

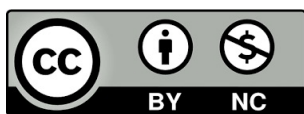
Beatriz Cordon Ciordia

# Biomarcadores de esclerosis múltiple basados en tomografía de coherencia óptica, angiografía y electrofisiología

Director/es

García Martín, Elena  
Altemir Gómez, Irene

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



Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Tesis Doctoral

BIOMARCADORES DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE  
BASADOS EN TOMOGRAFÍA DE COHERENCIA  
ÓPTICA, ANGIOGRAFÍA Y ELECTROFISIOLOGÍA

Autor

Beatriz Cordón Ciordia

Director/es

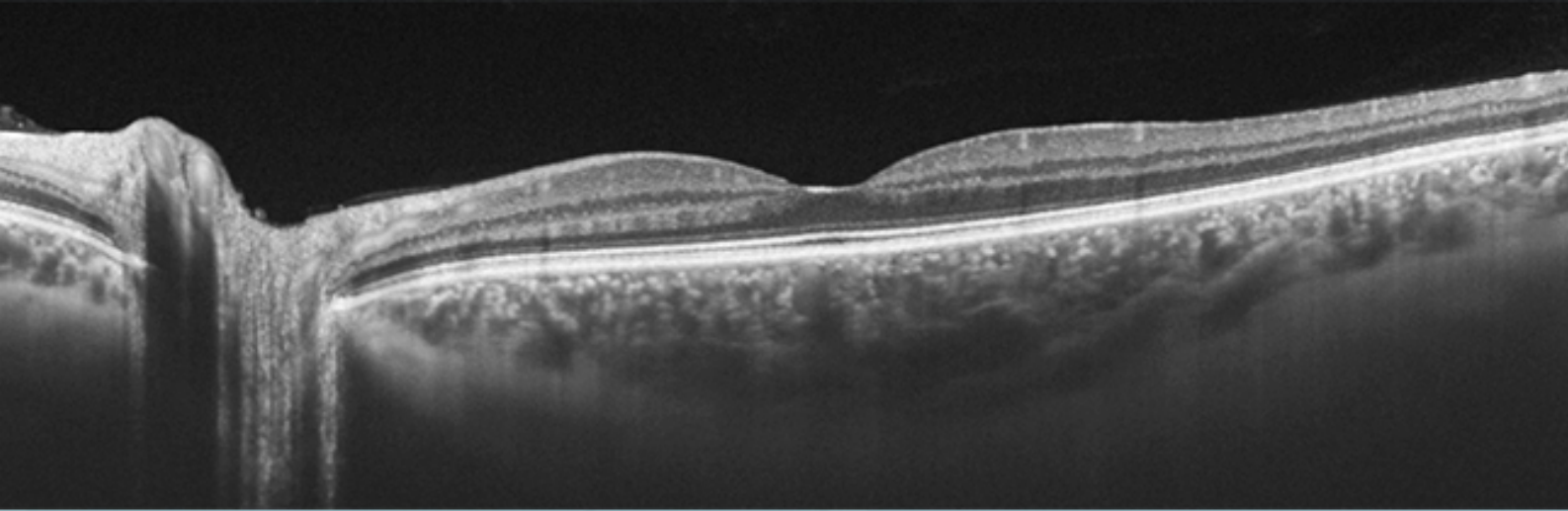
García Martín, Elena  
Altemir Gómez, Irene

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

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y Biotecnológicas

2023





## TESIS DOCTORAL

### **Biomarcadores de esclerosis múltiple basados en tomografía de coherencia óptica, angiografía y electrofisiología**

Multiple sclerosis biomarkers based on optical coherence tomography, angiography, and electrophysiology.

**Beatriz Cordon Ciordia**

Directores de tesis

**Dra. Elena García Martín**  
**Dra. Irene Altemir Gómez**

Servicio de Oftalmología  
Hospital Universitario Miguel Servet  
Universidad de Zaragoza.  
AÑO 2023



**Universidad Zaragoza**



# UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y BIOTECNOLÓGICAS

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y Biotecnológicas



## TESIS DOCTORAL

Biomarcadores de esclerosis múltiple basados en tomografía de coherencia  
óptica, angiografía y electrofisiología



MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Beatriz Cordón Ciordia**

Directores

**Elena García Martín**

**Irene Altemir Gómez**

Zaragoza, 2023

Universidad de Zaragoza

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Doctorado de Ciencias Biomédicas y Biotecnológicas

Servicio de Oftalmología





Universidad de Zaragoza

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Doctorado de Ciencias Biomédicas y Biotecnológicas

Servicio de Oftalmología

Trabajo de investigación presentado por la graduada en óptica y optometría,  
Beatriz Cordón Ciordia, para optar al grado de doctora.

**DIRECTORES:**

**Dra. Elena García Martín**

*Servicio de Oftalmología. Hospital Universitario Miguel Servet. Universidad de Zaragoza*

**Dra. Irene Altemir Gómez**

*Servicio de Oftalmología. Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza*

A mis padres y hermano

A David



La presente tesis doctoral ha sido estructurada siguiendo la normativa para tesis por compendio de publicaciones. A continuación, se detallan los cuatro artículos previamente publicados que constituyen el cuerpo de la tesis;

1. Del Castillo MO, Cordon B, Sánchez Morla EM, Viladés E, Rodrigo MJ, Cavaliere C, Boquete L, García-Martin E. **Identification of clusters in multifocal electrophysiology recordings to maximize discriminant capacity (patients vs. control subjects)**. Doc Ophthalmol. 2020 ;140(1):43-53. doi: 10.1007/s10633-019-09720-8. PMID: 31538293.
2. De Santiago L, Ortiz del Castillo M, García-Martin E, Rodrigo MJ, Sánchez Morla EM, Cavaliere C, Cordon B, Miguel JM, López A, Boquete L. **Empirical mode decomposition-based filter applied to multifocal electroretinograms in multiple sclerosis diagnosis**. Sensors. 2020; 20(1):7. doi y PMID
3. Cordon B, Viladés E, Orduna E, Satue M, Perez-Velilla J, Sebastian B, Polo V, Larrosa JM, Pablo LE, Garcia-Martin E. **Angiography with optical coherence tomography as a biomarker in multiple sclerosis**. PLoS One. 2020;15(12): e0243236. doi: 10.1371/journal.pone.0243236. PMID: 33290417
4. Viladés E, Cordon B, Perez-Velilla J, Orduna E, Satué M, Polo V, Sebastian B, Larrosa JM, Júlvez LP, Garcia-Martin E. **Evaluation of multiple sclerosis severity using new oct tool**. PLoS One. 2023. (Accepted 03/07/2023. Pending publication)



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

Certifica:

Que el trabajo de investigación titulado “Biomarcadores de esclerosis múltiple basados en tomografía de coherencia óptica, angiografía y electrofisiología” que presenta BEATRIZ CORDÓN CIORDIA, Graduada en el grado de óptica y optometría, para optar al GRADO DE DOCTOR, fue realizado bajo mi dirección y reúne las condiciones necesarias para su defensa como tesis por compendio de publicaciones.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente en Zaragoza, a 04 de julio de 2023.

Fdo. Dra. Elena García Martín

D<sup>a</sup>. IRENE ALTEMIR GÓMEZ, Doctora en Óptica y Optometría, en el Hospital Universitario Miguel Servet, y profesora asociada de la Universidad de Zaragoza.

Certifica:

Que el trabajo de investigación titulado “Biomarcadores de esclerosis múltiple basados en tomografía de coherencia óptica, angiografía y electrofisiología” que presenta BEATRIZ CORDÓN CIORDIA, Graduada en el grado de óptica y optometría, para optar al GRADO DE DOCTOR, fue realizado bajo mi dirección y reúne las condiciones necesarias para su defensa como tesis por compendio de publicaciones.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente en Zaragoza, a 04 de julio de 2023.

Fdo. Dra. Irene Altemir Gómez





## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar y de forma muy especial, me gustaría agradecer a la Dra. Elena García Martín por todos sus consejos y orientaciones en la realización de este trabajo. De manera personal, quiero expresarle todo mi agradecimiento por su dedicación, su profesionalidad y su buen hacer, tanto en el mundo de la oftalmología como en el de la investigación. También a la Dra. Irene Altemir, por su ayuda y apoyo siempre que lo he necesitado, gracias por confiar en mí para desarrollar mi carrera profesional en el ámbito clínico.

Al Grupo de Ingeniería Biomédica de la Universidad de Alcalá de Henares, Luciano Boquete, parte del trabajo es gracias a ellos, gracias por vuestra profesionalidad científica y la capacidad de ayudarme durante este trabajo.

Al área de oftalmología del Hospital Miguel Servet y Hospital Provincial Nuestra Señora de Gracia, gracias por darme la oportunidad de seguir aprendiendo cada día con vosotros. En especial gracias al Dr. Luis Pablo Júlvez por su trato, preocupación y confianza en este y otros proyectos. También al Dr. Vicente Polo Llorens y Dr. José Manuel Larrosa Póves que desde el principio me acogieron con mucho cariño en su equipo.

A toda la gente que me ha acompañado durante estos años, compañeros y amigos de trabajo que hacen que los días sean más divertidos y me escuchan cuando lo necesito. En particular, gracias a Elisa, amiga y guía en este trabajo.

A todos mis amigos, que consiguieron darme todo el afecto necesario para disfrutar del día a día. Gracias por estar a mi lado siempre y por darme los mejores consejos. Sobre todo, a mis amigas de siempre, con quienes he crecido desde pequeña y a pesar de en los últimos años estar lejos, darme siempre ese abrazo que me hace sentir en casa.

A mis padres, mis pilares fundamentales, gracias por acompañarme y apoyarme en todos los estudios y la vida entera, pero sobre todo por vuestra capacidad infinita de quererme y cuidarme. Todo lo que soy y todo lo que consigo es gracias a vosotros.

A mi hermano, me ayudas más de lo que te imaginas, gracias por estar siempre que te necesito a mi lado, por escucharme y por regalarme siempre una sonrisa y un abrazo.

Y a David, mi gran apoyo en la vida. Eres quien día a día me ha acompañado en todo este proceso. GRACIAS. Por ayudarme, por comprenderme y por calmarme durante estos años, pero sobre todo gracias por hacer mi vida fácil, divertida y maravillosa. Te quiero.

Mi agradecimiento final, a todas las personas con Esclerosis múltiple que se prestaron a participar en esta tesis. Ellos son los protagonistas de este trabajo y su colaboración, fundamental para avanzar en la investigación de esta enfermedad, que ojalá podamos algún día superar.



# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS .....	12
ABREVIATURAS .....	15
RELACIÓN DE PUBLICACIONES QUE COMPONEN LA TESIS Y JUSTIFICACIÓN DE LA CONTRIBUCIÓN DEL DOCTORANDO EN CADA PUBLICACIÓN.....	17
INTRODUCCIÓN .....	20
1.1. ESCLEROSIS MÚLTIPLE .....	20
1.1.1. <i>Historia y definición.</i> .....	20
1.1.2. <i>Epidemiología.</i> .....	22
1.1.3. <i>Etiología</i> .....	24
1.1.4. <i>Patogenia</i> .....	24
1.1.5. <i>Características clínicas de la enfermedad</i> .....	25
1.1.6. <i>Síntomas y signos generales de la enfermedad.</i> .....	26
1.1.7. <i>Formas de evolutivas de la enfermedad.</i> .....	31
1.1.8. <i>Pruebas diagnósticas de la enfermedad</i> .....	28
1.2. LA RETINA.....	32
1.2.1. <i>Anatomía y estructura de la retina</i> .....	33
1.2.2. <i>Vascularización de la retina</i> .....	36
1.2.3. <i>Nervio óptico</i> .....	37
1.3. LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE Y SU RELACIÓN CON LAS ESTRUCTURAS OCULARES. ....	39
1.3.1. <i>Alteraciones visuales en esclerosis múltiple</i> .....	39
1.3.2. <i>Estructura retiniana y su relación con la esclerosis múltiple</i> .....	40
JUSTIFICACIÓN DEL TEMA.....	43
HIPÓTESIS .....	46
OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN .....	48
4.1 OBJETIVO PRIMARIO .....	48
4.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS .....	48
MATERIAL Y MÉTODOS .....	51
5.1 PROCEDIMIENTO .....	51
5.2 MUESTRA .....	51
5.3 PROTOCOLO EXPLORATORIO .....	52
5.3.1 <i>Evaluación neurológica</i> .....	52

5.3.2	<i>Evaluación oftalmológica</i> .....	53
5.3.3	<i>Recogida y análisis de datos</i> .....	64
5.3.4	<i>Herramientas matemáticas</i> .....	65
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....		<b>68</b>
PRIMER ARTICULO .....		69
SEGUNDO ARTICULO .....		81
TERCER ARTICULO .....		98
CUARTO ARTICULO .....		114
<b>DISCUSIÓN UNIFICADA</b> .....		<b>143</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....		<b>148</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....		<b>151</b>
<b>APÉNDICES</b> .....		<b>161</b>
APÉNDICE I. FACTOR DE IMPACTO DE LAS REVISTAS Y ÁREAS TEMÁTICAS. ....		162
APÉNDICE II. RENUNCIA DE LOS COAUTORES DE LOS TRABAJOS PRESENTADOS COMO PARTE DE UNA TESIS DOCTORAL EN LA MODALIDAD DE COMPENDIO DE PUBLICACIONES. ....		163
APÉNDICE III. DOCUMENTACIÓN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE ARAGÓN (CEICA).....		164
APÉNDICE IV. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA SUJETOS PARTICIPANTES EN LA BASE DE DATOS. ....		166
APÉNDICE V. EXPANDED DISABILITY STATUS SCALE (EDSS) DE KURTZKE. ....		169



## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. PREVALENCIA DE DESARROLLO DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE EN EL MUNDO. LA TASA DE INCIDENCIA MÁS ALTA RESIDE EN PAÍSES CON UNA LATITUD POR ENCIMA DE LOS 42°.EXTRAÍDO DE (FEDERACIÓN INTERNACIONAL DE ESCLEROSIS Y (MSIF), 2012) .....	23
FIGURA 2. LESIONES EN FORMA DE ÁREAS DE DESMIELINIZACIÓN EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE VISTAS EN RESONANCIA MAGNÉTICA. EN AMARILLO SEÑADADA LA ZONA DE LESIÓN. DE IZQ. A DCHA. PRIMERA IMAGEN LESIONES YUXTACORTICAL Y PERIVENTRICULAR. IMAGEN CENTRAL; LESIÓN INFRATENTORIAL Y LESIONES MEDULARES EN LA ÚLTIMA IMAGEN. FUENTE DE IMÁGENES ORIGINAL DEL SERVICIO DE NEUROLOGÍA DEL HOSPITAL MIGUEL SERVET, ZARAGOZA. ....	26
FIGURA 3. TIPOS DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE SEGÚN CURSO EVOLUTIVO DE LA ENFERMEDAD FUENTE TABLA ORIGINAL. ....	32
FIGURA 4. FOTOGRAFÍA DE FONDO DE OJO CON LAS DIFERENTES ESTRUCTURAS INDICADAS. FUENTE ORIGINAL. ....	33
FIGURA 5. DIBUJO DE LAS CAPAS DE LA RETINA. EXTRAÍDO DE (RIORDAN-EVA P, CUNNINGHAM ET, PÉREZ AD, ESPINOSA RLL, 2012) .....	36
FIGURA 6. DERECHA.: IMAGEN IRRIGACIÓN GLOBO OCULAR. IZQUIERDA.: IMAGEN DE LA VASCULARIZACIÓN EN LA RETINA POR LOS DISTINTOS PLEXOS VASCULARES. IMAGEN EXTRAÍDA DE (B. ANAND-APTE, 2010).....	36
FIGURA 7. DIBUJO DE LA ESTRUCTURA DEL NERVIÓ ÓPTICO. EXTRAÍDA DE (KRITZINGER, 1987).....	38
FIGURA 8. ESCALA DE DISCAPACIDAD DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE DE 0 A 10 .EXTRAÍDO DE (KURTZKE, 1983) .....	53
FIGURA 9.OPTOTIPO CAJA RETROILUMINADA ETDRS. FOTO REALIZADA EN EL SERVICIO DE OFTALMOLOGÍA DEL HOSPITAL MIGUEL SERVET, ZARAGOZA. ....	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
FIGURA 10. OPTOTIPO CAJA RETROILUMINADA ETDRS. FOTO REALIZADA EN EL SERVICIO DE OFTALMOLOGÍA DEL HOSPITAL MIGUEL SERVET, ZARAGOZA. ....	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
FIGURA 11. TEST SENSIBILIDAD AL CONTRASTE PELLÍ ROBSON. FOTO REALIZADA EN EL SERVICIO DE OFTALMOLOGÍA DEL HOSPITAL MIGUEL SERVET, ZARAGOZA. ....	55
FIGURA 12. ESQUEMA DE INTERFEROMETRÍA DE BAJA COHERENCIA. LA LUZ DEL SISTEMA SE DIVIDE EN DOS HACES: UNO HACIA LA MUESTRA Y EL OTRO HACIA UN ESPEJO. LA IMAGEN SE OBTIENE AL INTEGRAR LAS CARACTERÍSTICAS DE LA LUZ REFLEJADA DE AMBOS EN EL RECEPTOR. EXTRAÍDO DE (HERRERO-GARIBI ET AL., 2010).....	56
FIGURA 13. IMAGEN TRANSVERSAL DE TOMOGRAFÍA DE COHERENCIA ÓPTICA (B-SCAN) A PARTIR DE CORTES A-SCAN. EXTRAÍDO DE (KRAUS ET AL., 2012) .....	57
FIGURA 14. ANÁLISIS POSTERIOR POLE DE TOMOGRAFÍA DE COHERENCIA ÓPTICA SPECTRALIS. REJILLA DE 64 CELDAS CON VALORES DE ESPESOR DE RETINA TOTAL, CAPA DE FIBRAS NERVIOSAS DE LA RETINA Y CAPA CÉLULAS GANGLIONARES ENCIMA DE MAPA DE COLOR. IMAGEN RECOGIDA EN VISOR SPECTRALIS OCT HEIDELBERG DE LAS CONSULTAS DE OFTALMOLOGÍA DEL HOSPITAL MIGUEL SERVET, ZARAGOZA.....	58
FIGURA 15. ANÁLISIS DE LAS CUATRO CAPAS VASCULARES DE LA TOMOGRAFÍA DE COHERENCIA ÓPTICA SWEPT-SOURCE ANGIO DE TOPCON. EMPEZANDO POR ARRIBA Y DE IZQUIERDA A DERECHA: PLEXO SUPERFICIAL, PLEXO PROFUNDO, CAPA AVASCULAR Y CORIOCAPILAR. ABAJO CORTE TRANSVERSAL INDICADO EN COLOR ROJO EL FLUJO VASCULAR. IMAGEN	

RECOGIDA EN VISOR TRITON OCT DE TOPCON DE LAS CONSULTAS DE OFTALMOLOGÍA DEL HOSPITAL MIGUEL SERVET, ZARAGOZA. ....	60
FIGURA 16. TOPOGRAFÍA DE FOTORRECEPTORES Y CÉLULAS GANGLIONARES EN RETINA HUMANA. LAS BARRAS DE COLORES MUESTRAN CÉLULAS ( $\times 1000$ ) POR $\text{MM}^2$ EN ESCALAS LINEALES PARA A, D, E Y F Y EN ESCALAS NO LINEALES PARA MOSTRAR LOS CONTORNOS DE RETINA PERIFÉRICA EN B Y C. LAS IMÁGENES A, B Y C CORRESPONDEN A UN ÁREA MAYOR DE LA RETINA, MIENTRAS QUE LAS IMÁGENES INFERIORES D, E Y F CORRESPONDEN A UN ÁREA AMPLIADA DE LA FÓVEA. IMAGEN EXTRAÍDA DE (CURCIO Y ALLEN, 1990) .....	61
FIGURA 17. IZQUIERDA.: ONDAS ELECTRORETINOGRAMA. ONDA A Y ONDA B. DERECHA.: ONDAS DE ELECTRORETINOGRAMA MULTIFOCAL. ONDA N Y P. EXTRAÍDO DE (PÉREZ GARCÍA ET AL., 2016).....	62
FIGURA 18. PRESENTACIÓN DE ONDAS, TOPOGRAFÍA Y DISTRIBUCIÓN DE HEXÁGONOS DE IMAGEN TOMADA DEL EQUIPO RETISCAN. A) ONDAS DE CADA UNO DE LOS HEXÁGONOS. B) RESULTADOS EN UN DIAGRAMA DE 3D DE LA DENSIDAD DE RESPUESTA DE CADA HEXÁGONO. ....	63
FIGURA 19. DISPOSITIVO RETIPOINT RETISCAN (ROLAND CONSULTANT, ALEMANIA). EXTRAÍDA DE (ROLAND CONSULT STASCHE & FINGER GMBH, S. F.) .....	64
FIGURA 20. EJEMPLO DE LA OBTENCIÓN DE LA PRIMERA FUNCIÓN MODO INTRÍNSECO (IMF; INTRINSIC MODE FUNCTION), PARA UNA SEÑAL $x(n)$ . IMAGEN EXTRAÍDA DE LA TESIS (ORTIZ DEL CASTILLO, 2019) .....	66
FIGURA 21. MAPA DE ESPESORES DE LA CAPA DE CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA MEDIDO CON PROTOCOLO POSTERIOR POLE DE OCT EN PACIENTE CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE A LA IZQUIERDA Y EN CONTROL SANO A LA DERECHA. SE REPRESENTA CON COLORES CÁLIDOS LAS ZONAS DE MAYOR ESPESOR, Y CON COLORES FRÍOS LAS ZONAS CON MENOR ESPESOR. ....	144
FIGURA 22. DIBUJO RESUMEN ORIGINAL DE RESULTADOS OBTENIDOS EN ARTÍCULOS 3 Y 4. MARCADOS EN COLOR OSCURO LAS ÁREAS DE TOMOGRAFÍA DE COHERENCIA ÓPTICA ANALIZADAS MEDIANTE PROTOCOLO POSTERIOR POLE) CON ADELGAZAMIENTO EN LA CAPA DE FIBRAS NERVIOSAS DE LA RETINA Y EN LA CAPA DE CÉLULAS GANGLIONARES); Y CON FONDO RAYADO LAS ÁREAS DE ANGIOGRAFÍA MEDIADA POR TOMOGRAFÍA DE COHERENCIA ÓPTICA CON MENOR DENSIDAD DE FLUJO VASCULAR. ....	145
FIGURA 23. REPRESENTACIÓN DE CELDAS DE ELECTRORETINOGRAMA MULTIFOCAL CON RESULTADOS SIGNIFICATIVOS EN AMARILLO DE LOS ARTÍCULOS PRESENTADOS. IZQUIERDA: ZONA NASAL INFERIOR CON DIFERENCIA SIGNIFICATIVA DE DISMINUCIÓN DE ONDA EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE FRENTE A SUJETOS SANOS. DERECHA: UNA DE LAS AGRUPACIONES CON MAYOR ÁREA BAJO LA CURVA CON EL MÉTODO ANALIZADO EN LA LATENCIA DE LA ONDA P1. FUENTE DE LA FIGURA ORIGINAL. ....	146





## ABREVIATURAS

EM	Esclerosis Múltiple
EDSS	Escala expandida del Estado de Discapacidad (Expanded Disability Status Scale)
TC	Tomografía computarizada
RM	Resonancia magnética
SNC	Sistema nervioso central
OCT	Tomografía de coherencia óptica
EM-RR	Esclerosis múltiple remitente recurrente
EM-SP	Esclerosis múltiple progresiva secundaria
EM-PP	Esclerosis múltiple primaria progresiva
PE	Potenciales Evocados
LCF	Líquido Cefalorraquídeo
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
ZAF	Zona avascular foveal
MLI	Membrana Limitante Interna
CFNR	Capa de Fibras Nerviosas de la Retina
CFNRp	Capa de Fibras Nerviosas de la Retina peripapilar
CCG	Capa de Células Ganglionares
CPI	Capa Plexiforme Interna
CNI	Capa Nuclear Interna
CPE	Capa Plexiforme Externa
MLE	Membrana Limitante Externa
EPR	Epitelio Pigmentario de la Retina
ACR	Arteria Central de la Retina
ERG	Electrorretinograma
ERG-mf	Electrorretinograma multifocal
EMD	Descomposición empírica en modos (Empirical Mode Decomposition)
IMF	Modos intrínsecos de función (Intrinsic Mode Functions)



## RELACIÓN DE PUBLICACIONES QUE COMPONEN LA TESIS Y JUSTIFICACIÓN DE LA CONTRIBUCIÓN DEL DOCTORANDO EN CADA PUBLICACIÓN.

La presente tesis doctoral ha sido estructurada siguiendo la normativa para 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 y la contribución de la doctoranda:

1. Del Castillo MO, Cordón B, Sánchez Morla EM, Viladés E, Rodrigo MJ, Cavaliere C, Boquete L, García-Martin E. **Identification of clusters in multifocal electrophysiology recordings to maximize discriminant capacity (patients vs. control subjects)**. Doc Ophthalmol. 2020;140(1):43-53. doi: 10.1007/s10633-019-09720-8 PMID: 31538293.

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. Participó en el proceso de corrección y de redacción del artículo encargándose de la parte optométrica.

2. de Santiago L, Ortiz del Castillo M, García-Martin E, Rodrigo MJ, Sánchez Morla EM, Cavaliere C, Cordón B, Miguel JM, López A, Boquete L. **Empirical Mode Decomposition-Based Filter Applied to Multifocal Electroretinograms in Multiple Sclerosis Diagnosis**. Sensors. 2020; 20(1):7.

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. Participó en el proceso de corrección y de redacción del artículo, encargándose de la parte optométrica.

3. Cordon B, Viladés E, Orduna E, Satue M, Perez-Velilla J, Sebastian B, Polo V, Larrosa JM, Pablo LE, García-Martin E. **Angiography with optical coherence tomography as a biomarker in multiple sclerosis**. PLoS One. 2020;15(12): e0243236. doi: 10.1371/journal.pone.0243236. PMID: 33290417.

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.

4. Viladés E, Cordón B, Perez-Velilla J, Orduna E, Satué M, Polo V, Sebastian B, Larrosa JM, Júlvez LP, Garcia-Martin E. **Evaluation of multiple sclerosis severity using new oct tool.** PLoS One. 2023. (Accepted 03/07/2023. Pending publication)

,

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.



# INTRODUCCIÓN

## **1.1. ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

### **1.1.1. Historia y definición.**

Han pasado 155 años desde que se describió oficialmente la enfermedad de Esclerosis Múltiple (EM). Fue el profesor francés Jean-Martin Charcot, conocido como “padre de la neurología” quien, en 1868, interesado en la rara afectación que presentaba su asistenta: temblores, problemas del habla y movimientos anómalos de los ojos, consiguió describir en la autopsia tras su muerte unas placas en el cerebro que podrían tener relación con estos síntomas. Fue el primer científico en reconocer la EM como enfermedad, otorgando el nombre de ‘sclerose en plaques’ (esclerosis en placas) a las placas observadas. Había empezado entonces un periodo de investigación acerca de la EM que todavía en nuestros días aún perdura. (Charcot, 1892)

Años más tarde, en el siglo XIX, esta enfermedad ya había traspasado fronteras y era investigada por médicos no solo europeos sino también americanos. En 1878 en Estados Unidos, Edward Seguin fue quien introdujo el término de “esclerosis múltiple”. (Moreira et al., 2002) Actualmente es el término más empleado en la bibliografía médica, ya que incluye dos grandes características definitorias de esta enfermedad: la presencia de múltiples lesiones en el sistema nervioso central (SNC) y, la existencia común de múltiples episodios de disfunción neurológica.

Todavía se conocía muy poco acerca de la enfermedad, la única información que en ese momento se sabía con certeza era que afectaba más a las mujeres que a los hombres. Fue el doctor escocés James Dawson quien describió la inflamación de los vasos sanguíneos cerebrales y los daños en la mielina del cerebro de las personas afectadas. Poco tiempo después, en 1925, Edgar Douglas demostró que esas afectaciones de mielina eran las responsables de provocar errores en la transmisión de la información a través de los axones neuronales. (Rolak, 2003) En nuestro país, Pío del Río Hortega, había descubierto los oligodendrocitos, células encargadas de la síntesis de

mielina. Los síntomas de la EM dejaban de ser un fenómeno considerado aleatorio y pasaron a ser justificadas gracias a estas investigaciones pioneras. (Tremblay et al., 2015)

Pero ¿cuál era la causa de este daño en la mielina que recubre las células nerviosas? Durante la década de 1930, el doctor Thomas Rivers, demostró que los síntomas de la EM se podrían reproducir si se obligaba a que el sistema inmune atacara a la mielina. Este avance hizo que años más tarde probaran fármacos que actuaran en el sistema inmunológico y permitieran controlar los síntomas. (Rolak, 2003)

La primera beca destinada a la investigación de la EM fue concedida al doctor Elvin Kabat, de la Universidad de Columbia (EE. UU.) en 1947 y gracias a la cual se descubrió que las personas con EM producían una proteína inusual en el líquido cefalorraquídeo: las bandas oligoclonales. Este descubrimiento hizo que las punciones lumbares fueran la principal herramienta de diagnóstico precoz. (Raphael et al., 2015) Por otro lado, el neurólogo Jhon Kurtzke desarrolló la famosa escala para medir el grado de discapacidad y partes de sistema nervioso central afectados: Expanded Disability Status Scale (EDSS), la cual se sigue utilizando hoy en día en las consultas de neurología. Aparecieron entonces las primeras técnicas de imagen y se comenzó a utilizar la tomografía computarizada (TC) para el análisis del cerebro. Poco tiempo después, la TC dejó paso a la resonancia magnética (RM), permitiendo obtener imágenes con una mayor definición y usada como prueba básica hoy en día para el diagnóstico de la EM. (Kurtzke, 1983)

Todavía quedan muchas preguntas por resolver, pero gracias a esta larga trayectoria en investigación sobre la enfermedad, podemos definir hoy en día la EM como una enfermedad autoinmune, desmielinizante y neurodegenerativa que afecta al SNC.

El SNC está formado por millones de células unidas entre sí mediante fibras nerviosas que componen el cerebro, la médula espinal y el nervio óptico. Estas fibras nerviosas están recubiertas por mielina, una sustancia grasa que las aísla y protege permitiendo la conducción de los impulsos eléctricos. En la EM, el sistema inmune ataca esta vaina de mielina, la cual se inflama y se separa de las fibras nerviosas para posteriormente ser destruida. Este proceso de destrucción de la mielina se llama desmielinización. Como consecuencia de la desmielinización, la velocidad de transmisión de la información en impulsos eléctricos se ve alterada en su paso desde el cerebro hacia cualquier otro lugar del cuerpo y viceversa. Es entonces cuando empieza a surgir



la variada sintomatología y los signos neurológicos característicos de esta enfermedad. (Compston y Coles, 2008)

Si bien, algunas de las múltiples investigaciones sobre EM se dirigen a causas víricas o patógenos relacionados con la enfermedad (Tarlington et al., 2020), la mayor parte del trabajo de campo se ha dirigido a la naturaleza inflamatoria autoinmune de la enfermedad, que han dado como resultado más de una docena de tratamientos aprobados para la EM. Y es que antes de 1900 el tratamiento contra la EM consistía básicamente en combatir los síntomas. Fatiga, depresión, espasmos musculares y dolor se aliviaban con esteroides, fisioterapia y antidepresivos. En 1993 se dio un paso muy importante, aprobándose el primer tratamiento modificador de la enfermedad: Interferón beta. (Paty y Li, 1993) Este tratamiento ha logrado reducir el número de brotes, así como su agresividad, por lo que ya no se trata el síntoma a posteriori, sino que logra evita su aparición, previniendo los daños permanentes en el sistema nervioso central. Aunque se sigue sin encontrar un tratamiento que cure definitivamente la EM, la aparición de nuevos fármacos en los últimos años ha producido un cambio sustancial en el pronóstico de la enfermedad y calidad de vida de los pacientes.

