
- 12) Rathnasamy G, Foulds WS, Ling EA, Kaur C. Retinal microglia - A key player in healthy and diseased retina. *Prog Neurobiol.* 2019 Feb; 173:18-40. doi: 10.1016/j.pneurobio.2018.05.006. Epub 2018 Jun 1. PMID: 29864456.
- 13) Singaravelu J, Zhao L, Fariss RN, Nork TM, Wong WT. Microglia in the primate macula: specializations in microglial distribution and morphology with retinal position and with aging. *Brain Struct Funct.* 2017 Aug;222(6):2759-2771. doi: 10.1007/s00429-017-1370-x. Epub 2017 Feb 17. PMID: 28213784; PMCID: PMC5542874.

- 14) La Morgia C, Ross-Cisneros FN, Hannibal J, Montagna P, Sadun AA, Carelli V. Melanopsin-expressing retinal ganglion cells: implications for human diseases. *Vision Res.* 2011 Jan 28;51(2):296-302. doi: 10.1016/j.visres.2010.07.023. Epub 2010 Aug 4. PMID: 20691201.
- 15) Esquiva G, Hannibal J. Melanopsin-expressing retinal ganglion cells in aging and disease. *Histol Histopathol.* 2019 Dec;34(12):1299-1311. doi: 10.14670/HH-18-138. Epub 2019 Jun 20. PMID: 31219170.
- 16) La Morgia, C., Ross-Cisneros, F. N., Sadun, A. A., Hannibal, J., Munarini, A., Mantovani, V., Salomao, S. R. (2010). Melanopsin retinal ganglion cells are resistant to neurodegeneration in mitochondrial optic neuropathies. *Brain*, 133(8), 2426-2438.
- 17) Wang, H. Z., Lu, Q. J., Wang, N. L., Hong, L. I. U., Zhang, L., & Zhan, G. L. (2008). Loss of melanopsin-containing retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Chinese medical journal*, 121(11), 1015-1019.
- 18) Obara EA, Hannibal J, Heegaard S, Fahrenkrug J. Loss of Melanopsin-Expressing Retinal Ganglion Cells in Severely Staged Glaucoma Patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016 Sep 1;57(11):4661-7. doi: 10.1167/iovs.16-19997. PMID: 27583827.
- 19) Esquiva G, Lax P, Pérez-Santonja JJ, García-Fernández JM, Cuenca N. Loss of Melanopsin-Expressing Ganglion Cell Subtypes and Dendritic Degeneration in the Aging Human Retina. *Front Aging Neurosci.* 2017 Apr 4; 9:79. doi: 10.3389/fnagi.2017.00079. PMID: 28420980; PMCID: PMC5378720.
- 20) Lax P, Esquiva G, Fuentes-Broto L, Segura F, Sánchez-Cano A, Cuenca N, Pinilla I. Age-related changes in photosensitive melanopsin-expressing retinal ganglion cells correlate with circadian rhythm impairments in sighted and blind rats. *Chronobiol Int.* 2016;33(4):374-91. doi: 10.3109/07420528.2016.1151025. Epub 2016 Mar 22. PMID: 27003747.
- 21) Poser CM. Viking voyages: the origin of multiple sclerosis? An essay in medical history. *Acta Neurol Scand Suppl.* 1995; 161:11-22. doi:10.1111/j.1600-0404.1995.tb05852.x
- 22) Poser CM. The dissemination of multiple sclerosis: a Viking saga? A historical essay. *Ann Neurol.* 1994;36 Suppl 2: S231-S243. doi:10.1002/ana.410360810
- 23) Lassmann H. Multiple Sclerosis Pathology. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(3): a028936. Published 2018 Mar 1. doi:10.1101/cshperspect.a028936
- 24) Brownell B, Hughes JT. 1962. The distribution of plaques in the cerebrum in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 25: 315–320
- 25) Mahad DH, Trapp BD, Lassmann H. 2015. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 14: 183–193
- 26) Grytten N, Torkildsen Ø, Myhr KM. Time trends in the incidence and prevalence of multiple sclerosis in Norway for eight decades. *Acta Neurol Scand.* 2015;132(199):29-36. doi:10.1111/ane.12428
- 27) Howard J, Trevick S, Younger DS. Epidemiology of Multiple Sclerosis. *Neurol Clin.* 2016;34(4):919-939. doi: 10.1016/j.ncl.2016.06.016
- 28) Kingwell E, Marriott JJ, Jetté N, et al. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. *BMC Neurol.* 2013; 13:128. Published 2013 Sep 26. doi:10.1186/1471-2377-13-128

- 29) Aguirre-Cruz L, Flores-Rivera J, De La Cruz-Aguilera DL, Rangel-López E, Corona T. Multiple sclerosis in Caucasians and Latino Americans. *Autoimmunity*. 2011;44(7):571-575. doi:10.3109/08916934.2011.592887
- 30) Leray E, Moreau T, Fromont A, Edan G. Epidemiology of multiple sclerosis. *Rev Neurol (Paris)*. 2016;172(1):3-13. doi:10.1016/j.neurol.2015.10.006
- 31) Eskandarieh S, Heydarpour P, Minagar A, Pourmand S, Sahraian MA. Multiple Sclerosis Epidemiology in East Asia, South East Asia and South Asia: A Systematic Review. *Neuroepidemiology*. 2016;46(3):209-221. doi:10.1159/000444019
- 32) Ghareghani M, Reiter RJ, Zibara K, Farhadi N. Latitude, Vitamin D, Melatonin, and Gut Microbiota Act in Concert to Initiate Multiple Sclerosis: A New Mechanistic Pathway. *Front Immunol*. 2018; 9:2484. Published 2018 Oct 30. doi:10.3389/fimmu.2018.02484
- 33) Handunnetthi L, Ramagopalan SV, Ebers GC. Multiple sclerosis, vitamin D, and HLA-DRB1\*15. *Neurology*. 2010;74(23):1905-1910. doi:10.1212/WNL.0b013e3181e24124
- 34) Tarlinton RE, Khaibullin T, Granatov E, Martynova E, Rizvanov A, Khaiboullina S. The Interaction between Viral and Environmental Risk Factors in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci*. 2019;20(2):303. Published 2019 Jan 14. doi:10.3390/ijms20020303
- 35) Willer C.J., Dyment D.A., Risch N.J., Sadovnick A.D., Ebers G.C. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003; 100:12877–12882. doi: 10.1073/pnas.1932604100.
- 36) Lynch S.G., Rose J.W., Smoker W., Petajan J.H. MRI in familial multiple sclerosis. *Neurology*. 1990; 40:900–903. doi: 10.1212/WNL.40.6.900.
- 37) Tienari P.J., Salonen O., Wikstrom J., Valanne L., Palo J. Familial multiple sclerosis: MRI findings in clinically affected and unaffected siblings. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 1992; 55:883–886. doi: 10.1136/jnnp.55.10.883.
- 38) Compston A., Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2002; 359:1221–1231. doi: 10.1016/S0140-6736(02)08220-X
- 39) Didonna A., Oksenberg J.R. *The Genetics of Multiple Sclerosis*. Codon Publications; Philadelphia, PA, USA: 2017.
- 40) Krause-Kyora B., Nutsua M., Boehme L., Pierini F., Pedersen D.D., Kornell S.C., Drichel D., Bonazzi M., Mobus L., Tarp P., et al. Ancient DNA study reveals HLA susceptibility locus for leprosy in medieval Europeans. *Nat. Commun*. 2018; 9:1569. doi: 10.1038/s41467-018-03857-x
- 41) Petrone A., Battelino T., Krzisnik C., Bugawan T., Erlich H., Di Mario U., Pozzilli P., Buzzetti R. Similar incidence of type 1 diabetes in two ethnically different populations (Italy and Slovenia) is sustained by similar HLA susceptible/protective haplotype frequencies. *Tissue Antigens*. 2002; 60:244–253. doi: 10.1034/j.1399-0039.2002.600306.x
- 42) Traboulsee A.L., Sadovnick A.D., Encarnacion M., Bernales C.Q., Yee I.M., Criscuoli M.G., Vilarino-Guell C. Common genetic etiology between “multiple sclerosis-like” single-gene disorders and familial multiple sclerosis. *Hum. Genet*. 2017; 136:705–714. doi: 10.1007/s00439-017-1784-9.
- 43) Colomba P., Zizzo C., Alessandro R., Cammarata G., Scalia S., Giordano A., Pieroni M., Sicurella L., Amico L., Burlina A., et al. Fabry disease and multiple sclerosis misdiagnosis: The role of family history and neurological signs. *Oncotarget*. 2018; 9:7758–7762. doi: 10.18632/oncotarget.23970.