Nuestro conocimiento acerca de la enfermedad continúa creciendo. Solo hace 50 años la esperanza de vida de las personas diagnosticadas de EM era de 17 años, pudiendo considerarse hoy en día, gracias a la investigación, que la esperanza de vida de una persona diagnosticada de EM es similar a la de una persona no afectada. Un hito que 155 años atrás parecía imposible. Esta tesis pretende apoyar con los resultados obtenidos la constancia en la investigación de esta enfermedad y constatar la importancia que tienen los datos a nivel oftalmológico para la búsqueda de nuevos biomarcadores inocuos de diagnóstico precoz y de seguimiento en la EM.

### **1.1.2. Epidemiología.**

Según datos de la Sociedad Española de Neurología, en España hay unas 55.000 personas diagnosticadas de EM y se estima que la sufren entre 2,5 y 3 millones de pacientes en el mundo. (Kurtzke, 1995; Leray et al., 2016)

El estudio de la epidemiología en EM es difícil debido a su etiología multifactorial. Sabemos que la EM es una enfermedad que afecta a personas jóvenes y de mediana edad entre la segunda y cuarta década de vida. Como ocurre en otras enfermedades autoinmunes, existe un predominio de prevalencia en el género femenino frente al masculino en proporción 2:1. (Confavreux et al., 1980; Orton et al., 2006) Sin embargo, en los hombres suele tener peor pronóstico. En cuanto a la distribución geográfica, se encuentra más incidencia en latitudes septentrionales de América del Norte y Europa frente a los continentes de Asia, África y América del sur, donde la prevalencia es mucho menor. (Walton et al., 2020) Kurtzke en 1975 planteó la existencia de áreas geográficas de distinta prevalencia de EM, de forma que la frecuencia de esta enfermedad aumentaría conforme nos alejáramos del ecuador. (Kurtzke, 2009) (Fig.1) Sin embargo, la repetición de estudios epidemiológicos en diferentes zonas ha cambiado esta visión de la distribución mundial de la EM. Aunque en líneas generales se mantiene la existencia de un gradiente norte-sur se ha visto que puede haber grandes diferencias de prevalencia en áreas geográficamente cercanas, por lo que esta afirmación no sería del todo válida, aunque sí que es cierto que esta teoría soporta que la luz solar y la vitamina D desempeña un papel importante en la enfermedad. (Munger et al., 2006)

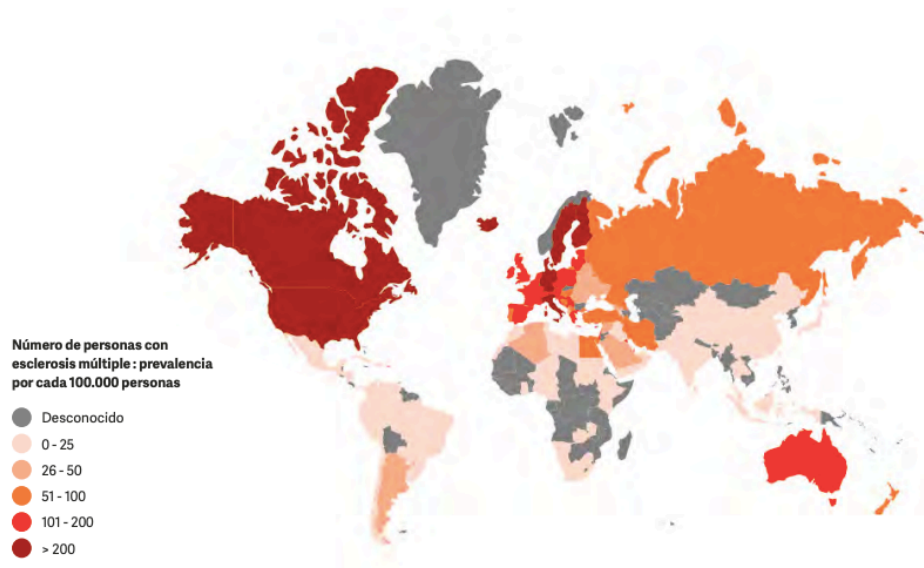


Figura 1. Prevalencia de desarrollo de esclerosis múltiple en el mundo. La tasa de incidencia más alta reside en países con una latitud por encima de los 42°. Extraído de (Federación Internacional de Esclerosis y (MSIF), 2012)

Por otra parte, los estudios epidemiológicos genéticos, concluyen que, mientras el riesgo de padecer la enfermedad en la población general es de 0.1-0.2%, en los familiares de primer grado, esta tasa sube al 3-5%, aumentando a un 30% si ambos padres están afectados. El riesgo disminuye a medida que el parentesco disminuye, lo cual parece estar a favor del modelo de

herencia poligénica. Puesto que la EM es una enfermedad mediada por el sistema inmune en la que los linfocitos T, macrófagos y anticuerpos reaccionan de manera anómala destruyendo la mielina del SNC, los genes más estudiados han sido aquellos que controlan la respuesta inmune y los relacionados con proteínas de la sustancia blanca (Landete Pascual et al., 1998; Orton et al., 2006) .

### **1.1.3. Etiología**

La etiología de la EM se ha estudiado intensamente durante más de un siglo, y aunque se ha descubierto mucho sobre la inmunobiología, epidemiología y la genética, la causa fundamental sigue siendo desconocida. Está muy claro que tanto los procesos degenerativos como los inmunológicos están involucrados en la fisiopatología de la EM. Existe una fuerte influencia genética de la que aún no se ha identificado la mutación y un riesgo muy fuertemente asociado a factores ambientales, en particular a la infección del virus Epstein-Barr, déficit de vitamina D y tabaquismo. (Walton et al., 2020)

### **1.1.4. Patogenia**

La patogenia de la EM implica el inicio y la continuación de mediadores inflamatorios, lo que conduce a la apoptosis de los oligodendrocitos y al daño de la vaina de mielina del axón. (Lassmann y van Horssen, 2011) La mielina, es una capa aislante compuesta de sustancias grasas y proteína que se forma alrededor de los nervios. Es esencial para la conducción de impulsos nerviosos de un cuerpo de célula nerviosa a otro. La disminución de la capacidad de conducción causa deficiencias sensitivas, cognitivas y del movimiento, entre otras, dependiendo de qué nervios estén dañados. Tras este daño, ocurre lo que se llama remielinización, una regeneración de esta mielina; sin embargo, los ataques repetidos a la mielina conducen a una remielinización cada vez menos eficaz hasta que se forma una lesión similar a una cicatriz, una placa, alrededor del axón dañado. (Garg y Smith, 2015)

Asumiendo que la EM es el resultado de la combinación de predisposición genética y factores ambientales desconocidos, provocarían células T autorreactivas, que, tras un periodo de latencia

de varios años, serían activadas por un factor sistémico o local. Esto originaría una reacción autoinmune con resultados de inflamación y desmielinización.

Las células T se adhieren a las células endoteliales de los vasos sanguíneos del SNC atravesando la barrera hemato-encefálica. El reconocimiento de estos antígenos desencadena una respuesta autoinmune con anticuerpos y oligodendrocitos en la sustancia blanca, causando la desmielinización; bien por la activación del complemento produciendo la rotura celular o bien indirectamente por inmunidad humoral con la activación de macrófagos y células de la microglía produciendo citoquinas y generando reacciones de microoxigenación.(Cook et al., 1995; Weinshenker,1995)

Las lesiones de la EM evolucionan de manera diferente durante las fases tempranas de la enfermedad en comparación con las fases de la enfermedad crónica. Las lesiones activas agudas que son características de la enfermedad temprana o recidivante están infiltradas por macrófagos que contienen restos de mielina. En la enfermedad progresiva, se desarrollan lesiones crónicas que consisten en axones completamente desmielinizados y una pérdida sustancial de oligodendrocitos, lo que los vuelve vulnerables a los mediadores inflamatorios. Los macrófagos y la microglía disminuyen con el tiempo, mientras que los astrocitos producen fibras gliales para rellenar la lesión desmielinizada, que deja una cicatriz glial (placa).

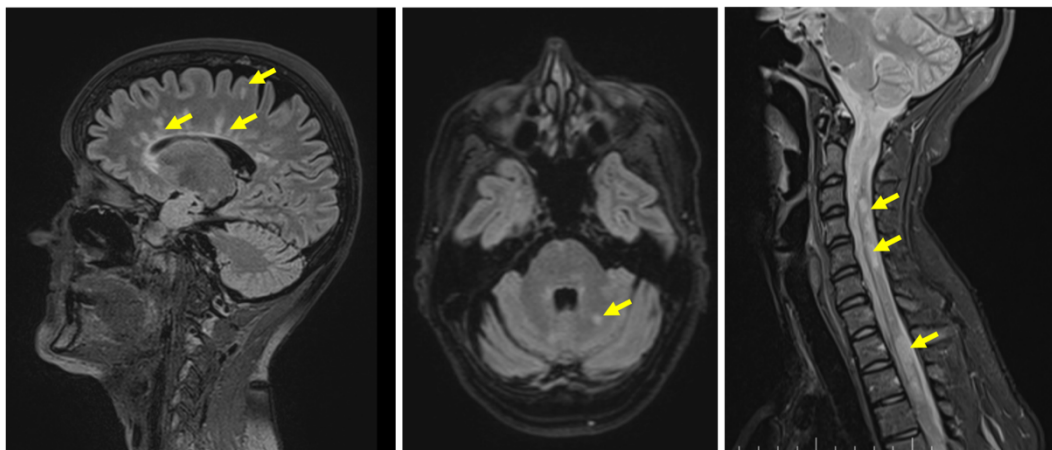
Este modelo basado en la inmunidad celular es el que se acepta actualmente, aunque se cree que pueden existir otros mecanismos patogénicos.

#### **1.1.5. Características clínicas de la enfermedad**

La EM no tiene una característica clínica clara que la pueda definir, sino que existe una gran variabilidad en síntomas y signos que aparecen en estos pacientes. Las lesiones típicas (Fig. 2) se localizan fundamentalmente, a nivel:

- Periventricular: Perpendiculares al eje mayor de los ventrículos laterales.
- Yuxtacorticales o corticales: En la corteza cerebral.
- Infratentoriales: Incluyen cerebelo y tronco del encéfalo
- Medulares. Normalmente en la zona posterior de la médula espinal.

Dada la localización de las lesiones, estas dan lugar al gran abanico de sintomatología con la que cursan los pacientes: parestesias, visión doble, disartria, temblores, paraparesias...etc. (Compston y Coles, 2008)



*Figura 2. Lesiones en forma de áreas de desmielinización en esclerosis múltiple vistas en resonancia magnética. En amarillo señalada la zona de lesión. De izq. a dcha. primera imagen lesiones yuxtacortical y periventricular. Imagen central; lesión infratentorial y lesiones medulares en la última imagen. Fuente de imágenes original del Servicio de Neurología del Hospital Miguel Servet, Zaragoza.*

Si bien, no existe un patrón único en las características clínicas de la EM, podemos destacar dos aspectos constantes en el estudio de esta enfermedad: la presentación súbita de los síntomas, denominados brotes, con mejoría posterior tras unas horas, días o semanas; y la tendencia a que los síntomas experimentados en el primer brote sean los que se repitan en los próximos brotes de la enfermedad.

#### **1.1.6. Síntomas y signos generales de la enfermedad.**

Los síntomas de la EM son muy variados, pero, aun así, podemos distinguir algunos de ellos más frecuentes en el inicio de la enfermedad y durante su curso.

Al comienzo de la enfermedad o los primeros síntomas clínicos previos al diagnóstico de la enfermedad, se han reportado una frecuencia mayor de la alteración de la sensibilidad en el (30-45%) en forma de sensaciones punzantes, hormigueos (parestesias), hipostesia táctil, térmica o dolorosa, disminución de la sensibilidad profunda, posicional y vibratoria y signo de Romberg positivo. Le siguen las alteraciones motoras (40%) con pérdida de fuerza en uno o más miembros, torpeza al caminar o debilidad de manos. También puede aparecer parálisis y reacción exagerada

del sistema nervioso involuntario a la estimulación. Un síntoma bastante común en los inicios de la enfermedad es la afectación de la salud visual. Aparecen en, aproximadamente, un 20% de los pacientes al inicio de la enfermedad y refieren pérdida parcial de visión y dolor en un ojo (debido a una neuritis óptica retrobulbar), diplopía (debida a oftalmoplejía internuclear) y escotomas visuales (pérdidas de campo visual). (Ghasemi et al., 2016)

Durante el curso de la enfermedad se afectan la mayor parte de los sistemas funcionales neurológicos: piramidal, sensitivo, cerebeloso, tronco encefálico, esfinteriano, visual y mental. Sus alteraciones más frecuentes son las motoras (90%), sensitivas (77%) y cerebelosas (75%).

Síntomas frecuentes son:

- Fatiga: Es el síntoma más frecuente e incapacitante en la calidad de vida de los pacientes. Se incrementa notablemente con el calor y está relacionada con el daño axonal difuso. (Tartaglia et al., 2004)
- Dolor: También con alto impacto en la calidad de vida. Neuralgias del trigémino, crisis tónicas dolorosas, disestesias paroxísticas.
- Signo de Lhermitte: Sensación de calambre eléctrico que desciende por la espalda hasta los miembros inferiores al flexionar el cuello. Se presenta en un 20- 40% de los pacientes.
- Epilepsia: En los pacientes con EM existe un riesgo de padecer epilepsia. cefaleas y vómitos, edema de papila y signos focales. ·
- Narcolepsia
- Síntomas cerebelosos: A lo largo de la enfermedad es frecuente la aparición sintomatología derivada de la afectación del cerebelo. Una de las manifestaciones es el temblor intencional.
- Trastornos del tronco encefálico: Consiste en la afectación de los pares craneales. La afectación de los pares oculomotores (III, IV y VI), se traducen en diplopía, estrabismo y nistagmos; mientras que la afectación del II par craneal se traduce en neuritis óptica retrobulbar: tanto el nervio, el quiasma y la cintilla óptica son especialmente vulnerables a la enfermedad y se debe principalmente a la desmielinización de estas zonas. Una tríada de síntomas precede a la neuritis óptica: pérdida de visión, dolor ocular ipsilateral y discromatopsia (Voss et al., 2011). La pérdida de visión es de minutos u horas, pero frecuentemente reaparece a los pocos días o semanas de forma espontánea, empeora con el calor y el ejercicio físico. Los defectos campimétricos se manifiestan como escotomas en la parte central o paracentral del ojo. Son frecuentes los trastornos

cuadrantonópticos o hemionópticos unilaterales, cuando la placa de desmielinización se ubica en la terminación del nervio óptico o defectos hemionópticos contralaterales cuando la placa es a nivel del nervio, del quiasma o de las cintillas ópticas. (Swanton et al., 2010)

- Alteraciones esfinterianas: El síntoma principal que aparece es la urgencia urinaria, siendo más infrecuente, la retención urinaria.
- Alteraciones sexuales en forma de disminución de la libido, impotencia y disminución sensibilidad genital.
- Trastornos afectivos, en el que la depresión es el más común.
- Trastornos cognitivos.

#### **1.1.7. Pruebas diagnósticas de la enfermedad**

El diagnóstico de EM resulta complicado debido a la variedad de sus síntomas. Hace algunos años, era preciso que se hubieran presentado al menos 2 brotes para instaurar el diagnóstico de EM. Hoy en día, la “regla” básica para efectuar un diagnóstico requiere que se reúnan las dos condiciones siguientes:

- I. Que existan pruebas objetivas de al menos dos áreas de pérdida de mielina, o lesiones de desmielinización que aparezcan en dos zonas neurológicas distintas y separadas en el tiempo. Es decir, al menos dos lesiones en distintos momentos en cerebro, médula espinal o nervio óptico.
- II. Que se descarten diagnósticos de enfermedades distintas a la EM que puedan cursar con los mismos signos o síntomas.

Estas dos condiciones, descritas como Criterios de McDonald, permitieron en 2005 y en la última actualización de 2017, consensuar la práctica médica en el diagnóstico de la EM y establecer un diagnóstico más temprano de la patología. Si se confirman estas dos lesiones y además se han descartado objetivamente el resto de las enfermedades que pueden causar síntomas neurológicos similares, se confirma el diagnóstico de EM. (McDonald et al., 2001; Thompson et al., 2018a)

Para ello se necesitan dos tipologías de pruebas: examen físico y pruebas diagnósticas:

### ❖ Examen físico

Cuando el sujeto afectado se presenta en la consulta médica con síntomas compatibles con EM, el procedimiento habitual es elaborar una historia clínica detallada que incluya todos los síntomas de la persona, no solo los presentes, sino también los pasados. Como hemos visto, algunos síntomas de esta enfermedad no resultan invalidantes y pueden no darse importancia a priori. Para ello, el médico realiza un examen ocular, un chequeo de fuerza muscular, medición de la coordinación, examen de sensibilidad y prueba de reflejos para comprobar si existen signos que puedan explicar los síntomas. Entre los signos más comunes que puede detectar el médico durante un examen físico y que pueden señalar anomalías neurológicas, están:

1. Un movimiento ocular alterado y una reacción anormal de las pupilas.
2. Cambios sutiles en el habla.
3. Alteración de los reflejos.
4. Problemas de coordinación.
5. Alteraciones sensoriales.
6. Muestras de espasticidad o de debilidad en los brazos o piernas.

### ❖ Pruebas diagnósticas

El examen físico se complementa con pruebas diagnósticas y de laboratorio.

La prueba más determinante, capaz de detectar placas o cicatrices que podrían estar causadas por la EM, es la resonancia magnética (RM).

La RM permite obtener, al inyectar de forma intravenosa un medio de contraste llamado gadolinio, imágenes muy precisas del cerebro y ha supuesto un avance clave en el diagnóstico de esta enfermedad neurodegenerativa. Utiliza campos magnéticos potentes que interactúan con los átomos de hidrógeno del agua contenida en los tejidos y fluidos del organismo para obtener una imagen del cerebro y médula espinal muy detallada y precisa.

Es un procedimiento de exploración muy sensible y puede lograr imágenes de lesiones o de zonas dañadas que pasarían inadvertidas con un escáner (tomografía computarizada, TC).



Sin embargo, como toda prueba diagnóstica, la RM tiene limitaciones. Así, una RM anormal no implica, necesariamente, que exista EM. Hay otras afecciones que causan lesiones cerebrales muy similares a las que produce la EM. Y a la inversa, una RM con resultado normal no descarta por completo la existencia de EM. Existe un 5% de pacientes con confirmación de diagnóstico de EM para los que la RM no muestra lesiones en el cerebro. Estas personas pueden incluso tener lesiones que no puedan ser detectadas mediante RM.

En el 90% de las personas con EM se ha confirmado el diagnóstico mediante esta prueba, pero si después de realizar el examen físico y la RM siguen existiendo dudas en cuanto al diagnóstico, se pueden llevar a cabo otras pruebas complementarias, como los potenciales evocados y la extracción de líquido cefalorraquídeo y de sangre.

Los potenciales evocados (PE) son estudios eléctricos de diagnóstico que pueden mostrar si ha habido una disminución en el flujo de mensajes en varias partes del cerebro. A menudo delatan la presencia de cicatrices a lo largo de las vías nerviosas que no pueden detectarse de otro modo.

Aunque en los criterios McDonald de 2011, el examen del líquido cefalorraquídeo (LCF) se excluyera como técnica diagnóstica, en la práctica diaria, continúa jugando un papel relevante en el diagnóstico de esta enfermedad y sigue siendo una herramienta esencial en la investigación de su etiología y patogenia. La punción lumbar, permite extraer líquido cefalorraquídeo que rodea el cerebro y la médula espinal. Se examina con el fin de detectar los niveles de ciertas proteínas del sistema inmunológico y la presencia de los anticuerpos “bandas oligoclonales”. Estas bandas indican una respuesta inmune en el sistema nervioso central y se encuentran en el fluido cerebroespinal del 90% al 95% de las personas con EM. (Álvarez-Cermeño et al., 2008; Masjuan et al., 2006) Sin embargo, también están presentes en otras enfermedades y, por consiguiente, las bandas oligoclonales de por sí, no pueden considerarse como una prueba definitiva de la existencia de EM, siendo sólo un complemento de las pruebas ya mencionadas.

No existe ningún marcador bioquímico específico asociado a la EM que se pueda detectar en un análisis de sangre, sin embargo, sirve para descartar de forma positiva otras causas de síntomas neurológicos similares, como la enfermedad de Lyme, las enfermedades colágeno-vasculares, ciertos desórdenes hereditarios poco comunes y el SIDA (síndrome de

inmunodeficiencia adquirida). Por ello los análisis de sangre se usan, sobre todo, como prueba de exclusión.

#### 1.1.8. Formas de evolutivas de la enfermedad

En relación con el curso clínico también se consideran diferentes categorías diagnósticas. La evolución de la EM es variable y si individualizamos cada paciente, es casi imposible predecirla en ausencia de marcadores pronósticos validados. Los cursos clínicos de la enfermedad se definieron en 1996. En el año 2013, un comité de expertos en ensayos clínicos, apoyados por la Sociedad Americana de EM y el Comité europeo para el tratamiento e investigación en EM, refinó y clasificó los distintos fenotipos (Lublin et al., 2014) (Fig. 3):

- Síndrome clínico aislado (SCA): Se reconoce como la primera presentación clínica de la enfermedad, que comparte características de desmielinización inflamatoria con la EM, pero aún no cumple con los criterios de diseminación en el tiempo. (Miller et al., 2005)
- EM Remitente-Recurrente (EM-RR): El 90% de los pacientes presentan un curso evolutivo en forma de brotes episódicos, que tienen un diferente grado de afectación neurológica y que son más o menos reversibles. Esta forma de presentación se caracterizaría por episodios de recidivas de la enfermedad seguidas de episodios de recuperación, completa o parcial.
- EM Secundaria-Progresiva (EM-SP): Después de 10 años de evolución, el 50 % de los pacientes que comienzan con una forma RR, pasan a otra forma evolutiva, la Secundaria-Progresiva (SP), en la cual no hay brotes, sino que el deterioro que aparece es progresivo. A los 15 años de evolución, esta clasificación alcanza al 75% de los pacientes. Sin embargo, aún no se han establecido criterios claros clínicos, de imagen o inmunológicos que marquen la transición de EM-RR a EM-SP. Algunos autores sugieren que este cambio de forma RR a un curso progresivo o forma SP no se debe a un cambio en el proceso inmune, sino que este cambio se debe relacionar con los efectos directos de la desmielinización (daño axonal). (Herndon, 2002; Lorscheider et al., 2016)
- EM Primaria-Progresiva (EM-PP). Otro grupo de pacientes (10%) comienzan de forma lentamente progresiva acumulando la discapacidad. Representa una forma patológica distinta, con menores lesiones inflamatorias de la sustancia blanca evidentes, pero se

observa pérdida axonal difusa. La edad de comienzo y la incidencia por sexos, varía en relación con la forma RR, en este caso la edad de comienzo es ligeramente superior (40 años) y la razón por sexos se iguala 1:1. Debido a la edad más avanzada de comienzo, existe una mayor posibilidad de patología concomitante (mielopatía compresiva, isquemia crónica). (Lassmann et al., 2012) Si bien es un curso clínico separado debido a la ausencia de exacerbaciones antes de la progresión clínica, no parece tener características fisiopatológicas distintas de las formas recurrentes de EM que han entrado en curso progresivo; EM-SP. (Miller y Leary, 2007)


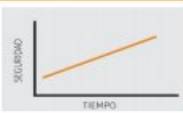

Tipo	Características	Gráfico evolutivo
<b>Remitente-recurrente</b>	Presencia de exacerbaciones (brotes) claras con posterior recuperación total o parcial con déficit residual (empeoramiento gradual).	
<b>Primaria progresiva</b>	Enfermedad progresiva desde su inicio, con la posibilidad de estacionarse.	
<b>Secundaria progresiva</b>	Inicialmente es una forma remitente - recurrente, seguida de progresión con o sin recaídas.	

Figura 3. Tipos de esclerosis múltiple según curso evolutivo de la enfermedad Fuente tabla original.

Estos fenotipos de la EM se categorizan como hemos visto en recidivante o progresivo según el contexto del historial y estado médico actual, pero estas categorías no dan una información del proceso de la enfermedad en curso. El grupo de expertos *MS Phenotype Group* cree que la actividad de la enfermedad detectada por recaídas clínicas o imágenes, así como la progresión de la discapacidad, pueden describir con mejor detalle la enfermedad recidivante o progresiva. (Lublin et al., 2014)

## 1.2. LA RETINA

La retina se considera como una parte integral del sistema nervioso central (SNC), y es que, durante su desarrollo embriológico en los vertebrados, la retina se forma como una evaginación del diencefalo llamada vesícula óptica, que sufre a su vez una invaginación para

formar la copa óptica, dando lugar en su pared interior a la retina y en la pared exterior al epitelio pigmentario de la retina. (Abraham Kierszenbaum, 2019)

### 1.2.1. Anatomía y estructura de la retina

La retina junto con la esclera y la coroides, tiene forma esférica abierta por delante, lo que nos permite considerar una cara externa limitando con la coroides y otra cara interna que contacta con el humor vítreo. Además, tiene dos extremos abiertos, el anterior con la apertura pupilar y el posterior con la prolongación del segundo par craneal o nervio óptico en la zona nasal. El área central de la retina es la mácula, situada entre las arcadas vasculares temporales y nervio óptico. La depresión central es la fovea, donde existe una zona sin presencia de vasos sanguíneos llamada zona avascular foveal (ZAF). (Fig. 4)

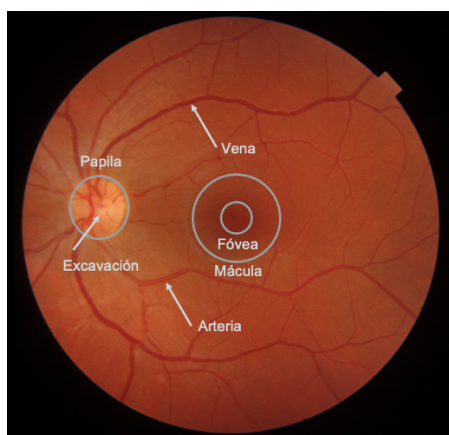


Figura 4. Fotografía de fondo de ojo con las diferentes estructuras indicadas. Fuente original.

La retina se divide en epitelio pigmentario y retina sensorial. Ambos están separados por un espacio virtual llamado espacio subretiniano. Esta retina sensorial se extiende desde la papila o cabeza del nervio óptico hasta la ora serrata, límite con la pars plana ciliar. Presenta dos áreas: polo posterior (abarcando el espacio comprendido entre la papila y las arcadas vasculares temporales superior e inferior) y retina periférica (diferenciada por la presencia de un mayor número de células ganglionares en el lado temporal a la papila).

En la retina encontramos tres tipos de células resumidas en la tabla 1:

CÉLULAS PIGMENTADAS	CÉLULAS NEURONALES	CÉLULAS DE SOSTÉN
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Células pigmentarias</u>. Se encargan del metabolismo de los Fotorreceptores.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Células fotorreceptoras</u>. Células sensibles a la luz (Conos y Bastones) compuestas por un segmento adyacente al epitelio pigmentario de la retina que contiene fotorpigmento; y un segmento interno que contienen el núcleo celular y realizan la sinapsis con células bipolares u horizontales.</li> <li>• <u>Células bipolares</u>. Conectan a los Fotorreceptores con las células ganglionares</li> <li>• <u>Células amacrinas</u>. Son neuronas moduladoras</li> <li>• <u>Células horizontales</u>. Células moduladoras.</li> <li>• <u>Células ganglionares</u>. Reciben la información a través de las células bipolares y lo transmiten al cerebro a través de sus axones que forman el nervio óptico.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Astroцитos</u></li> <li>• <u>Células de Müller</u>. Su función es de soporte y síntesis de glucógeno.</li> </ul>

Tabla 1: Tipos de células que componen la retina. Tabla original.

Estas células están dispuestas de tal forma que podemos segmentar la retina en 3 capas con cuerpos celulares y 2 capas de interacciones sinápticas (denominadas plexiformes). Diferenciamos las siguientes diez capas en la retina desde la parte más externa a la interna (Fig. 5):

- Membrana limitante interna (MLI): Esta capa hace de separación entre la retina y el humor vítreo.
- Capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR): Axones de las células ganglionares que se extienden hasta formar el nervio óptico.
- Capa de células ganglionares (CCG). Constituida por los núcleos de células ganglionares. Reciben información de los Fotorreceptores a través de las células bipolares, horizontales y amacrinas.
- Capa plexiforme interna (CPI): Constituida por prolongaciones celulares que realizan contacto sináptico entre las células de la capa nuclear interna y las células ganglionares.
- Capa nuclear interna (CNI). En esta capa se encuentra la mayor variedad de células retinianas. En la zona más externa están las células bipolares y horizontales y las células de Müller, y en la zona interna las células amacrinas e interplexiformes. En el límite de la

CNI se encuentra el plexo vascular intermedio y en el límite externo, el plexo vascular profundo.

- Capa plexiforme externa (CPE). Capa donde se realiza sinapsis entre las células fotorreceptoras y las células bipolares.
- Capa nuclear externa (CNE). Contiene los cuerpos celulares de conos y bastones.
- Membrana limitante externa (MLE). Se compone de uniones entre células fotorreceptoras y células de Müller (células gliales encargadas de funciones auxiliares).
- Fotorreceptores: La retina humana contiene aproximadamente 100 millones de bastones y 6 millones de conos. Los bastones tienen una sensibilidad escotópica y los conos, fotópica. La mayor densidad de los bastones está por encima de la fóvea y los conos en los cuadrantes centrales.
- Epitelio pigmentario de la retina (EPR). Compuesto por una monocapa de 6 millones de células hexagonales regulares en contacto entre sí y unidas fuertemente proporcionando estabilidad estructural y manteniendo la barrera hematorretinana externa. Tiene múltiples funciones:
  - Metabolizar la vitamina A.
  - Fagocitosis de los segmentos externos de fotorreceptores.
  - Absorber la luz.
  - Intercambio de calor.
  - Formación de la lámina basal de la membrana de Bruch.
  - Transporte activo de materiales dentro y fuera del EPR (Nutrición).
- Membrana de Bruch. Es una lámina resultante de la fusión de la membrana basal del EPR y la capa coriocapilar de la coroides. Se extiende desde el borde del disco óptico a la ora serrata. Consta de tejido conectivo permeable a moléculas pequeñas como la fluoresceína.