- 44) Guerrero-García JJ, Carrera-Quintanar L, López-Roa RI, Márquez-Aguirre AL, Rojas-Mayorquín AE, Ortuño-Sahagún D. Multiple Sclerosis and Obesity: Possible Roles of Adipokines. *Mediators Inflamm*. 2016; 2016:4036232. doi:10.1155/2016/4036232
- 45) Mokry LE, Ross S, Timpson NJ, Sawcer S, Davey Smith G, Richards JB. Obesity and Multiple Sclerosis: A Mendelian Randomization Study. *PLoS Med*. 2016;13(6):e1002053. Published 2016 Jun 28. doi: 10.1371/journal.pmed.1002053
- 46) Bagur MJ, Murcia MA, Jiménez-Monreal AM, et al. Influence of Diet in Multiple Sclerosis: A Systematic Review. *Adv Nutr*. 2017;8(3):463-472. Published 2017 May 15. doi:10.3945/an.116.014191
- 47) Ochoa-Repáraz J, Kirby TO, Kasper LH. The Gut Microbiome and Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(6): a029017. Published 2018 Jun 1. doi:10.1101/cshperspect. a029017
- 48) Riccio P, Rossano R. Diet, Gut Microbiota, and Vitamins D + A in Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics*. 2018;15(1):75-91. doi:10.1007/s13311-017-0581-4
- 49) Heydarpour P, Manouchehrinia A, Beiki O, et al. Smoking and worsening disability in multiple sclerosis: A meta-analysis. *Acta Neurol Scand*. 2018;138(1):62-69. doi:10.1111/ane.12916
- 50) Hachim MY, Elemam NM, Maghazachi AA. The Beneficial and Debilitating Effects of Environmental and Microbial Toxins, Drugs, Organic Solvents and Heavy Metals on the Onset and Progression of Multiple Sclerosis. *Toxins (Basel)*. 2019;11(3):147. Published 2019 Mar 5. doi:10.3390/toxins11030147
- 51) Tamburo E, Varrica D, Dongarrà G, Grimaldi LM. Trace elements in scalp hair samples from patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *PLoS One*. 2015;10(4): e0122142. Published 2015 Apr 9. doi: 10.1371/journal.pone.0122142
- 52) 12. Spiro A, Buttriss JL. Vitamin D: an overview of vitamin D status and intake in Europe. *Nutr Bull/BNF* (2014) 39:322–50. 10.1111/nbu.12108
- 53) Ascherio A., Munger K.L. Epstein-barr virus infection and multiple sclerosis: A review. *J. Neuroimmune Pharmacol*. 2010; 5:271–277. doi: 10.1007/s11481-010-9201-3
- 54) Langer-Gould A., Wu J., Lucas R., Smith J., Gonzales E., Amezcua L., Haraszi S., Chen L.H., Quach H., James J.A., et al. Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and multiple sclerosis susceptibility: A multiethnic study. *Neurology*. 2017; 89:1330–1337. doi: 10.1212/WNL.0000000000004412.
- 55) Satue M, Rodrigo MJ, Otin S, et al. Relationship between Visual Dysfunction and Retinal Changes in Patients with Multiple Sclerosis. *PLoS One*. 2016;11(6):e0157293. Published 2016 Jun 28. doi: 10.1371/journal.pone.0157293
- 56) Hoff JM, Dhayalan M, Midelfart A, Tharaldsen AR, Bø L. Visual dysfunction in multiple sclerosis. Synsproblemer ved multipel sklerose. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 2019;139(11):10.4045/tidsskr.18.0786. Published 2019 Aug 2. doi:10.4045/tidsskr.18.0786
- 57) Jiang H, Chen W, Delgado S, Liu Y, Lin Y, Wang J. Altered birefringence of peripapillary retinal nerve fiber layer in multiple sclerosis measured by polarization sensitive optical coherence tomography. *Eye Vis (Lond)*. 2018; 5:14.
- 58) Garcia-Martin E, Pueyo V, Martin J, Almarcegui C, Ara JR, Dolz I, Honrubia FM, Fernandez Progressive changes in the retinal nerve fiber layer in patients with multiple sclerosis. *FJ.Eur J Ophthalmol*. 2010;20(1):167-173.

- 59) Manogaran P, Samardzija M, Schad AN, Wicki CA, Walker-Egger C, Rudin M, Grimm C, Schippling S. Retinal pathology in experimental optic neuritis is characterized by retrograde degeneration and gliosis. *Acta Neuropathol Commun.* 2019;7(1):116.
- 60) Gaetani L, Iaccheri B, Cerquaglia A, Gentili L, Fiore T, Di Gregorio M, Mancini A, Calabresi P, Cagini C, Sarchielli P, Di Filippo M. Visual pathway involvement in multiple sclerosis: Look straight in the eyes. *Mult Scler Relat Disord.* 2017; 17:217-219.
- 61) Cavaliere C, Vilades E, Alonso-Rodríguez MC, Rodrigo MJ, Pablo LE, Miguel JM, López-Guillén E, Morla EMS, Boquete L, Garcia-Martin E. Computer-Aided Diagnosis of Multiple Sclerosis Using a Support Vector Machine and Optical Coherence Tomography Features. *Sensors (Basel).* 2019 ;19(23).
- 62) Carcelén-Gadea M, Quintanilla-Bordás C, Gracia-García A, García-Villanueva C, Jannone-Pedro N, Álvarez-Sánchez L, Vilaplana-Domínguez L, Blanco-Hernández T, Pons-Amate JM, Cervelló-Donderis A. Functional and structural changes in the visual pathway in multiple sclerosis. *Brain Behav.* 2019 ;9(12).
- 63) Chisari CG, Toro MD, Cimino V, Rejdak R, Luca M, Rapisarda L, Avitabile T, Posarelli C, Rejdak K, Reibaldi M, Zappia M, Patti F. Retinal Nerve Fiber Layer Thickness and Higher Relapse Frequency May Predict Poor Recovery after Optic Neuritis in MS Patients. *J Clin Med.* 2019 ;8(11).
- 64) Button J, Al-Louzi O, Lang A, Bhargava P, Newsome SD, Frohman T, Balcer LJ, Frohman EM, Prince J, Calabresi PA, Saidha S. Disease-modifying therapies modulate retinal atrophy in multiple sclerosis: A retrospective study. *Neurology.* 2017 ;88(6):525-532.
- 65) Green AJ, McQuaid S, Hauser SL, Allen IV, Lyness R. Ocular pathology in multiple sclerosis: retinal atrophy and inflammation irrespective of disease duration. *Brain.* 2010;133(6):1591–1601.
- 66) He Y, Carass A, Liu Y, Jedynek BM, Solomon SD, Saidha S, Calabresi PA, Prince JL. Fully Convolutional Boundary Regression for Retina OCT Segmentation. *Med Image Comput Assist Interv.* 2019; 11764:120-128.
- 67) Ratchford JN, Saidha S, Sotirchos ES, Oh JA, Seigo MA, Eckstein C, Durbin MK, Oakley JD, Meyer SA, Conger A, Frohman TC, Newsome SD, Balcer LJ, Frohman EM, Calabresi PA. Active MS is associated with accelerated retinal ganglion cell/inner plexiform layer thinning. *Neurology* 2013; 80:47–54
- 68) Trip SA, Schlottmann PG, Jones SJ, Altmann DR, Garway-Heath DF, Thompson AJ, Plant GT, Miller DH. Retinal nerve fiber layer axonal loss and visual dysfunction in optic neuritis. *Ann Neurol.* 2005;58(3):383–391.
- 69) Balk LJ, Cruz-Herranz A, Albrecht P, Arnow S, Gelfand JM, Tewarie P, Killestein J, Uitdehaag BM, Petzold A, Green AJ. Timing of retinal neuronal and axonal loss in MS: a longitudinal OCT study. *J Neurol.* 2016 ;263(7):1323-31.
- 70) Burton JM, Eliasziw M, Trufyn J, Tung C, Carter G, Costello F. A prospective cohort study of vitamin D in optic neuritis recovery. *Mult Scler.* 2017;23(1):82-93. doi:10.1177/1352458516642315
- 71) Erickson BJ, Korfiatis P, Akkus Z, Kline TL. Machine Learning for Medical Imaging. *Radiographics.* 2017;37(2):505-515. doi:10.1148/rg.2017160130