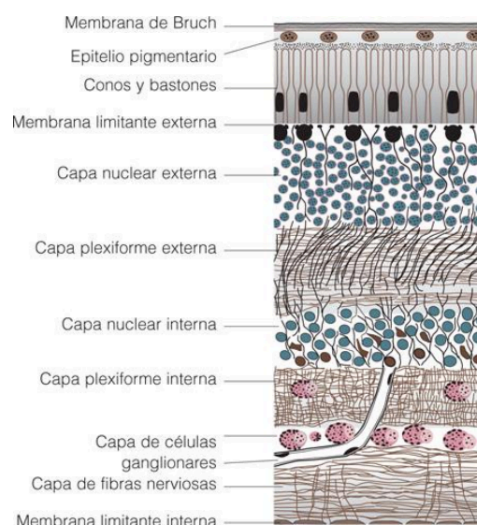


Figura 5. Dibujo de las capas de la retina. Extraído de (Riordan-Eva P, Cunningham ET, Pérez AD, Espinosa RLL, 2012)

### 1.2.2. Vascularización de la retina

La retina tiene un sistema de irrigación dual. Está irrigada por la arteria central de la retina (ACR) y las arterias ciliares posteriores, ambas ramas de la arteria oftálmica. La arteria central de la retina entra al ojo por la excavación central del disco óptico y se divide en arcadas superior e inferior y a su vez cada una de ellas se subdividen en arterias temporales y nasales. Las arterias ciliares entran al polo posterior del ojo rodeando la salida del nervio óptico y se diferencian en las arterias ciliares largas (que discurren entre coroides y esclera hacia la parte anterior para nutrir estructuras anteriores) y las arterias ciliares cortas (que capilarizan a nivel de la coroides). (Fig. 6)

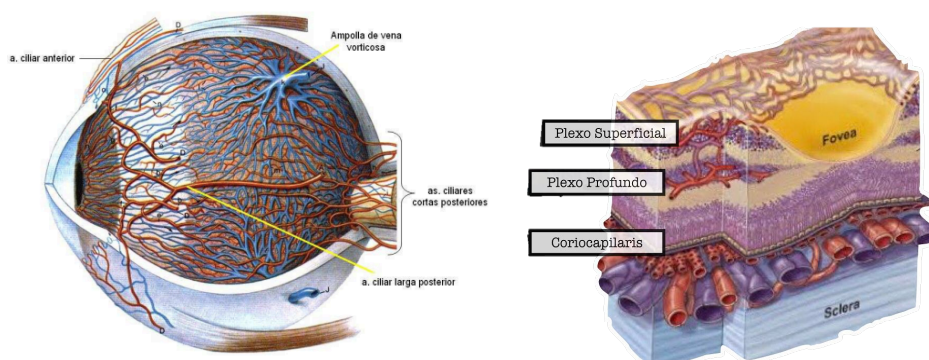


Figura 6. Derecha.: Imagen irrigación globo ocular. Izquierda.: Imagen de la vascularización en la retina por los distintos plexos vasculares. Imagen extraída de (B. Anand-Apte, 2010)

La necesidad metabólica en todo el espesor de la retina se suple a partir de la división de las arterias provenientes de la ACR en más de cuatro capas de capilares. La más superficial es la red capilar peripapilar, ubicada en la CFNR. Seguida están los dos plexos capilares, el superficial y el profundo de la retina, los cuales nutren los dos tercios de retina interna; y, por último, una red coriocapilar que proviene del sistema capilar de las arterias ciliares cortas, y que irriga el tercio externo de la retina y es independiente a la irrigación de la retina, no llegándose a juntar en ningún momento. (Fig. 7)

El plexo superficial se representa por vasos retinianos largos localizados en las capas más internas, la cual se encuentra desde 3  $\mu\text{m}$  por debajo de la MLI hasta 15  $\mu\text{m}$  por debajo de la CPI con una medida promedio de 120  $\mu\text{m}$ . El plexo profundo se extiende entre las porciones externa y la más interna de la capa plexiforme externa (CPE) que mide en promedio cerca de 60  $\mu\text{m}$ . La región del nervio óptico cuenta con un plexo de capilar peripapilar radial que son sutilmente divididos. En la región macular, los tres plexos se unen en uno a nivel del borde de la zona avascular foveal. El superficial es de vasos de calibre mayor, y luego disminuyen en el intermedio y profundo. El superficial se encuentra entre la CFNR, el intermedio adyacente e interno a la CNI, y el posterior adyacente externamente a la CNI. Hacia la retina periférica, el plexo superficial se mantiene y hay una unión en un plexo único del plexo intermedio y profundo. (Olver, 1990)

### **1.2.3. Nervio óptico**

El nervio óptico es el II par craneal. Es una proyección de la sustancia blanca del cerebro, por lo que se considera una parte del SNC. Está compuesto por millones de axones de las células ganglionares de la retina, células gliales como astrocitos, oligodendrocitos y microglía; vasos sanguíneos de la arteria central de la retina y derivados del sistema ciliar y tejido conectivo que constituye la lámina cribosa y septos que compartimentan el nervio óptico.

Los axones de las células ganglionares siguen una trayectoria rectilínea en la retina dirigiéndose hacia el disco óptico formando la CFNR. Estas fibras según se van acercando al disco adquieren una ordenación concreta, de tal forma que las fibras de retina periférica se disponen más cercana a la capa de células ganglionares; mientras que, las más centrales y cercanas al disco se disponen cerca de la membrana limitante interna. De este modo, al alcanzar el disco óptico, las fibras



periféricas penetran por los márgenes de la papila y las más cercanas a la cabeza del nervio óptico, pasan por la zona central.

Estas fibras, cuando se introducen en el canal escleral realizan un cambio de trayectoria de 90 grados, agrupándose y constituyendo estructuras similares a tubos. La característica principal de esta zona es que las fibras nerviosas son amielínicas. Los astrocitos aquí realizan una importante función de soporte y protección. Dan elasticidad evitando el rozamiento entre los axones y previenen de daños irreparables de las fibras cuando se produce el hinchamiento del disco en situación de neuritis o inflamación del nervio óptico. En la región laminar, la lámina cribosa, constituida por expansiones esclerales de fibras de colágeno y tejido elástico, deja orificios a través de los cuales las fibras nerviosas atraviesan esta zona. En la región retrolaminar, los axones ganglionares fasciculados en haces son rodeados por oligodendrocitos cubriendo las fibras nerviosas con una vaina de mielina. Esta mielinización provoca el aumento del diámetro del nervio óptico en más del doble. (Anderson, 1973, 1970; Anderson y Hoyt, 1969) (Fig. 7.)

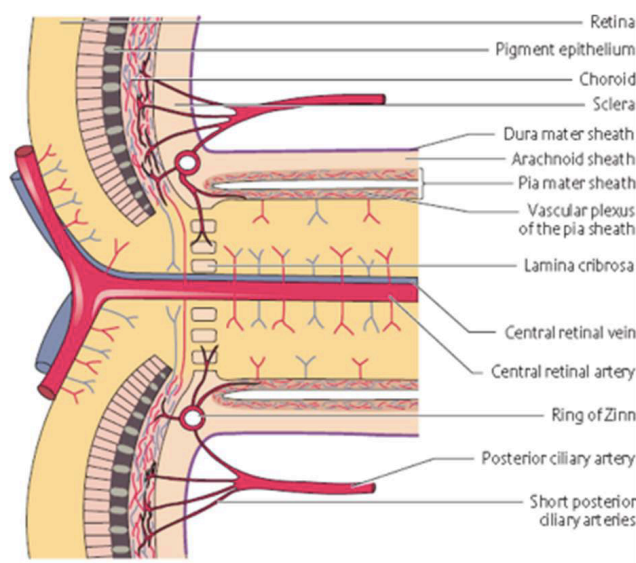


Figura 7. Dibujo de la estructura del nervio óptico. Extraída de (Kritzinger, 1987)

Esta característica especial del nervio óptico en cuanto a la particular forma de mielinización de sus fibras y la capacidad de poder analizar esta estructura con las técnicas de imagen que tenemos hoy en día ha sido clave para el estudio de la EM en oftalmología.

### **1.3. LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE Y SU RELACIÓN CON LAS ESTRUCTURAS OCULARES.**

#### **1.3.1. Alteraciones visuales en esclerosis múltiple**

En una revisión llevada a cabo por el Comité Norteamericano de Investigación en EM, el 60% de los 9107 pacientes evaluados reportó alteraciones visuales. La clínica visual más frecuente suele presentarse como reducción de la agudeza visual y alteración del color, asociado a neuritis óptica o alteraciones de la motilidad ocular. (Donze y Malapel, 2010)

- Neuritis óptica

La neuritis óptica o inflamación del nervio óptico es un síntoma muy frecuente en la EM, siendo el primer síntoma de EM en el 20% de los pacientes diagnosticados de la enfermedad. (Miller et al., 2005) La proporción de pacientes que, tras sufrir un brote de neuritis óptica, es diagnosticado a lo largo del tiempo de EM es alta. Se ha estimado que el riesgo de padecer EM es del 26% a los 5 años, 34% a los 10 años y 40% a los 15 años tras sufrir el episodio de neuritis óptica. (Nilsson et al., 2005)

Se ha demostrado que un brote de neuritis óptica produce daño en los axones de la capa de fibras nerviosas de la retina y se manifiesta clínicamente por la palidez de la papila y por el adelgazamiento del espesor de esta capa.

Generalmente, la recuperación es buena. El curso natural de la neuritis óptica conduce a la recuperación visual casi completa en la mayoría de los casos, aunque a veces queda una peor calidad visual con ese ojo y un adelgazamiento en la capa de fibras nerviosas de la retina peripapilar.

La particularidad que existe en el nervio óptico es que está formado en gran parte por axones de las células ganglionares de la retina que hasta que no pasan la lámina cribosa no se mielinizan, por lo que el ojo es el único lugar del sistema nervioso donde se puede estudiar el daño únicamente axonal producido por los brotes inflamatorios, independientemente del estado de la mielina. (Ogden, 1983)

La manera de valorarlo es cuantificar el daño estructural con la medida del espesor de las capas de la retina en la zona peripapilar y el daño funcional mediante la exploración de la agudeza visual y visión de colores, técnicas campimétricas y pruebas electrofisiológicas. (Sergott, 2005)

- Alteraciones en la motilidad ocular

La patología inflamatoria, desmielinizante y neurodegenerativa en la EM afecta a la función visual aferente y eferente. Las anomalías eferentes o motoras oculares ocurren a menudo siendo crónicas y persistentes, incluyendo oftalmoplejía internuclear (OIN), dismetría sacádica, parálisis del III, IV o VI par craneal, parálisis de la mirada horizontal, combinación de una parálisis, parálisis de la mirada sacádica vertical, alteración en la convergencia, trastornos del reflejo vestíbulo ocular, nistagmo patológico, nistagmo deprimido y nistagmo adquirido en posición primaria de mirada. (Hainline et al., 2017)

La exploración de los movimientos oculares es crucial para la detección de estas alteraciones. La diplopía es experimentada por un tercio de los pacientes, el nistagmo por dos tercios, y los trastornos del movimiento ocular están presentes en más de tres cuartas partes de los pacientes de EM durante su enfermedad, encontrando la dismetría sacádica en hasta el 91% de los pacientes, incluyendo a aquellos sin sintomatología visual manifiesta. (McDonald et al., 1992)

### **1.3.2. Estructura retiniana y su relación con la esclerosis múltiple**

En relación con las alteraciones estructurales de la retina en pacientes con EM, se ha sugerido la capa de fibras nerviosas de la retina peripapilar (CFNRp), compuesta como hemos visto de axones amielínicos, como un biomarcador que representa la degeneración axonal en el cerebro de pacientes con EM. Esta degeneración axonal contribuye al desarrollo de atrofia cerebral y se relaciona con la discapacidad causada por la enfermedad. El espesor de la CFNRp medido con tecnología de tomografía de coherencia óptica (OCT) ha permitido observar una pérdida axonal en la vía visual anterior y poder seguir su evolución en el tiempo en pacientes con o sin brote de neuritis óptica. Esta pérdida en pacientes sin antecedente de neuritis reabre el debate al sugerir la existencia de daño axonal no asociado a inflamación, dando más importancia a la neurodegeneración. (Castro et al., 2013; Fisher et al., 2006; Reis et al., 2011) Esta medida se

ha correlacionado en varios estudios con el grado de atrofia cerebral en pacientes con EM. (Gordon-Lipkin et al., 2007; Toledo et al., 2008) La correlación moderada encontrada entre el espesor de la CFNRp y la función cognitiva refuerzan el papel del estudio de la vía visual como fuente de biomarcadores en la EM. Además, el estudio del espesor del complejo células ganglionares, permite monitorizar neurodegeneración, ya que muestra correlación con el volumen de sustancia gris y del núcleo caudado en pacientes con EM sin antecedentes de neuritis óptica. (Saidha et al., 2013)

El mecanismo por el que se produce este adelgazamiento, en el caso de no haber padecido una neuritis óptica, no está claro. Reich y colaboradores relacionaron el daño en las radiaciones ópticas observadas en la RM cerebral con el adelgazamiento en la CFNR; de esta manera apoyan la teoría de la influencia de la degeneración retrógrada transináptica de las fibras que se han desmielinizado en una zona más distal de la vía visual. (Reich et al., 2009) Diferentes estudios defienden que podría existir un daño primario de la retina con degeneración de las capas nucleares internas y externas que ocurre de forma independiente al daño de la sustancia blanca o de la desmielinización del nervio óptico. (Ángela Vidal-Jordana, Jaume Sastre-Garriga, 2012)

A su vez, las principales pruebas de neurofisiología usadas en el estudio de pacientes con EM son los potenciales evocados visuales (PEV) y el electrorretinograma (ERG). Recientemente se ha descrito que el componente N95 del ERG en patrón se relaciona con la actividad de las células ganglionares de la retina. Estas pruebas son muy sensibles, aunque poco específicas, y necesitan de una buena colaboración del paciente. Son varios los estudios que han evidenciado alteraciones en el ERG en patrón (especialmente del componente N95) no solo en pacientes con antecedente de neuritis óptica, sino también en aquellos sin historia previa de la misma. (Almarcegui et al., 2010; Barton et al., 2019)



# JUSTIFICACIÓN DEL TEMA

En los criterios McDonald de 2010, no se consideraba la exploración del nervio óptico como un criterio en el diagnóstico de EM. (Polman et al., 2011) Posteriormente, en 2016 el grupo de diagnóstico de imágenes por resonancia magnética en EM (MAGNIMS) recomendaba la modificación de los criterios añadiendo el estudio del nervio óptico (Filippi et al., 2016), pero en la reunión de 2017 para la revisión de los criterios de McDonald se consideró que los datos relativos a los potenciales evocados visuales o a la tomografía de coherencia óptica en pacientes sin un historial claro o evidencia clínica de neuritis óptica eran insuficientes para respaldar la incorporación a los criterios de McDonald en este momento. (Thompson et al., 2018b) Por lo que, hoy en día la técnica de análisis de nervio óptico se identifica únicamente como apoyo para el diagnóstico de EM.

En oftalmología, se sigue apostando por la importancia de la técnica de tomografía de coherencia óptica (OCT) ya que proporciona medidas altamente fiables y reproducibles de daño axonal y de pérdida neuronal en pacientes con EM.

Usando el sistema visual como modelo clínico propio en la EM, medidas de OCT de la estructura neuro axonal pueden correlacionarse con los resultados funcionales para ayudar a dilucidar los mecanismos de lesión del SNC y de su reparación.

Sin embargo, hoy en día hay evidencias suficientes para incluir las pruebas de OCT como biomarcadores de EM, y este trabajo apoya esta teoría y aboga por la extensión de la OCT en el uso clínico como herramienta diagnóstica en la EM. (Cavaliere et al., 2019; del Palomar et al., 2019; Thompson et al., 2018a)

La utilidad de los PEV en la EM ha sido demostrada por distintos autores. (Corallo et al., 2005; Weinstock-Guttman et al., 2003) Almarcegui y colaboradores también compararon pacientes con EM con sujetos sanos mediante pruebas electrofisiológicas de la visión y

evidenciaron una reducción de la amplitud del componente P100 de los PEV y un retardo en su latencia. (Almarcegui et al., 2010)

La ERG-mf es una técnica electrofisiológica que ha demostrado su potencial para indicar disfunción de CCG en enfermedades neurodegenerativas como el glaucoma. (Al-Nosairy et al., 2021; Viswanathan et al., 2001, 1999). Existen pocos estudios pioneros que han demostrado la disfunción axonal en pacientes con EM-RR, (Filgueiras et al., 2019) por lo que proponemos continuar con la investigación mediante esta técnica y realizar un estudio objetivo de la funcionalidad de la retina para descubrir biomarcadores retinianos efectivos de la EM y el patrón de daño relacionado con la enfermedad para mejorar el diagnóstico y seguimiento de ella.

En ERG-mf no hay base para argumentar que las regiones predefinidas son en todos los casos las que poseen la mayor capacidad para discriminar entre pacientes y sujetos de control. El análisis de los registros de mfERG normalmente se hace por agrupamientos de anillos o de cuadrantes, pero estas formas predeterminadas no son necesariamente las más idóneas, teniendo en cuenta que la estructura de la retina no es homogénea. Junto con el Grupo de Ingeniería Biomédica de la Universidad de Alcalá de Henares, se ha trabajado con los datos de ERG-mf realizados a pacientes EM-RR y sujetos sanos para potenciar el análisis de ERG-mf para el diagnóstico de EM. La agrupación de celdas de forma estándar puede no ser útil en algunas enfermedades o disminuir su capacidad de diagnóstico. De forma personalizada, se propone valorar un patrón de discriminación que permita diferenciar entre control y paciente con una especificidad mayor que la dada con patrones ya estipulados como lo son la distribución en cuadrantes superior, inferior, nasal y temporal; y la distribución en anillos concéntricos.

También se pretende analizar los valores de onda de ERG-mf con herramientas matemáticas que permitan potenciar los valores que interesan y reducir el ruido para obtener una señal más limpia como es el caso de la descomposición en modo empírico (EMD) y por tanto obtener un poder de valoración mayor.