- 72) Sidey-Gibbons JAM, Sidey-Gibbons CJ. Machine learning in medicine: a practical introduction. *BMC Med Res Methodol.* 2019;19(1):64. Published 2019 Mar 19. doi:10.1186/s12874-019-0681-4
- 73) Barrett DG, Morcos AS, Macke JH. Analyzing biological and artificial neural networks: challenges with opportunities for synergy? *Curr Opin Neurobiol.* 2019; 55:55-64. doi: 10.1016/j.conb.2019.01.007
- 74) Kriegeskorte N, Golan T. Neural network models and deep learning. *Curr Biol.* 2019;29(7): R231-R236. doi: 10.1016/j.cub.2019.02.034
- 75) Zhang Z. Introduction to machine learning: k-nearest neighbors. *Ann Transl Med.* 2016;4(11):218. doi:10.21037/atm.2016.03.37
- 76) Chen K, Li R, Dou Y, Liang Z, Lv Q. Ranking Support Vector Machine with Kernel Approximation. *Comput Intell Neurosci.* 2017; 2017:4629534. doi:10.1155/2017/4629534
- 77) Chern CC, Chen YJ, Hsiao B. Decision tree-based classifier in providing telehealth service. *BMC Med Inform Decis Mak.* 2019;19(1):104. Published 2019 May 30. doi:10.1186/s12911-019-0825-9
- 78) Taha AM, Mustapha A, Chen SD. Naive Bayes-guided bat algorithm for feature selection. *ScientificWorldJournal.* 2013; 2013:325973. Published 2013 Dec 14. doi:10.1155/2013/325973
- 79) Ching T, Himmelstein DS, Beaulieu-Jones BK, et al. Opportunities and obstacles for deep learning in biology and medicine. *J R Soc Interface.* 2018;15(141):20170387. doi:10.1098/rsif.2017.0387
- 80) Petzold A, Balcer LJ, Calabresi PA, et al. Retinal layer segmentation in multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol.* 2017;16(10):797-812. doi:10.1016/S1474-4422(17)30278-8
- 81) Balk LJ, Coric D, Knier B, et al. Retinal inner nuclear layer volume reflects inflammatory disease activity in multiple sclerosis; a longitudinal OCT study. *Mult Scler J Exp Transl Clin.* 2019;5(3):2055217319871582. Published 2019 Sep 5. doi:10.1177/2055217319871582
- 82) Janáky M, Jánossy Á, Horváth G, Benedek G, Braunitzer G. VEP and PERG in patients with multiple sclerosis, with and without a history of optic neuritis. *Doc Ophthalmol.* 2017;134(3):185-193. doi:10.1007/s10633-017-9589-7
- 83) Satue M, Jarauta L, Obis J, et al. Functional Evaluation of the Visual Pathway in Patients with Multiple Sclerosis Using a Multifunction Stimulator Monitor. *J Ophthalmol.* 2019; 2019:2890193. Published 2019 Sep 18. doi:10.1155/2019/2890193
- 84) de Santiago L, Ortiz Del Castillo M, Garcia-Martin E, et al. Empirical Mode Decomposition-Based Filter Applied to Multifocal Electroretinograms in Multiple Sclerosis Diagnosis. *Sensors (Basel).* 2019;20(1):7. Published 2019 Dec 18. doi:10.3390/s20010007
- 85) Hanson J.V.M., Hediger M., Manogaran P., Landau K., Hagenbuch N., Schippling S., Gerth-Kahlert C. Outer Retinal Dysfunction in the Absence of Structural Abnormalities in Multiple Sclerosis. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2018; 59:549. doi: 10.1167/iovs.17-22821.

- 86) d. Moura A., Teixeira R.A.A., Costa M.F., Barboni M.S.T., Callegaro D., Ventura D.F. Assessment of mfERG, Spatial Contrast Sensitivity and Visual Field in Patients with Multiple Sclerosis. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007; 48:910.
- 87) Gundogan F.C., Demirkaya S., Sobaci G. Is optical coherence tomography really a new biomarker candidate in multiple sclerosis? —A structural and functional evaluation. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007; 48:5773–5781. doi: 10.1167/iovs.07-0834.
- 88) Saidha S., Syc S.B., Ibrahim M.A., Eckstein C., Warner C.V., Farrell S.K., Oakley J.D., Durbin M.K., Meyer S.A., Balcer L.J., et al. Primary retinal pathology in multiple sclerosis as detected by optical coherence tomography. *Brain.* 2011; 134:518–533. doi: 10.1093/brain/awq346.
- 89) Vilades Palomar E., Orduna Hospital E., Ciprés M., Obis J., Rodrigo SanJuan M.J., Satué Palacian M., Garcia-Martin E. Correlation between electrophysiological test and visual dysfunction in multiple sclerosis patients. *Acta Ophthalmol.* 2017;95 doi: 10.1111/j.1755-3768.2017.0T035.
- 90) Neroev V.V., Eliseeva E.K., Zueva M.V., Lysenko V.S., Zakharova M.N., Tsapenko I.V., Semenova N.A., Simaniv T.O. Demyelinating optic neuritis: Optical coherence tomography and multifocal electroretinography data correlation. *Hum. Physiol.* 2016; 42:879–884. doi: 10.1134/S0362119716080090.
- 91) Filgueiras T.G., Oyamada M.K., Preti R.C., Apóstolos-Pereira S.L., Callegaro D., Monteiro M.L.R. Outer Retinal Dysfunction on Multifocal Electroretinography May Help Differentiating Multiple Sclerosis from NeuromyelitisOptica Spectrum Disorder. *Front. Neurol.* 2019; 10:928. doi: 10.3389/fneur.2019.00928.
- 92) Law MT, Traboulsee AL, Li DK, et al. Machine learning in secondary progressive multiple sclerosis: an improved predictive model for short-term disability progression. *Mult Scler J Exp Transl Clin.* 2019;5(4):2055217319885983. Published 2019 Nov 6. doi:10.1177/2055217319885983
- 93) Zhang H, Alberts E, Pongratz V, et al. Predicting conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis—An imaging-based machine learning approach. *Neuroimage Clin.* 2019; 21:101593. doi: 10.1016/j.nicl.2018.11.003
- 94) Mateos-Pérez JM, Dadar M, Lacalle-Aurioles M, Iturria-Medina Y, Zeighami Y, Evans AC. Structural neuroimaging as clinical predictor: A review of machine learning applications. *Neuroimage Clin.* 2018; 20:506-522. Published 2018 Aug 10. doi: 10.1016/j.nicl.2018.08.019
- 95) Zurita M, Montalba C, Labbé T, et al. Characterization of relapsing-remitting multiple sclerosis patients using support vector machine classifications of functional and diffusion MRI data. *Neuroimage Clin.* 2018; 20:724-730. doi: 10.1016/j.nicl.2018.09.002
- 96) Polman, C.H.; Reingold, S.C.; Banwell, B.; Clanet, M.; Cohen, J.A.; Filippi, M.; Fujihara, K.; Havrdova, E.; Hutchinson, M.; Kappos, L.; et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann. Neurol.* 2011, 69, 292–302