# HIPÓTESIS

Los diferentes protocolos de análisis estructural de retina y de análisis de la vasculatura retiniana realizados mediante tomografía de coherencia óptica y la técnica de electrorretinografía multifocal, aportan herramientas que permiten la detección precoz, pronóstico y seguimiento de los pacientes con esclerosis múltiple.



# OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

## 4.1 OBJETIVO PRIMARIO

- I. El objetivo de esta tesis doctoral es valorar los resultados clínicos de pacientes con esclerosis múltiple comparándolos con sujetos sanos para descubrir nuevos biomarcadores en las pruebas oftalmológicas de angiografía mediada por tomografía de coherencia óptica, tomografía de coherencia óptica y técnicas de electroretinografía multifocal.

## 4.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

- II. Diseñar un método de agrupaciones de los 61 sectores (hexágonos) de electroretinograma multifocal de tal modo que se obtenga la máxima capacidad discriminante entre controles y pacientes con esclerosis múltiple de fenotipo remitente recurrente.
- III. Analizar con el método diseñado la latencia y amplitud de las ondas recogidas por electroretinograma multifocal.
- IV. Mejorar la capacidad discriminante en el diagnóstico de esclerosis múltiple mediante el análisis de registros de electroretinograma multifocal utilizando un filtro de descomposición de modo empírico.
- V. Mejorar la capacidad discriminante en el diagnóstico de esclerosis múltiple mediante el análisis de registros de electroretinograma multifocal empleando la correlación entre las señales y base de datos normativa como parámetro de análisis.
- VI. Estudiar la capacidad de detectar cambios en el plexo vascular superficial con la técnica de angiografía mediada por tomografía de coherencia óptica (OCT-A) en pacientes con esclerosis múltiple.

- VII. Valorar los cambios de flujo vascular con angiografía mediada por tomografía de coherencia óptica (OCT-A) dependiendo de los años de diagnóstico de la enfermedad.
- VIII. Analizar el impacto sobre el flujo vascular del plexo superficial en pacientes con esclerosis múltiple con antecedentes de neuritis óptica.
- IX. Relacionar el flujo vascular retiniano determinado mediante angiografía por tomografía de coherencia óptica (OCT-A) con la escala de discapacidad y la puntuación de calidad de vida en pacientes con esclerosis múltiple.
- X. Valorar la precisión del protocolo polo posterior (PPole) de tomografía de coherencia óptica (OCT) Spectralis para detectar pacientes con esclerosis múltiple en capas externas de la retina.
- XI. Estudiar la relación del espesor de capa de células ganglionares (CCG) y de la capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR) medidas mediante protocolo posterior pole (PPole) de tomografía de coherencia óptica (OCT) y la escala de discapacidad en pacientes con esclerosis múltiple.



# MATERIAL Y MÉTODOS

## 5.1 PROCEDIMIENTO

Se presenta una tesis doctoral por compendio de publicaciones. Los cuatro artículos que forman parte de esta tesis son el resultado de varios estudios transversales y no randomizados, que se llevaron a cabo en las consultas de la Unidad de Función Visual del Servicio de Oftalmología, con la participación del Servicio de Neurología del Hospital Universitario Miguel Servet 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). (Anexo III) Todos los sujetos incluidos en el estudio firmaron previamente un consentimiento informado (Anexo IV) donde se detallan las características de cada prueba que se les va a realizar y la posibilidad de abandonar el estudio voluntariamente en cualquier momento.

## 5.2 MUESTRA

A los pacientes diagnosticados de EM en el servicio de neurología del Hospital Miguel Servet se les propuso la participación voluntaria en los estudios realizados a continuación. Los pacientes y sujetos sanos reclutados firmaron previamente el consentimiento informado. (*Anexo 2*)

Se incluyeron pacientes y sujetos sanos mayores de 18 años que accedieran a firmar el consentimiento informado. Los pacientes debían tener un diagnóstico de EM-RR definido por el neurólogo.

Se excluyeron pacientes que tuvieran antecedentes de enfermedades oculares concomitantes, antecedentes de patología retiniana, glaucoma o enfermedades sistémicas que pudieran afectar a la salud visual y/o calidad de las imágenes realizadas. Los ojos con errores refractivos mayores de 5 dioptrías esféricas y/o 3 dioptrías cilíndricas, así como estrabismos y ambliopías fueron descartados.

**ARTICULO 1: Identification of clusters in multifocal electrophysiology recordings to maximize discriminant capacity (patients vs. control subjects).**

Se incluyeron 30 ojos de 15 sujetos con un diagnóstico reciente de EM-RR (< 6 meses) sin antecedentes de neuritis óptica y 12 ojos de 6 sujetos controles.

**ARTICULO 2: Empirical Mode Decomposition-Based Filter Applied to Multifocal Electroretinograms in Multiple Sclerosis Diagnosis.**

Se recogieron datos de 15 ojos derechos de pacientes con diagnóstico temprano de EM-RR sin antecedentes de neuritis óptica y 6 ojos derechos de sujetos sanos.

**ARTICULO 3: Angiography with optical coherence tomography as a biomarker in multiple sclerosis**

La muestra estuvo formada por 149 ojos de sujetos sanos y 91 ojos de pacientes diagnosticados de EM-RR.

**ARTICULO 4: Evaluation of severity and time disease of multiple sclerosis using new oct tool.**

Se incluyeron 100 ojos de pacientes diagnosticados de EM-RR sin antecedentes de neuritis óptica y 66 ojos de sujetos sanos.

### **5.3 PROTOCOLO EXPLORATORIO**

#### **5.3.1 Evaluación neurológica**

En todos los estudios, la valoración neurológica fue llevada a cabo por el Servicio de Neurología del Hospital Universitario Miguel Servet. En ella se recopilaban los siguientes datos de interés para este estudio:

- Tiempo de evolución de la enfermedad desde su confirmación diagnóstica.
- Fenotipo de EM (remitente-recurrente, primaria progresiva, o secundaria progresiva).
- Severidad y grado de afectación neurológica obtenido mediante la escala EDSS.

Para calificar las manifestaciones clínicas de EM se empleó la **escala ampliada del estado de discapacidad (EDSS) o escala de Kurtzke**, nombre del neurólogo que la desarrolló, que es la escala de afectación clínica más ampliamente aceptada.

La escala EDSS proporciona una calificación clínica ordinal, que puntúa desde 0 (un examen neurológico completamente normal) a 10 (muerte por EM) y aunque se basa principalmente en la capacidad de caminar de una persona, proporciona 8 mediciones de subescala (puntuajes del sistema funcional) que incluyen los principales dominios funcionales afectados por EM, incluyendo los sistemas piramidal, cerebeloso, tronco encefálico, sensorial, intestinal-vesical, visual, mental y otros. La acumulación de discapacidad se cuantifica en la práctica clínica con el EDSS. (Fig. 8) (Anexo 3).

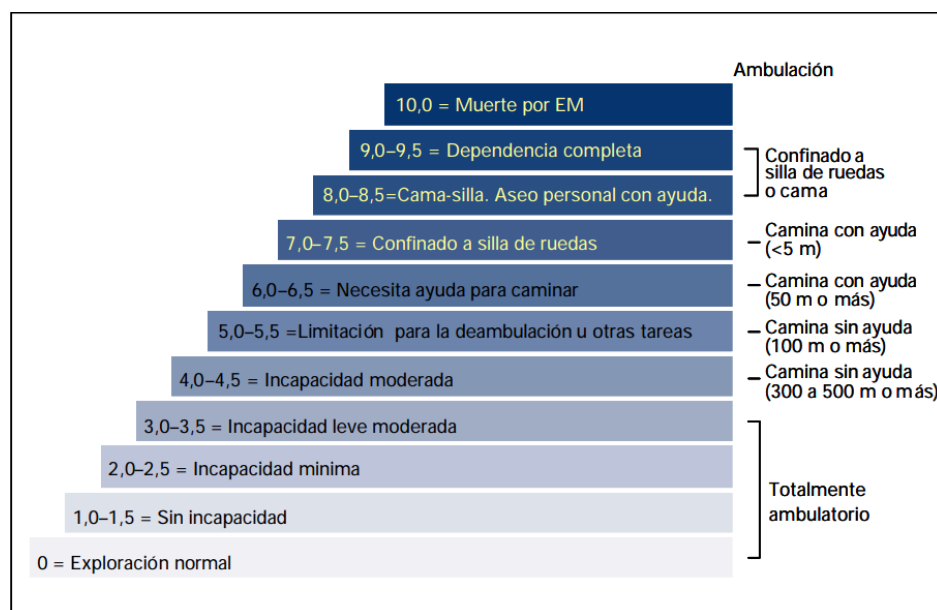


Figura 8. Escala de discapacidad de Esclerosis múltiple de 0 a 10. Extraído de (Kurtzke, 1983)

### 5.3.2 Evaluación oftalmológica

La exploración oftalmológica se llevó a cabo por un oftalmólogo del Hospital Universitario Miguel Servet, donde se confirmaba mediante las siguientes pruebas que cumplieran los criterios de inclusión/exclusión oftalmológicos propuestos para los estudios:

- Medición de la tensión intraocular con tonometría Goldman.
- Medida de longitud axial ocular.
- Exploración oftalmológica con lámpara de hendidura para evaluación de segmento anterior y opacidades de medios.
- Evaluación de fondo de ojo con oftalmoscopia directa y tomografía de coherencia óptica, para descartar hallazgos en segmento posterior del globo ocular.
- Revisión de historia y antecedentes oculares para descartar patología ocular.



- Revisión de historia médica sistémica que tuviera relación con el sistema ocular.

#### 5.3.2.1 Medida de la mejor agudeza visual corregida con optotipo ETDRS

---

Se realizó una graduación optométrica subjetiva para la posterior medida de la agudeza visual de forma monocular mediante el optotipo *Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS)*. El optotipo utilizado empleó la versión retroiluminada, que se caracteriza por tener el mismo número de letras por línea, con una diferencia de 0,1 unidades logarítmicas entre líneas; y siendo el valor de cada letra 0,02 unidades logarítmicas. La prueba se realizó a 4 metros de distancia, con la mejor corrección y en condiciones ambientales fotópicas y retroiluminación del optotipo de 85 cd/m<sup>2</sup>. (Fig. 9)



Figura 9. Optotipo caja retroiluminada ETDRS. Foto realizada en el Servicio de Oftalmología del Hospital Miguel Servet, Zaragoza.

#### 5.3.2.2 Medida de la sensibilidad al contraste con lámina Pelli Robson.

---

La medida de sensibilidad al contraste fue tomada con la lámina Pelli Robson, en la que la frecuencia espacial es constante en todas las letras (1ciclo/grado) y el contraste va decreciendo en grupos de tres letras. Se colocó al paciente a 1 metro de la prueba, en condiciones fotópicas de iluminación y de forma monocular con su mejor corrección, y se anotó el umbral de contraste del último trío de letras en la que había sido capaz de leer al menos dos letras.



*Figura 10. Test sensibilidad al contraste Pelli Robson. Foto realizada en el Servicio de Oftalmología del Hospital Miguel Servet, Zaragoza.*

#### 5.3.2.3 Evaluación de la calidad de vida en Esclerosis Múltiple a través del multiple sclerosis quality-of-life score (MSQOL-54)

---

En el tercer artículo, se realizó en consulta el cuestionario de calidad de vida a los pacientes con EM-RR. El cuestionario *Múltiple Sclerosis Quality of Life- 54* (MSQOL-54) se basa en una encuesta genérica de salud (RAND 36-Item Health 1.0) con 18 ítems adicionales específicos de la EM. (Hays et al., 1993) Consta de un total de 54 ítems: 52 repartidos en 12 dimensiones (salud física, limitaciones por problemas físicos, limitaciones por problemas emocionales, dolor, bienestar emocional, energía, percepción de salud, función social, función cognitiva, preocupación para la salud, calidad de vida en su conjunto, función sexual) más 2 ítems individuales que miden el cambio en el estado de salud (comparación de la salud actual con la de hace un año) y la satisfacción con la función sexual. Las dimensiones se puntúan de 0 a 100, donde un valor más alto indica una mejor Calidad de Vida Relacionada con la Salud. Además, se obtienen dos subtotales de salud mental y física. Se ha demostrado que el MSQOL-54 ofrece una buena consistencia interna, confiabilidad y validez teórica. (Vickrey et al., 1995)

#### 5.3.2.4 Exploración de la retina estructural mediante tomografía de coherencia óptica.

---

Para el cuarto estudio, las mediciones estructurales de la retina se obtuvieron utilizando el tomógrafo de coherencia óptica dominio espectral Spectralis OCT (Heidelberg Engineering, Alemania). La capacidad de los nuevos dispositivos de imagen para forma rápida y no invasiva

retina y nervio óptico, convierte al tejido retiniano en una ventana que permite inspeccionar una parte del SNC y del sistema vascular.

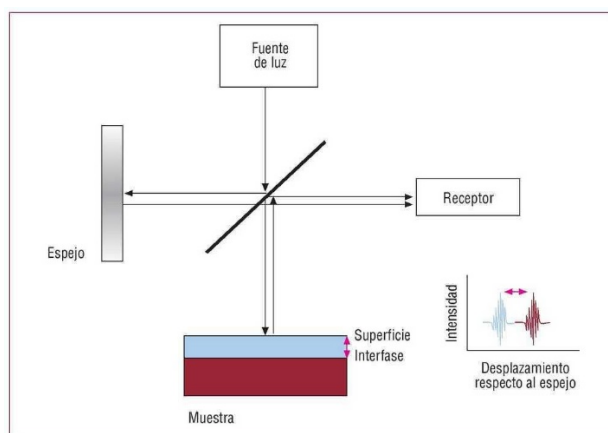
La tomografía de coherencia óptica (OCT) es una rápida técnica de imagen, no invasiva que permite cuantificar medidas objetivas in vivo de las estructuras oculares. (Huang et al., 1991) Gracias a esta técnica, conocemos la composición histológica de la retina diferenciando los distintos tejidos que la componen mediante las características ópticas propias de cada una de las capas, entre ellas el coeficiente de reflexión.

Su tecnología se basa en la técnica inventada por Albert Abraham Michelson: la interferometría de baja coherencia, propiciada por fuentes de luz de banda ancha generada por diodos super luminiscentes o láseres con pulsos extremadamente cortos (femto- o picosegundo). (Zysk et al., 2007)

La luz emitida se divide en dos haces o rayos:

- Uno en dirección al tejido a analizar que será reflejado a su vez parcialmente. Será el rayo de medida.
- Otro a un espejo de referencia, de distancia conocida y que funciona como el rayo de referencia. (Fig. 10)

La luz reflejada por el tejido se compara con la luz reflejada por el espejo de referencia. La interferencia solo ocurre cuando la diferencia de camino óptico de la luz reflejada por ambos brazos es menor que la longitud de coherencia de la fuente de luz. Las áreas que reflejan mucha luz crean una mayor interferencia que las áreas que no reflejan a penas. (Huang et al., 1991; Raffel et al., 2008)



*Figura 10. Esquema de interferometría de baja coherencia. La luz del sistema se divide en dos haces: uno hacia la muestra y el otro hacia un espejo. La imagen se obtiene al integrar las características de la luz reflejada de ambos en el receptor. Extraído de (Herrero-Garibi et al., 2010)*

La retina del ojo humano, como hemos visto anteriormente, está formada por capas semitransparentes de células, cada una de las cuales produce una reflexión de mayor o menor amplitud y a una determinada distancia, dejando pasar el resto de luz penetrando en las sucesivas capas y a su vez, reflejando cada una de las partes de la luz que le ha llegado.

Por tanto, nos permite conocer a qué profundidades se producen las reflexiones de estas capas.

La reflectividad de este patrón de profundidad axial (A-scan) reproduce la localización o profundidad del elemento de interés. Si se combinan lateralmente distintos A-scan contiguos se puede producir una tomografía de corte transversal bidimensional (B-scan). (Fig. 11) La capacidad de discriminación (resolución axial y transversal) y velocidad de captura no ha hecho sino aumentar desde los primeros aparatos de dominio temporal (TD-OCT) con cada nueva generación de la OCT dominio espectral.

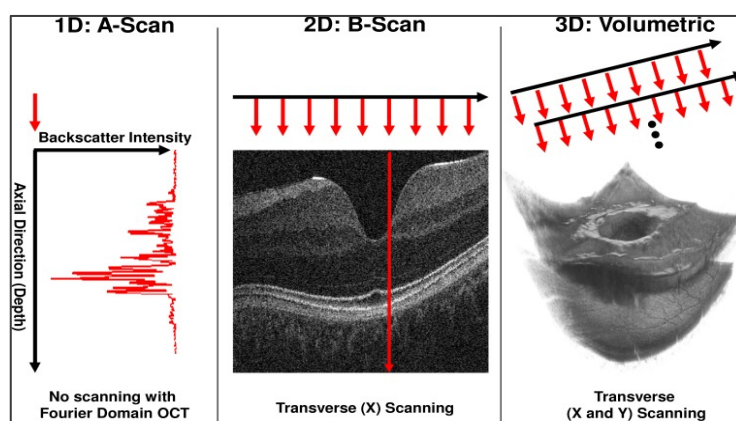


Figura 11. Imagen transversal de tomografía de coherencia óptica (B-scan) a partir de cortes A-scan. Extraído de (Kraus et al., 2012)

El tomógrafo de coherencia óptica dominio espectral Spectralis OCT (Heidelberg Engineering, Alemania) cuenta con varios protocolos de medida con diferentes análisis. En el estudio, se realizó el protocolo premium de Polo Posterior "Posterior pole" para todos los sujetos. Este protocolo incorpora el Sistema de Posicionamiento Anatómico (APS) que describe una línea horizontal entre la fovea y la entrada de la apertura de la Membrana de Bruch y, en base a esa línea de referencia, se realizan 61 exploraciones de OCT transversales paralelas (30 por encima y 30 por debajo de la línea de referencia) dentro de un área de 25°\*30°. El sistema APS junto al sistema True Track para el seguimiento ocular, garantizan una posición precisa de la mácula para cada individuo en función de la inclinación de la cabeza y la ciclorsión del ojo, y una optimización

de los artefactos por movimiento. Esto hace que el área de medida tenga como referencia su centrado y localización en la misma zona en cada paciente, lo que lo hace mucho más preciso para su comparación entre sujetos. El software de este protocolo permite una segmentación detallada de cada una de las capas de la retina.

Todas las medidas fueron realizadas por un único observador. Las imágenes con una baja calidad o imágenes con artefactos de movimiento fueron excluidas del análisis.

El espesor de la retina se muestra como un mapa de grosor codificado por colores para una rejilla centrada en la depresión foveal. La cuadrícula con un área de  $25^{\circ} \times 30^{\circ}$  se coloca simétricamente respecto al eje de la fóvea al disco para cada ojo. El área se divide en pequeños cuadrados de  $3^{\circ} \times 3^{\circ}$  áreas, que corresponden a un poco menos de un milímetro cuadrado (860micras x 860micras) de la retina, donde nos indica el espesor medio de cada capa de la retina en cada uno de esos pequeños cuadrados. La escala de colores ha sido modificada para revelar diferencias de espesor de la retina de 10 a 15  $\mu\text{m}$ , lo que permite una mejor detección de pequeñas pérdidas de espesor del tejido en los mapas de color. (Fig. 12)

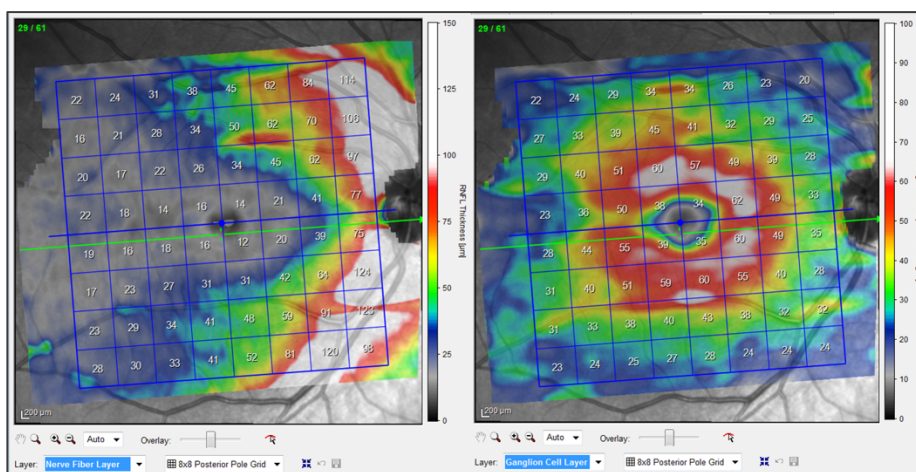


Figura 12. Análisis Posterior Pole de tomografía de coherencia óptica Spectralis. Rejilla de 64 celdas con valores de espesor de retina total, capa de fibras nerviosas de la retina y capa células ganglionares encima de mapa de color. Imagen recogida en visor Spectralis OCT Heidelberg de las consultas de Oftalmología del Hospital Miguel Servet, Zaragoza.

Una vez segmentadas las capas, se exportaron todos los datos de las celdas de la rejilla de las dos capas a analizar en el estudio; CFNR y CCG.

#### 5.3.2.5 Exploración de densidad vascular retiniana mediante angiografía por tomografía de coherencia óptica.

---

La angiografía por tomografía de coherencia óptica (OCT-A) es una técnica relativamente nueva, desarrollada en el año 2006 y basada en la tecnología de OCT. (Makita et al., 2016) Tiene la capacidad de crear imágenes gracias a la detección del movimiento de las células sanguíneas en los vasos sanguíneos. Esto se logra por medio de la sobreposición de numerosos imágenes B-scan obtenidos secuencialmente en la misma localización generando la imagen volumétrica de la OCT-A. Estos repetidos B-scan se comparan numéricamente y se calcula una señal de decorrelación que muestra cuántas estructuras han cambiado entre ellas. Trata de identificar qué cambios se deben al flujo y movimiento de los eritrocitos y cuales se deben a otros cambios como el pulso, movimientos etc. Esto nos permite visualizar en alta resolución las tres dimensiones de la vasculatura retiniana, incluyendo pequeños vasos. Con la OCT-A podemos evaluar 4 capas vasculares: (Fig. 13)

1. Red vascular superficial (capa de células ganglionares y de fibras nerviosas).
2. Red vascular profunda (capilares en medio de las capas plexiforme interna y externa).
3. Retina externa (fotorreceptores, no tiene vasos, pero sirve de referencia).
4. Coriocalilar.

Es una técnica mínimamente invasiva, muy rápida, que se puede realizar siempre que la transparencia de los medios oculares lo permita.

En el tercer estudio, utilizamos el dispositivo Sweep Source OCT Angio™ de Topcon que combina la angiografía OCT con un OCT de fuente de luz de barrido. Su tecnología Sweep Source con su longitud de onda de 1050 nm proporciona una mejor penetración en los tejidos permitiendo visualizar las capas más profundas con una buena calidad. OCTARA™ es su algoritmo de procesamiento de imágenes patentado que proporciona una detección angiográfica altamente sensible permitiendo representar las estructuras vasculares incluso en la coroides y en las capas más profundas de la retina. (Fig. 13)

Utilizamos un área de medida de 6x6mm centrado en mácula y disco óptico. Se obtuvieron los datos en una rejilla circular con valores de porcentaje de densidad vascular.

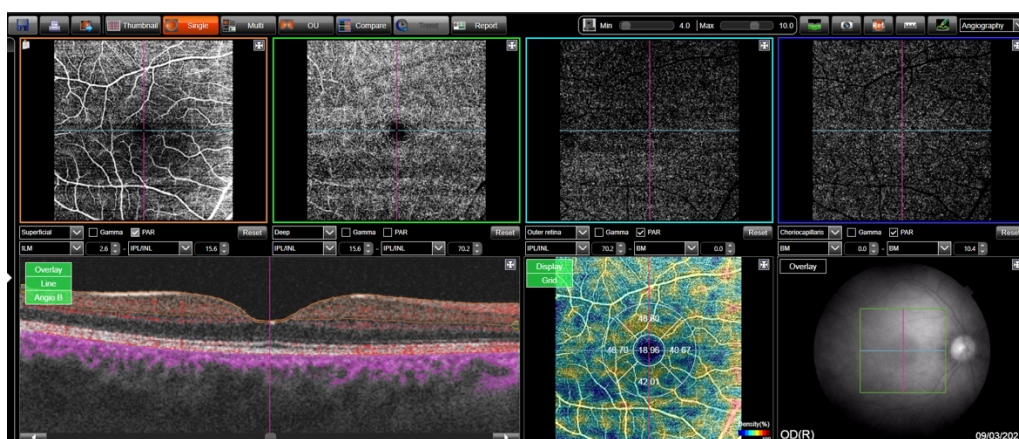


Figura 13. Análisis de las cuatro capas vasculares de la tomografía de coherencia óptica swept-source Angio de Topcon. Empezando por arriba y de izquierda a derecha: plexo superficial, plexo profundo, capa avascular y coriocalilar. Abajo corte transversal indicado en color rojo el flujo vascular. Imagen recogida en visor Triton OCT de Topcon de las consultas de Oftalmología del Hospital Miguel Servet, Zaragoza.

### 5.3.2.6 Exploración de la respuesta retiniana mediante electrorretinografía multifocal con RETIport/scan21 (Roland Consult, Germany).

Esta tesis contiene dos artículos en los que se utilizaron los datos obtenidos mediante la técnica de electrorretinograma multifocal (ERG-mf). El electrorretinograma (ERG) es un potencial de masa, que refleja la actividad eléctrica sumada de la retina. La retina y el espectro electromagnético de la luz son dos cuestiones íntimamente relacionadas. La retina es un órgano eléctricamente activo, todo el tiempo está recibiendo energía lumínica de distintos grados del espectro de luz y genera una respuesta eléctrica a estos cambios de esta luz. El ERG nos da una información muy completa del funcionamiento eléctrico de los distintos grupos celulares de la retina analizando los potenciales que hay en los distintos campos de la retina. Por tanto, el ERG es una herramienta clave para la evaluación objetiva de la función retiniana.

La técnica de ERG requiere de un fondo de iluminación, electrodos ubicados en córnea, párpados y/o cantos laterales; y un amplificador de la señal, ya que estas señales eléctricas son poco perceptibles. El ERG es un estudio de respuesta masiva de la retina. Si nosotros analizamos la concentración celular que hay de conos, bastones y células ganglionares es importante recordar que los conos están ubicados a nivel de la fóvea, las células ganglionares alrededor de la fóvea, y los bastones tienen su mayor densidad celular a medida que nos alejamos de la fóvea. Esto es importante porque a la hora de analizar las áreas de la retina tenemos que entender que, si estudiamos la zona cercana a la fóvea, estaremos estudiando los conos y células ganglionares,



mientras que, si estudiamos la zona alejada de la fovea, la respuesta analizada será debida en gran parte a los bastones. A su vez, dentro de los conos, los conos M y L (es decir conos que captan longitudes de onda mediana y larga) son los que se encuentran en la foveola, y los conos S (encargados de detectar longitud de onda corta) son los que se encuentran en la parte más periférica de la fovea. (Fig. 14.)

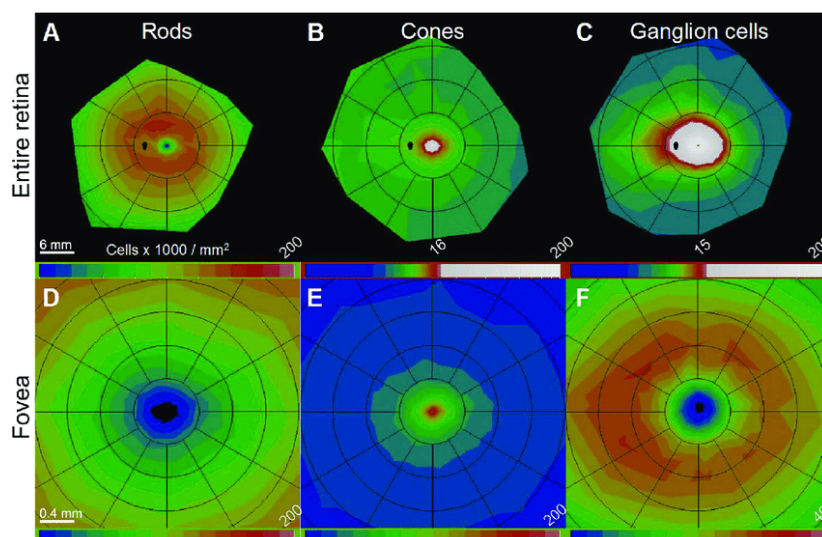


Figura 14. Topografía de fotorreceptores y células ganglionares en retina humana. Las barras de colores muestran células ( $\times 1000$ ) por  $\text{mm}^2$  en escalas lineales para A, D, E y F y en escalas no lineales para mostrar los contornos de retina periférica en B y C. Las imágenes A, B y C corresponden a un área mayor de la retina, mientras que las imágenes inferiores D, E y F corresponden a un área ampliada de la fovea. Imagen extraída de (Curcio y Allen, 1990)

Fisiológicamente existe una “corriente oscura” cuando el ojo no está estimulado por la luz, el fotorreceptor (bastón). A medida que el estímulo visual aumenta en intensidad, la corriente oscura disminuye. La luz intensa generará una saturación de los bastones y en este punto, los bastones dejan de tener una onda perceptible para el programa de ERG. Es ahí, donde tenemos la función de los conos. Las ondas que registran este cambio tienen una amplitud y un intervalo de tiempo directamente proporcional con la intensidad del estímulo lumínico. Cuando hablamos de ondas específicas tenemos la onda A específicamente de los fotorreceptores, la onda B específica de las células bipolares y existen otras ondas, como potenciales oscilatorios (células amacrinas y ganglionares).



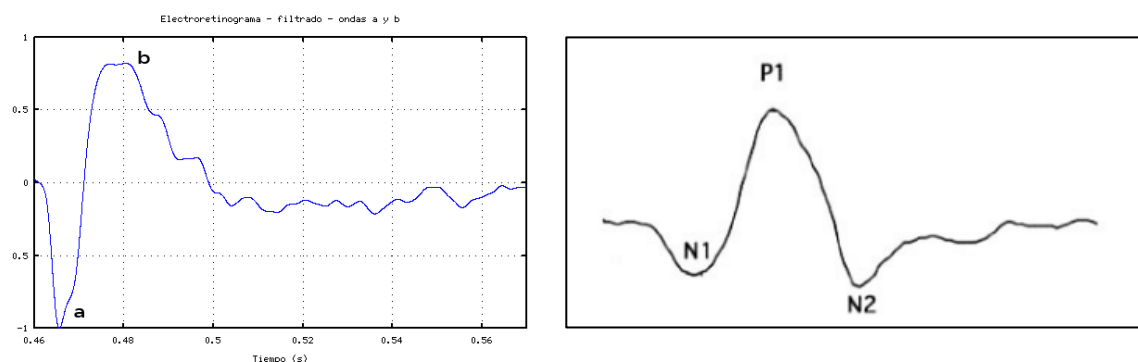


Figura 15. Izquierda.: Ondas Electrorretinograma. Onda a y onda b. Derecha.: Ondas de electroretinograma multifocal. Onda N y P. Extraído de (Pérez García et al., 2016)

El electroretinograma multifocal (ERG-mf) constituye una de las más novedosas técnicas de electrodiagnóstico a nivel ocular, permitiendo mediante el sistema de los conos, obtener un mapa objetivo de la función visual que se correlacione mejor con lesiones localizadas. (Odom JV, Leys M, 2007) Fue introducido por Sutter y Tran en 1992 (Andréasson, 2006; Sutter y Tran, 1992) y consiste en la estimulación focal simultánea de diferentes puntos en patrón en un área de entre 30 y 50º centrales de la retina para determinar la topografía del campo visual de la función retiniana. La respuesta eléctrica de cada área es totalmente independiente.

El estímulo se presenta en una pantalla de luminancia constante dividida en 61 hexágonos, de mayor superficie cuanto más periféricos, que alternan de blanco a negro de forma randomizada. El tiempo de retraso en el ciclo de estimulación de un hexágono con respecto al resto, combinado con una selección de esta secuencia de estimulación, nos da la contribución de la respuesta focal, que mediante una correlación cruzada simple y el patrón que aparece en pantalla posibilita su extracción de la señal total.