## 14. APENDICES

### Apéndice I. Factor de impacto de las revistas y áreas temáticas.

Elisa Viladés, Amaya Pérez-del Palomar, José Cegoñino, Javier Obis, María Satue, Elvira Orduna, Luis E Pablo, Marta Ciprés, Elena Garcia-Martin. **Physiological changes in retinal layers thicknesses measured with swept source optical coherence tomography.**

**Revista:** Plos One (en prensa)

**ISSN:** 1932-6203

**Índice de impacto (JCR 2019):** 2.74 (Q2)

**Área temática de la revista:** Oftalmología.

**Posición entre las revistas de oftalmología en el JCR 2019:** 27/71

Carlo Cavaliere, Elisa Vilades, María Concepción Alonso-Rodríguez, María Jesús Rodrigo, Luis Emilio Pablo, Juan Manuel Miguel, Elena López-Guillén, Eva María Sánchez Morla, Luciano Boquete, Elena Garcia-Martin. **Computer-aided diagnosis of multiple sclerosis using a support vector machine and optical coherence tomography features.** Sensors (Basel) 2019;19(23):5323

**Revista:** Sensors

**ISSN:** 1424-8220

**Índice de impacto (JCR 2019):** 3.275 (Q1)

**Área temática de la revista:** Computer Science

**Posición entre las revistas de oftalmología en el JCR 2019:** 17/129

Luciano Boquete, Elena López-Guillén, Elisa Vilades, Juan Manuel Miguel-Jiménez, Luis Emilio Pablo, Luis De Santiago, Miguel Ortiz del Castillo, María Concepción Alonso-Rodríguez, Eva María Sánchez Morla, Almudena López-Dorado, Elena Garcia-Martin. **Diagnostic ability of multifocal electroretinogram in early multiple sclerosis using a new signal analysis method.** PLoS One 2019;14(11): e0224500.

**Revista:** Plos One

**ISSN:** 1932-6203

**Índice de impacto (JCR 2019):** 2.74 (Q2)

**Área temática de la revista:** Oftalmología.

**Posición entre las revistas de oftalmología en el JCR 2019:** 27/71

Elena Garcia-Martin, Jose Ramón Ara, Jesus Martin, Carmen Almarcegui, Isabel Dolz, Elisa Vilades, Laura Gil-Arribas, Francisco Javier Fernandez, Vicente Polo, Jose Manuel Larrosa, Luis Emilio Pablo, Maria Satue. **Retinal and optic nerve degeneration in patients with multiple sclerosis followed up for 5 years.** Ophthalmology 2017; 124(5):688-696.

**Revista:** Ophthalmology

**ISSN:** 0161-6420

**Índice de impacto (JCR 2019):** 7.479 (Q1)

**Área temática de la revista:** Oftalmología.

**Posición entre las revistas de oftalmología en el JCR 2019:** 2/59

## Apéndice II. Justificación de la contribución del doctorando en cada publicación.

Elisa Viladés, Amaya Pérez-del Palomar, José Cegoñino, Javier Obis, María Satue, Elvira Orduna, Luis Emilio Pablo, Marta Ciprés, Elena Garcia-Martin. **Physiological changes in retinal layers thicknesses measured with swept source optical coherence tomography.** Plos One 2020. In press

La doctoranda realizó el trabajo de campo, siendo la persona encargada de la adquisición de las imágenes, realizó la recogida de datos, exportación y elaboración de las bases de datos. Fue la encargada de la redacción del artículo, así como del proceso de revisión y corrección de la revista.

Carlo Cavaliere, Elisa Vilades, M<sup>a</sup> C Alonso-Rodríguez, María Jesús Rodrigo, Luis Emilio Pablo, Juan Manuel Miguel, Elena López-Guillén, Eva M<sup>a</sup> Sánchez Morla, Luciano Boquete, Elena Garcia-Martin. **Computer-Aided Diagnosis of Multiple Sclerosis Using a Support Vector Machine and Optical Coherence Tomography Features.** Sensors (Basel) 2019 Dec 3;19(23):5323

La doctoranda realizó el trabajo de campo, siendo la persona encargada de la adquisición de las imágenes, así como de determinadas pruebas de la evaluación oftalmológica, realizó la recogida de datos, exportación y elaboración de las bases de datos. Participó en el proceso de corrección y de redacción del artículo encargándose de la parte oftálmica.

L. Boquete, E. Vilades, E. López-Guillén, J. M. Miguel-Jiménez, L. E. Pablo, L. De Santiago, M. Ortiz del Castillo, M. C. Alonso-Rodríguez, E. M. Sánchez Morla, A. López-Dorado, E. Garcia-Martin. **Diagnostic ability of multifocal electroretinogram in early multiple sclerosis using a new signal analysis method.** PLoS One 2019 Nov 8;14(11): e0224500

La doctoranda realizó el trabajo de campo, siendo la persona encargada de la realización de la prueba, así como de determinadas pruebas de la evaluación oftalmológica, realizó la recogida de datos, exportación y elaboración de la base de datos. Participó en el proceso de corrección y de redacción del artículo encargándose de la parte oftálmica.

Elena Garcia-Martin, Jose R Ara, Jesus Martin, Carmen Almarcegui, Isabel Dolz, Elisa Vilades, Laura Gil-Arribas, Francisco J Fernandez, Vicente Polo, Jose M Larrosa, Luis E Pablo, Maria Satue. **Retinal and Optic Nerve Degeneration in Patients with Multiple Sclerosis Followed up for 5 Years.** Ophthalmology 2017 May; 124(5):688-696

La doctoranda fue una de las personas encargadas de la realización de los test de función visual y pruebas estructurales, además colaboró en la recogida de datos, exportación y elaboración de la base de datos. Participó en el proceso de corrección y de redacción del artículo.

Apéndice III. Renuncia de los coautores no doctores a usar el artículo en su propia tesis doctoral.



Escuela de Doctorado  
Universidad Zaragoza

**RENUNCIA DE LOS COAUTORES DE LOS TRABAJOS PRESENTADOS  
COMO PARTE DE UNA TESIS DOCTORAL EN LA MODALIDAD DE  
COMPENDIO DE PUBLICACIONES**

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Lopez-Dorado	Nombre: Almudena	
DNI/Pasaporte/NIE: 50455541G	Teléfono: 646349923	Correo electrónico: almudena.lopez@uah.es

2.- Tesis Doctoral
Título: EVALUACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA Y NEURO-OFTALMOLÓGICA CON TECNOLOGÍA DE ÚLTIMA GENERACIÓN EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE
Autor: Elisa Viladés Palomar
Programa de doctorado: Medicina

3.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que el firmante es coautor
Luciano Boquete, Elena López-Guillén, Elisa Vilades, Juan Manuel Miguel-Jiménez, Luis Emilio Pablo, Luis De Santiago, Miguel Ortiz del Castillo, María Concepción Alonso-Rodríguez, Eva María Sánchez Morla, Almudena López-Dorado, Elena Garcia-Martin. Diagnostic ability of multifocal electroretinogram in early multiple sclerosis using a new signal analysis method. PLoS One 2019;14(11):e0224500.

RENUNCIA:
Renuncio a que las publicaciones anteriores puedan ser presentadas como parte de otra tesis doctoral en la modalidad de compendio de publicaciones.
<lugar>, <fecha> Alcala de Henares 15/10/2020
Firma: LOPEZ DORADO - ALMUDENA - 50455541G 50455541G

Firmado digitalmente por  
LOPEZ DORADO  
ALMUDENA - 50455541G  
Fecha: 2020.10.15  
13:14:09 +0200

Conforme a lo dispuesto en la legislación vigente (Reglamento (UE) 2016/679, de 27 de abril), de protección de datos de carácter personal, le informamos que sus datos pasarán a ser tratados por la Universidad de Zaragoza con la finalidad de tramitar la gestión académica y administrativa de sus estudiantes, así como su participación en actividades y servicios universitarios. Puede ejercer sus derechos de acceso, rectificación, limitación, oposición o portabilidad ante el Gerente de la UZ.




## RENUNCIA DE LOS COAUTORES DE LOS TRABAJOS PRESENTADOS COMO PARTE DE UNA TESIS DOCTORAL EN LA MODALIDAD DE COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Ciprés Alastuey	Nombre: Marta	
DNI/Pasaporte/NIE: 18453783D	Teléfono: 639960074	Correo electrónico: martacipres90@gmail.com

2.- Tesis Doctoral
Título: EVALUACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA Y NEURO-OFTALMOLÓGICA CON TECNOLOGÍA DE ÚLTIMA GENERACIÓN EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE
Autor: Elisa Viladés Palomar
Programa de doctorado: Medicina

3.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que el firmante es coautor
Elisa Viladés, Amaya Pérez-del Palomar, José Cegoñino, Javier Obis, María Satue, Elvira Orduna, Luis Emilio Pablo, Marta Ciprés, Elena Garcia-Martin. Physiological changes in retinal layers thicknesses measured with swept source optical coherence tomography. Plos One 2020. In press

RENUNCIA:
Renuncio a que las publicaciones anteriores puedan ser presentadas como parte de otra tesis doctoral en la modalidad de compendio de publicaciones.
<lugar>, <fecha> Zaragoza                      15-10-2020
 Firma:

Conforme a lo dispuesto en la legislación vigente (Reglamento (UE) 2016/679, de 27 de abril), de protección de datos de carácter personal, le informamos que sus datos pasarán a ser tratados por la Universidad de Zaragoza con la finalidad de tramitar la gestión académica y administrativa de sus estudiantes, así como su participación en actividades y servicios universitarios. Puede ejercer sus derechos de acceso, rectificación, limitación, oposición o portabilidad ante el Gerente de la UZ




## RENUNCIA DE LOS COAUTORES DE LOS TRABAJOS PRESENTADOS COMO PARTE DE UNA TESIS DOCTORAL EN LA MODALIDAD DE COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Cavaliere	Nombre: Carlo	
DNI/Pasaporte/NIE: 53650642Z	Teléfono: 655111298	Correo electrónico: carlo.cavaliere@uah.es

2.- Tesis Doctoral
Título: EVALUACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA Y NEURO-OFTALMOLÓGICA CON TECNOLOGÍA DE ÚLTIMA GENERACIÓN EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE
Autor: Elisa Viladés Palomar
Programa de doctorado: Medicina

3.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que el firmante es coautor
Carlo Cavaliere, Elisa Vilades, María Concepción Alonso-Rodríguez, María Jesús Rodrigo, Luis Emilio Pablo, Juan Manuel Miguel, Elena López-Guillén, Eva María Sánchez Morla, Luciano Boquete, Elena García-Martin. Computer-aided diagnosis of multiple sclerosis using a support vector machine and optical coherence tomography features. Sensors (Basel) 2019;19(23):5323

RENUNCIA:
Renuncio a que las publicaciones anteriores puedan ser presentadas como parte de otra tesis doctoral en la modalidad de compendio de publicaciones.
<lugar>, <fecha> Barcelona 15/10/2020
Firma: 

Conforme a lo dispuesto en la legislación vigente (Reglamento (UE) 2016/679, de 27 de abril), de protección de datos de carácter personal, le informamos que sus datos pasarán a ser tratados por la Universidad de Zaragoza con la finalidad de tramitar la gestión académica y administrativa de sus estudiantes, así como su participación en actividades y servicios universitarios. Puede ejercer sus derechos de acceso, rectificación, limitación, oposición o portabilidad ante el Gerente de la UZ.

## Apéndice IV: Consentimientos

Evaluación de la función visual y de la capa de fibras nerviosas de la retina.

Versión 2, fecha de 12 / Febrero /2012.

### **HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE**

Se le va a realizar una evaluación de su función visual. Con el objetivo de mejorar continuamente la calidad asistencial a los pacientes, los Servicios de Oftalmología, Neurología y Neurofisiología del Hospital Miguel Servet de Zaragoza están desarrollando un estudio de investigación en que se pretende cuantificar la afectación visual en pacientes del área sanitaria.

Para ello se le llevarán a cabo las exploraciones enumeradas a continuación: agudeza visual (que consiste en cuantificar cuántas letras puede usted discriminar a 6 metros de distancia), sensibilidad al contraste (que consiste en cuantificar cuántas letras puede usted discriminar a 1 metro de distancia variando la luminosidad de las letras), visión de colores (que consiste en cuantificar si es capaz de distinguir los colores entre si), Tomografía de coherencia óptica (que consiste en una fotografía del ojo que nos permite observar sus estructuras), Potenciales evocados visuales y Electro-retinograma (que son dos pruebas en las que usted deberá mirar un punto fijo en una pantalla mientras le registramos su actividad cerebral con un casco colocado sobre su cabeza). Todas estas exploraciones son no invasivas ni dolorosas y se llevarán a cabo en las consultas externas del Hospital Miguel Servet, en una revisión a cargo del Servicio de Oftalmología y otra del Servicio de Neurofisiología. Estas pruebas nos permiten evaluar el estado de su sistema visual y detectar la presencia de patologías del mismo en caso de que existan, posibilitando así su posterior tratamiento si se considerara adecuado.

Su participación en este estudio no implica la realización de exploraciones complementarias que no le serían realizadas en caso de no participar en el mismo, sino la aceptación de que, de modo absolutamente confidencial, sean recogidos y utilizados los resultados de sus exploraciones con el objetivo de dicho proyecto de investigación. Su participación es voluntaria y puede abandonar el estudio en el momento en que lo decida, sin que esto tenga repercusión alguna en su atención sanitaria futura.

El equipo investigador encargado de dicho estudio serán las doctoras Elena García Martín y María Pilar Bambó Rubio, oftalmólogas del Hospital Miguel Servet de Zaragoza; con las que podrá contactar a lo largo del estudio en cualquier momento que así lo desee, acudiendo al servicio de oftalmología de dicho hospital.

Evaluación de la función visual y de la capa de fibras nerviosas de la retina.

Versión 2, fecha de 12 / Febrero /2012.

## **CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Título del proyecto: “Evaluación de la función visual y de la capa de fibras nerviosas de la retina”.

Yo, ..... (nombre y apellidos) he leído la hoja de información que se me ha entregado, he podido hacer preguntas sobre el estudio, habiendo recibido suficiente información sobre el estudio.

Comprendo que mi participación es voluntaria y que puedo retirarme del estudio en el momento en que lo desee, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

De este modo, presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y para que mis datos clínicos sean revisados para los fines del mismo, consciente de que este consentimiento es revocable.

Firma del paciente

DNI:

Fecha:

Firma del representante legal:

DNI:

Fecha:

Como investigador del estudio he explicado la naturaleza y el propósito del mismo al paciente mencionado.

Firma del investigador

Nº Colegiado:

Fecha:



Apéndice V: Documentación del Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón (CEICA)



**Informe Dictamen Favorable  
Proyecto Investigación Biomédica**

C.P. - C.I. PI12/0015

15 de febrero de 2012

/CEIC Aragón (CEICA)

Dña. María González Hinjos, Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

**CERTIFICA**

1º. Que el CEIC Aragón (CEICA) en su reunión del día 15/02/2012, Acta Nº 03/2012 ha evaluado la propuesta del investigador referida al estudio:

**Título: Evaluación de los tratamientos para la Esclerosis Múltiple y de su impacto sobre la calidad de vida del paciente mediante el análisis periódico de la capa de fibras nerviosas de la retina.**

**Versión Protocolo: 2011**

**Versión hoja de información al paciente y consentimiento informado**

V2, de 12/02/2012

1º. Considera que

- El proyecto se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

2º. Por lo que este CEIC emite un **DICTAMEN FAVORABLE**.

3º. Este CEIC acepta que dicho estudio sea realizado en los siguientes Centros por los Investigadores:

Luis Emillo Pablo Júlvez

Lo que firmo en Zaragoza, a 15 de febrero de 2012

Fdo:



**COMPOSICIÓN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE ARAGÓN**

Dra. María González Hinjos, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón,

**CERTIFICA**

1º En la reunión celebrada el día 15 de febrero de 2012, correspondiente al Acta nº CP03/2012, se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación vigente -Real Decreto 223/2004 y Decreto 26/2003 del Gobierno de Aragón, modificado por el Decreto 292/2005- para que la decisión del citado CEIC sea válida.

3º El CEIC de Aragón, tanto en su composición, como en sus PNT, cumple con las normas de BPC.

4º La composición del CEIC de Aragón en la citada fecha, era la siguiente:

- **Presidente:** Cesar Loris Pablo; Médico. Servicio de Pediatría. Hospital Universitario Miguel Servet. Representante de Comisión de Investigación.
- **Vicepresidente:** Carlos Aibar Remón; Médico. Servicio de Medicina Preventiva y Salud Pública. Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa. Profesional Sanitario experto en epidemiología clínica.
- **Secretaria:** María González Hinjos; Farmacéutica.
- Pilar Comet Cortés; Enfermera. Unidad Mixta de Investigación. Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa.
- Marina Heredia Ríos; Representante de las Organizaciones de Consumidores y Usuarios.
- Gabriel Hernández Delgado; Médico. Servicio de Radiología. Hospital Universitario Miguel Servet. Representante de Comisión de Investigación.
- Angela Idoipe Tomás; Farmacéutica. Servicio de Farmacia. Hospital Universitario Miguel Servet. Farmacéutica de Hospital.
- María Jesús Lallana Álvarez. Farmacéutica de Atención Primaria de Zaragoza Sector III.
- Jesús Magdalena Bello; Médico. Centro de Salud de Azuara. Médico con labor asistencial y representante del Comité de Ética Asistencial del Área de Atención Primaria II y V.
- Mariano Mateo Arrizabalaga; Médico. Servicio de Farmacología Clínica. Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa.
- Elisa Moreu Carbonell; Jurista. Profesora de la Facultad de Derecho, Universidad de Zaragoza.
- Javier Perfecto Ejarque; Médico. Centro de Salud Arrabal. Médico con labor asistencial.
- Alexandra Prados Torres; Médico. Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud. Representante de Comisión de Investigación.
- José Puzo Foncillas; Médico. Servicio de Bioquímica. Hospital General San Jorge. Representante de Comisión de Investigación.
- Mónica Torrijos Tejada; Médico. Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud.

Para que conste donde proceda, y a petición del promotor,

Zaragoza, a 15 de febrero de 2012

  
Firmado: María González Hinjos



## Apéndice VI: Cuestionarios proporcionados

Copyright© 1995, University of California, Los Angeles

### **CALIDAD DE VIDA EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE (MSQOL-54)**

#### INSTRUCCIONES:

Esta encuesta recoge datos sobre su salud y actividades de la vida diaria.

Conteste las preguntas metiendo en un círculo el número adecuado (1, 2, 3,...).

Si duda sobre alguna pregunta, por favor, escoja la mejor opción para usted y escriba algún comentario o aclaración en el margen si lo considera necesario.

Puede preguntar al asistente que le ha entregado esta encuesta si tiene alguna duda.

1. En general, considera que su salud es (circule un número):

- Excelente.....1
- Muy buena.....2
- Buena.....3
- Regular.....4
- Escasa.....5

2. Comparado con el año pasado, ¿cómo considera su salud en este momento?

(circule un número):

- Mucho mejor ahora que hace un año..... 1
- Algo mejor ahora que hace un año..... 2
- Más o menos similar..... 3
- Algo peor ahora que hace un año..... 4
- Mucho peor ahora que hace un año..... 5

3-12. Las siguientes preguntas son en relación con actividades que usted hace en un día típico. ¿Su estado de salud limita la realización de estas actividades? Si es así, ¿cuánto? (circule 1, 2 o 3 en cada línea)

	Sí, me limita mucho	Sí, me limita un poco	No me limita nada
3. Actividades vigorosas, como correr, levantar pesos altos o participar en deportes extenuantes	1	2	3
4. Actividades moderadas, como mover una mesa, pasar la aspiradora, jugar a los bolos o al golf	1	2	3
5. Llevar las bolsas de la compra	1	2	3
6. Subir varios pisos de escaleras	1	2	3
7. Subir un piso de escaleras	1	2	3
8. Inclinarsse, agacharse o arrodillarse	1	2	3
9. Caminar más de 1,5 km	1	2	3
10. Caminar varias manzanas / bloques de edificios	1	2	3
11. Caminar una manzana / bloque de edificios	1	2	3
12. Bañarse y vestirse usted mismo	1	2	3

13-16. En las últimas 4 semanas, ¿ha tenido usted alguno de los siguientes problemas con su trabajo o en otras actividades de la vida diaria como resultado de su estado de salud? (circule 1 o 2 en cada línea).

	Sí	No
13. ¿Ha reducido el tiempo que pasa trabajando o realizando otras actividades?	1	2
14. ¿Ha logrado menos de lo que le gustaría en su trabajo u otras actividades?	1	2
15. ¿Está limitado de alguna forma en su trabajo u otras actividades?	1	2
16. ¿Ha tenido dificultad para realizar su trabajo u otras actividades? (por ejemplo, supone un esfuerzo extra)	1	2

17-19. En las últimas 4 semanas, ¿ha tenido usted alguno de los siguientes problemas con su trabajo o en otras actividades de la vida diaria como resultado de su estado emocional? (como sentirse deprimido o ansioso) (circule 1 o 2 en cada línea).

	Sí	No
17. ¿Ha reducido el tiempo que pasa trabajando o realizando otras actividades?	1	2
18. ¿Ha logrado menos de lo que le gustaría en su trabajo u otras actividades?	1	2
19. ¿No realizó el trabajo u otras actividades con el mismo cuidado o atención que habitualmente?	1	2

20. En las últimas 4 semanas, ¿ha notado que su salud física o su estado emocional hayan interferido en sus actividades sociales con su familia, amigos, vecinos o grupos de gente? (circule un número)

- Para nada .....1
- Levemente .....2
- Moderadamente .....3
- Bastante .....4
- Mucho.....5

**Dolor**

21. ¿Cuánto dolor físico ha sentido durante las últimas 4 semanas? (circule un número)

- Ninguno.....1
- Muy leve.....2
- Leve.....3
- Moderado.....4
- Severo.....5
- Muy severo.....6

22. En las últimas 4 semanas, ¿cuánto ha interferido el dolor físico en su trabajo normal (incluido el trabajo fuera de casa o el trabajo de labores del hogar)? (circule un número)

- Para nada.....1
- Levemente .....2
- Moderadamente .....3
- Bastante .....4
- Mucho.....5

23-32. Estas preguntas son sobre cómo se siente y cómo le han ido las cosas en las últimas 4 semanas. Para cada pregunta, marque la respuesta que más se acerque al modo en el que usted se ha estado sintiendo.

Circule un número en cada línea.

¿Cuánto tiempo durante las últimas 4 semanas...?

	Todo el tiempo	La mayoría del tiempo	Gran parte del tiempo	Algo de tiempo	Un poco de tiempo	Nada de tiempo
23. ¿Se ha sentido lleno de ánimo?	1	2	3	4	5	6
24. ¿Se ha sentido muy nervioso?	1	2	3	4	5	6
25. ¿Se ha sentido tan desanimado que nada podría subirle el ánimo?	1	2	3	4	5	6
26. ¿Se ha sentido tranquilo y pacífico?	1	2	3	4	5	6
27. ¿Se ha sentido usted lleno de energía?	1	2	3	4	5	6
28. ¿Se ha sentido descorazonado?	1	2	3	4	5	6
29. ¿Se ha sentido desgastado?	1	2	3	4	5	6
30. ¿Se ha sentido una persona feliz?	1	2	3	4	5	6
31. ¿Se ha sentido cansado?	1	2	3	4	5	6
32. ¿Se ha sentido bien descansado al despertarse por la mañana?	1	2	3	4	5	6

33. En las últimas 4 semanas, ¿cuántas veces ha interferido su salud física o su estado emocional en sus actividades sociales (como visitar a un amigo, familiares, etc)? (circule un número)

- Todo el tiempo.....1
- La mayor parte del tiempo.....2
- Algo de tiempo.....3
- Un poco de tiempo.....4
- Nada .....5

### Salud en general

34-37. ¿Cómo de verdaderas o falsas son las siguientes afirmaciones para usted?  
Circule un número en cada línea:

	Totalmente cierto	Muy cierto	No estoy seguro	Muy falso	Totalmente falso
34. Enfermo con más facilidad que otras personas.	1	2	3	4	5
35. Soy tan saludable como cualquier otra persona que conozca.	1	2	3	4	5
36. Supongo que mi salud va a empeorar.	1	2	3	4	5
37. Mi salud es excelente.	1	2	3	4	5

### Angustia o preocupación por su salud

38-41. ¿Cuánto tiempo durante las últimas 4 semanas..?  
(Circule un número de cada línea)

	Todo el tiempo	La mayoría del tiempo	Gran parte del tiempo	Algo de tiempo	Un poco de tiempo	Nada de tiempo
38. ¿Se ha sentido desalentado por sus problemas de salud?	1	2	3	4	5	6
39. ¿Se ha sentido frustrado por sus problemas de salud?	1	2	3	4	5	6
40. ¿Ha sentido que su salud es una preocupación en su vida?	1	2	3	4	5	6
41. ¿Se ha sentido sobrecargado por sus problemas de salud?	1	2	3	4	5	6

### Función cognitiva

42-45. ¿Cuánto tiempo durante las últimas 4 semanas...?  
(Circule un número de cada línea)

	Todo el tiempo	La mayoría del tiempo	Gran parte del tiempo	Algo de tiempo	Un poco de tiempo	Nada de tiempo
42. ¿Ha sentido dificultades para concentrarse o para pensar?	1	2	3	4	5	6
43. ¿Ha sentido dificultades para mantener la concentración en una actividad muy larga?	1	2	3	4	5	6
44. ¿Ha tenido problemas con su memoria?	1	2	3	4	5	6
45. ¿Han notado sus familiares o amigos que usted tiene problemas con su memoria o su concentración?	1	2	3	4	5	6

### Función sexual

46-50. Las siguientes cuestiones son sobre su función sexual y su satisfacción con su vida sexual.

Por favor, conteste con la mayor exactitud posible en relación a las últimas 4 semanas solamente.

¿Cuántos problemas ha tenido en las siguientes situaciones en las últimas 4 semanas? (circule un número en cada línea)

<b>HOMBRES</b>	Ningún problema	Pocos problemas	Algunos problemas	Muchos problemas
46. Falta de interés sexual	1	2	3	4
47. Dificultad en obtener o mantener la erección	1	2	3	4
48. Dificultad en llegar al orgasmo	1	2	3	4
49. Capacidad para satisfacer a su compañero sexual	1	2	3	4

<b>MUJERES</b>	Ningún problema	Pocos problemas	Algunos problemas	Muchos problemas
46. Falta de interés sexual	1	2	3	4
47. Escasa lubricación	1	2	3	4
48. Dificultad en llegar al orgasmo	1	2	3	4
49. Capacidad para satisfacer a su compañero sexual	1	2	3	4

50. De media, ¿cómo de satisfecho está usted con su función sexual? (circule un número):

- Muy satisfecho..... 1
- Moderadamente satisfecho..... 2
- Ni satisfecho ni insatisfecho..... 3
- Moderadamente insatisfecho..... 4
- Muy insatisfecho..... 5

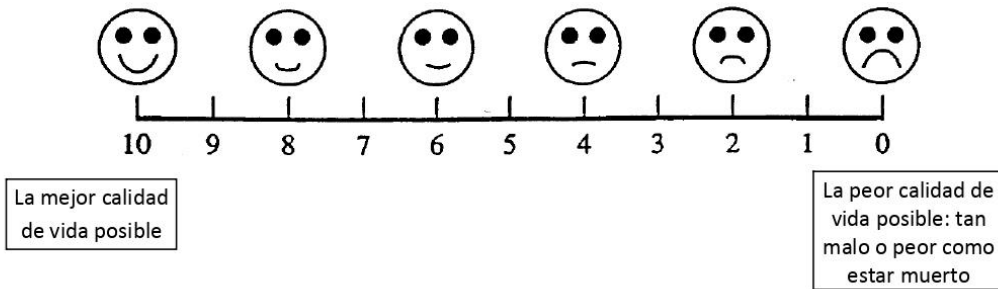
51. En las últimas 4 semanas, ¿con cuánta frecuencia ha interferido su función vesical o intestinal con su vida social normal con familiares, amigos, vecinos o en grupo? (circule un número):

- No ha interferido nada ..... 1
- Ha interferido poco..... 2
- Ha interferido moderadamente ..... 3
- Ha interferido bastante.....4
- Ha interferido mucho.....5

52. En las últimas 4 semanas, ¿con cuánta frecuencia el dolor le ha interferido para disfrutar de la vida? (circule un número):

- No ha interferido nada ..... 1
- Ha interferido poco..... 2
- Ha interferido moderadamente ..... 3
- Ha interferido bastante.....4
- Ha interferido mucho.....5

53. Como media, ¿cómo calificaría su calidad de vida? (circule un número en la escala de abajo):



54. ¿Cuál describe mejor cómo se siente con su vida en general? (circule un número):

- Muy infeliz ..... 1
- Infeliz..... 2
- Bastante insatisfecho ..... 3
- Más o menos igual de satisfecho que insatisfecho..... 4
- Bastante satisfecho..... 5
- Contento ..... 6
- Encantado ..... 7

**GRACIAS POR SU COLABORACIÓN  
EL RESTO DE HOJAS SERÁN RELLENADAS POR EL MÉDICO**

\*\*\*\*\*



## Scoring Forms for Multiple Sclerosis Quality of Life (MSQOL) -54

**Table 1**  
MSQOL-54 Scoring Form

**Table 2**  
MSQOL-54 Physical Health Composite Score

**Table 3**  
MSQOL-54 Mental Health Composite Score

**MSQOL-54 Scoring Form**

**Table 1**

Scale/Item Number	Response						Subtotal	Final Score 0-100 point scale
	1	2	3	4	5	6		
<b>Physical Health</b>								
3.	0	50	100				_____	
4.	0	50	100				_____	
5.	0	50	100				_____	
6.	0	50	100				_____	
7.	0	50	100				_____	
8.	0	50	100				_____	
9.	0	50	100				_____	
10.	0	50	100				_____	
11.	0	50	100				_____	
12.	0	50	100				_____	
							Total: _____ + 10 = _____	
<b>Role limitations due to physical problems</b>								
13.	0	100					_____	
14.	0	100					_____	
15.	0	100					_____	
16.	0	100					_____	
							Total: _____ + 4 = _____	
<b>Role limitations due to emotional problems</b>								
17.	0	100					_____	
18.	0	100					_____	
19.	0	100					_____	
							Total: _____ + 3 = _____	
<b>Pain</b>								
21.	100	80	60	40	20	0	_____	
22.	100	75	50	25	0		_____	
52.	100	75	50	25	0		_____	
							Total: _____ + 3 = _____	
<b>Emotional well-being</b>								
24.	0	20	40	60	80	100	_____	
25.	0	20	40	60	80	100	_____	
26.	100	80	60	40	20	0	_____	
28.	0	20	40	60	80	100	_____	
30.	100	80	60	40	20	0	_____	
							Total: _____ + 5 = _____	
<b>Energy</b>								
23.	100	80	60	40	20	0	_____	
27.	100	80	60	40	20	0	_____	
29.	0	20	40	60	80	100	_____	
31.	0	20	40	60	80	100	_____	
32.	100	80	60	40	20	0	_____	
							Total: _____ + 5 = _____	
<b>Table 1 (cont.)</b>								
Scale/Item Number	Response						Subtotal	Final Score 0-100 point
	1	2	3	4	5	6		

**Health Perceptions**

1.	100	75	50	25	0
34.	0	25	50	75	100
35.	100	75	50	25	0
36.	0	25	50	75	100
37.	100	75	50	25	0

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Total: \_\_\_\_\_ ÷ 5 = \_\_\_\_\_

**Social function**

20.	100	75	50	25	0
33.	0	25	50	75	100
51.	100	75	50	25	0

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Total: \_\_\_\_\_ ÷ 3 = \_\_\_\_\_

**Cognitive function**

42.	0	20	40	60	80	100
43.	0	20	40	60	80	100
44.	0	20	40	60	80	100
45.	0	20	40	60	80	100

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Total: \_\_\_\_\_ ÷ 4 = \_\_\_\_\_

**Health distress**

38.	0	20	40	60	80	100
39.	0	20	40	60	80	100
40.	0	20	40	60	80	100
41.	0	20	40	60	80	100

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Total: \_\_\_\_\_ ÷ 4 = \_\_\_\_\_

**Sexual function\***

46.	100	66.7	33.3	0
47.	100	66.7	33.3	0
48.	100	66.7	33.3	0
49.	100	66.7	33.3	0

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Total: \_\_\_\_\_ ÷ 4 = \_\_\_\_\_

**Change in health**

2.	100	75	50	25	0
----	-----	----	----	----	---

\_\_\_\_\_

**Satisfaction with sexual function**

50.	100	75	50	25	0
-----	-----	----	----	----	---

\_\_\_\_\_

**Overall quality of life**

	Response						
	1	2	3	4	5	6	7

53.	(multiply response by 10)						
54.	0	16.7	33.3	50	66.7	83.3	100

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Total: \_\_\_\_\_ ÷ 2 = \_\_\_\_\_

Note: The total number of items in each scale is listed as the divisor for each subtotal. However, due to missing data, the divisor might actually be less than that if not every item within a given scale has been answered. For example, if item 38 in the Health Distress scale was left blank and the other 3 items in the scale were answered, then the "Total" score for Health Distress would be divided by '3' (instead of '4') to obtain the "Final Score."

\* Males and females can be combined in the analysis even though question 47 is different for the two groups. The scale scores can also be reported separately for males and females.

**Table 2**  
**Formula for calculating MSQOL-54 Physical Health Composite Score**

<b>MSQOL-54 Scale</b>	<b>Final Scale Score</b>	<b>x</b>	<b>Weight</b>	<b>=</b>	<b>Subtotal</b>
Physical function	_____	x	.17	=	_____ (a)
Health perceptions	_____	x	.17	=	_____ (b)
Energy/fatigue	_____	x	.12	=	_____ (c)
Role limitations - physical	_____	x	.12	=	_____ (d)
Pain	_____	x	.11	=	_____ (e)
Sexual function	_____	x	.08	=	_____ (f)
Social function	_____	x	.12	=	_____ (g)
Health distress	_____	x	.11	=	_____ (h)
PHYSICAL HEALTH COMPOSITE: Sum subtotals (a) through (h) =					_____

**Table 3**  
**Formula for calculating MSQOL-54 Mental Health Composite Score**

<b>MSQOL-54 Scale</b>	<b>Final Scale Score</b>	<b>x</b>	<b>Weight</b>	<b>=</b>	<b>Subtotal</b>
Health distress	_____	x	.14	=	_____ (a)
Overall quality of life	_____	x	.18	=	_____ (b)
Emotional well-being	_____	x	.29	=	_____ (c)
Role limitations - emotional	_____	x	.24	=	_____ (d)
Cognitive function	_____	x	.15	=	_____ (e)
MENTAL HEALTH COMPOSITE: Sum subtotals (a) through (e) =					_____