La respuesta lineal tiene una morfología parecida a las ondas explicadas anteriormente en el ERG convencional; la onda a se llama N1 inducida igualmente por los fotorreceptores, y la onda b se llama P1 formada básicamente por células bipolares partiendo igualmente que la onda b de los potenciales oscilatorios.

Al tratarse de una prueba topográfica, además de las amplitudes y latencias de la onda, obtenemos la densidad de la respuesta retiniana de cada hexágono que forma el patrón de medida. Los resultados se expresan como un mapa de ondas en el que cada onda representa la

actividad de un área del polo posterior; y también se pueden agrupar en anillos concéntricos alrededor de la fovea o en cuadrantes.

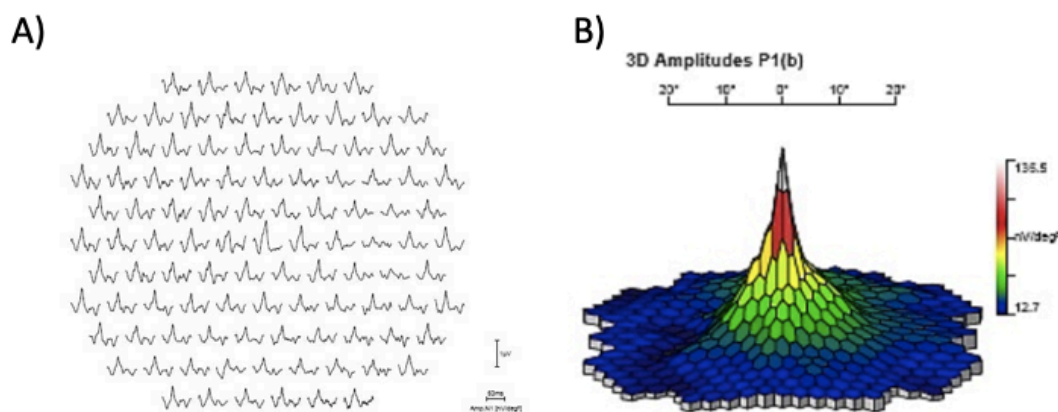


Figura 16. Presentación de ondas, topografía y distribución de hexágonos de imagen tomada del equipo RetiScan. A) Ondas de cada uno de los hexágonos. B) Resultados en un diagrama de 3D de la densidad de respuesta de cada hexágono.

Esta técnica se realizó en la Unidad de Función Visual del servicio de oftalmología, mediante el dispositivo RETI-port/scan21 (Roland-Consult, Germany) (Fig. 17) Las mediciones se registraron de forma monocular tras dilatación, con una adición de 3 dioptrías sobre su mejor corrección, en condiciones fotópicas, con una adaptación previa a la oscuridad de 10 minutos y con el paciente colocado a 28cm del monitor. Los canales activos se grabaron utilizando electrodos Dawson-Trick-Litzkow (DTL) fabricados con un alambre de nylon flexible y ligero impregnado con plata y colocado en contacto con el saco conjuntival. Los electrodos se colocaron debajo del párpado inferior, con un extremo unido al canto externo y el otro extremo unido a la altura del saco conjuntival. Se utilizaron tres electrodos cuchara, dos como electrodos de referencia colocados en cada templo y el tercero como un electrodo de tierra colocado a la altura de la nariz.

Antes de registrar las señales ERGmf, se explicó a los sujetos las características de la prueba para lograr una fijación satisfactoria. Las grabaciones fueron examinadas por un oftalmólogo experto para identificar posibles problemas relacionados con la fijación excéntrica, entre otros, antes de realizar el análisis de las señales.



Figura 17. Dispositivo Retiport Retiscan (Roland Consultant, Alemania). Extraída de (Roland Consult Stasche & Finger GmbH, s. f.)

### 5.3.3 Recogida y análisis de datos

La recogida de datos se llevó a cabo en el Hospital Miguel Servet con diferentes bases de datos dependiendo del estudio a realizar. Siempre se exportaron los datos y se trabajaron las bases de datos con hojas Excel, que posteriormente fueron analizadas mediante el programa SPSS (SPSS Inc. Chicago, IL, USA, del inglés Statistical Package for Social Sciences), en su versión 22.

En todos los artículos, se comparan datos entre sujetos sanos y pacientes con EM.

El primer artículo propone un método de agrupación de los valores de los sectores dados por el ERGmf. Para analizar estas agrupaciones, se partió de un sector y de acuerdo con unas coordenadas se fueron dando valores de área bajo la curva (area under curve AUC) de los vecinos hasta encontrar las agrupaciones que tenían un mayor valor de AUC.

En los artículos tercero y cuarto, se evaluó la normalidad de las variables con métodos estadísticos, en concreto, Test de Kolmogorov Smirnov y si la muestra era pequeña ( $n < 50$  elementos), la técnica recomendada de normalidad fue Shapiro Wilk.

En el caso de que ambos grupos presentaran una distribución normal, se realizó la prueba T-Student para comparar las medias, y en los casos en los que alguna de las dos poblaciones no tuviera una distribución normal, se usó la prueba de la U de Mann-Whitney. Los análisis de

comparación estadísticos entre varios grupos fueron realizados con ANOVA y un análisis post hoc para identificar la significatividad entre cada par de grupos.

Finalmente, las imágenes o representaciones matriciales de figuras se realizaron con MATLAB (R2020a, Mathworks, Massachusetts, EE. UU.) pudiendo realizar un mapa de contorno muy visual de la diferencia entre ambos grupos (control y EM).

#### 5.3.4 Herramientas matemáticas.

En el segundo artículo, referido a los datos obtenidos mediante la prueba de electrorretinograma, se estudiaron estos valores con herramientas matemáticas. Existen técnicas matemáticas específicas utilizadas con el objetivo de eliminar los datos que no aportan información para acentuar por otro lado las características que permitan mejorar la diferenciación entre sujetos control y sujetos afectados por la enfermedad. En esta tesis se trabajó con la Descomposición Empírica en Modos (EMD), propuesta por N.H. Huang, como una herramienta para procesar señales no lineales, no estacionarias y estocásticas, convirtiéndose en una técnica adecuada para el análisis y procesamiento de técnicas basadas en electrofisiología. En nuestro estudio, se desarrolló con datos obtenidos mediante la prueba de electrorretinograma multifocal. (Huang et al., 1998)

La esencia del método EMD consiste en que cualquier conjunto de datos complejos se puede descomponer en un número de datos finito y pequeño de funciones modo intrínseco (IMF; Intrinsic Mode Functions). Esta descomposición la realiza mediante la suma lineal de IMF oscilantes más un residuo como muestra el siguiente algoritmo (Andrade et al., 2006; Zeiler et al., 2010) (Fig. 15.):

$$x(t) = \sum_n x_n(t) + r(t)$$

Siendo  $x(t)$  la señal a descomponer, las IMFs serán las diferentes funciones modo intrínseco  $x_n(t)$  y  $r(t)$  el residuo.

- 1) Se localizan los máximos y mínimos de la señal que se va a descomponer  $x(t)$ .
- 2) Se interpolan los valores máximos para obtener la envolvente superior ( $E_s$ ).

- 3) Se interpolan los valores máximos para obtener la envolvente superior ( $E_j$ ).
- 4) Se calcula el promedio entre  $E_s$  y  $E_j$ :  $p(t) = (E_s + E_j) / 2$ .
- 5) Se resta a la señal original la media de las envolventes:  $i(t) = x(t) - p(t)$ .
- 6) Se comprueba si la señal  $i(n)$  cumple los criterios para ser una IMF.
  - a. Si no se cumple el criterio,  $x(t) = i(t)$ : se vuelve al primer punto, repitiéndose el bucle hasta que se consigue que la señal  $i(n)$  cumpla con el criterio para ser una IMF.
  - b. Si se cumple el criterio IMF1 =  $i(t)$ : el residuo  $r(t) = x(t) - i(t)$  es la nueva entrada para buscar la siguiente IMF.

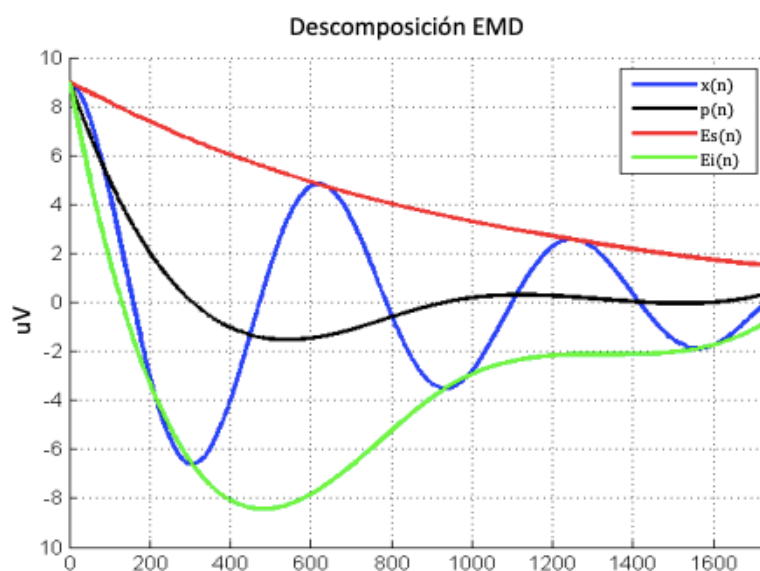


Figura 18. Ejemplo de la obtención de la primera función modo intrínseco (IMF; Intrinsic Mode Functions), para una señal  $x(n)$ . Imagen extraída de la tesis (Ortiz del Castillo, 2019)

En este estudio, se descompusieron los registros de ERGm en diferentes modos empíricos aplicando la EMD. Las primeras IMF ( $K=1, 2, \dots$ ) representan los componentes de alta frecuencia que representan los detalles, mientras que las últimas IMF muestran la información de baja frecuencia. Mediante un examen se confirmó que los cuatro primeros IMF ( $IMF_1, IMF_2, IMF_3, IMF_4$ ) contienen el 92,23% de la energía de las señales de ERGmf, siendo estos los empleados en el estudio.



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se detallan los cuatro artículos que componen la tesis con los resultados y discusión obtenidos en cada uno de ellos.

**PRIMER ARTICULO**

Del Castillo MO, Cordon B, Sánchez Morla EM, Viladés E, Rodrigo MJ, Cavaliere C, Boquete L, García-Martin E. **Identification of clusters in multifocal electrophysiology recordings to maximize discriminant capacity (patients vs. control subjects)**. Doc Ophthalmol. 2020;140(1):43-53. doi: 10.1007/s10633-019-09720-8. Epub 2019 Sep 19. PMID: 31538293.



Doc Ophthalmol  
<https://doi.org/10.1007/s10633-019-09720-8>



## ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

## Identification of clusters in multifocal electrophysiology recordings to maximize discriminant capacity (patients vs. control subjects)

M. Ortiz del Castillo · B. Cordon · E. M. Sánchez Morla · E. Vilades ·  
 M. J. Rodrigo · C. Cavaliere · L. Boquete · E. Garcia-Martin

Received: 1 June 2019 / Accepted: 4 September 2019  
 © The Author(s) 2019

### Abstract

**Purpose** To propose a new method of identifying clusters in multifocal electrophysiology (multifocal electroretinogram: mfERG; multifocal visual-evoked potential: mfVEP) that conserve the maximum capacity to discriminate between patients and control subjects.

**Methods** The theoretical framework proposed creates arbitrary  $N$ -size clusters of sectors. The capacity to discriminate between patients and control subjects is assessed by analysing the area under the receiver operator characteristic curve (AUC). As proof of concept, the method is validated using mfERG recordings taken from both eyes of control subjects ( $n = 6$ ) and from patients with multiple sclerosis ( $n = 15$ ).

**Results** Considering the amplitude of wave P1 as the analysis parameter, the maximum value of AUC = 0.7042 is obtained with  $N = 9$  sectors. Taking into account the AUC of the amplitudes and latencies of waves N1 and P1, the maximum value of the AUC = 0.6917 with  $N = 8$  clustered sectors. The greatest discriminant capacity is obtained by analysing the latency of wave P1: AUC = 0.8854 with a cluster of  $N = 12$  sectors.

**Conclusion** This paper demonstrates the effectiveness of a method able to determine the arbitrary clustering of multifocal responses that possesses the greatest capacity to discriminate between control subjects and patients when applied to the visual field of mfERG or mfVEP recordings. The method may prove helpful in diagnosing any disease that is

M. O. del Castillo · C. Cavaliere · L. Boquete  
 Biomedical Engineering Group, Electronics Department,  
 University of Alcalá, Alcalá de Henares, Spain

B. Cordon · E. Vilades · M. J. Rodrigo ·  
 E. Garcia-Martin  
 Ophthalmology Department, Miguel Servet University  
 Hospital, Zaragoza, Spain

B. Cordon · E. Vilades · M. J. Rodrigo (✉) ·  
 E. Garcia-Martin  
 Aragon Institute for Health Research (IIS Aragon),  
 Miguel Servet Ophthalmology Innovation and Research  
 Group (GIMSO), University of Zaragoza,  
 50009 Zaragoza, Spain  
 e-mail: mariajesusrodrigo@hotmail.es

E. M. Sánchez Morla  
 12 de Octubre University Hospital Research Institute  
 (i + 12), Madrid, Spain

E. M. Sánchez Morla  
 Faculty of Medicine, Complutense University of Madrid,  
 Madrid, Spain

L. Boquete · E. Garcia-Martin  
 RETICS: Thematic Networks for Co-operative Research  
 in Health for Ocular Diseases, Barcelona, Spain

M. O. del Castillo  
 School of Physics, University of Melbourne, Melbourne,  
 VIC 3010, Australia

Published online: 19 September 2019

Springer

identifiable in patients' mfERG or mfVEP recordings and is extensible to other clinical tests, such as optical coherence tomography.

**Keywords** Multifocal electroretinogram · Multifocal visual-evoked potential · Multiple sclerosis · Visual field

## Introduction

Multifocal visual-evoked potentials make it possible to obtain the individual responses produced in either the retina (multifocal electroretinogram: mfERG) or at cortical level (multifocal visual-evoked potential: mfVEP) by light excitation of a large number of sectors of the visual field (typically between 60 and 120).

The basic principles of the multifocal visual excitation technique are the result of research [1] into pseudorandom sequences conducted in the 1990s. Subsequent advances have facilitated its application in research and clinical environments [2].

These responses can be studied individually by sector, although the signal-to-noise ratio improves and the analysis time decreases if the responses are studied by cluster of sectors. Another advantage of the clustering approach is that it facilitates clinical topographic interpretation of the results.

The guidelines on mfERG [3] indicate the possibility of clustering the responses by quadrant, hemiretinal area, normal and abnormal regions of two eyes, or successive rings from centre to periphery. Responses from stimulus sectors associated with a local area of interest can be averaged for comparison with a similar area in an unaffected eye or with data from control subjects.

In a large number of publications, clustering by ring is used to analyse mfERG recordings, especially in diseases that produce altered responses with approximate radial symmetry. Examples include [4] (for diagnosis of glaucoma) and [5] (for identifying retinal toxicity due to treatment with hydroxychloroquine). Another study [6] concludes that using the central ring in mfERGs is an appropriately sensitive technique with which to study the progression of age-related macular degeneration over short periods of time.

Analysis by quadrant makes it possible to carry out comparisons between mfERG studies and optical coherence tomography (OCT) [7, 8]. It is also common to find the results of clustering by ring and quadrant in publications that analyse the technical aspects of mfERG [9, 10]. More recently, [11] detected altered responses in clustering by ring and quadrant in patients with nasopharyngeal carcinoma after radiotherapy.

Due to the irregular structure of the eye, which lacks symmetry of any kind, there is no basis for arguing that the predefined regions are in all cases those that possess the greatest capacity to discriminate between patients and control subjects. We therefore hypothesize that maximum affection by a particular disease can present in any cluster within the visual field and can have an arbitrary shape and size and may not necessarily present in rings, quadrants or hemispheres.

To date, guidelines for mfVEP procedures have not been published. Clustering of mfVEP responses in various eccentric rings makes it possible to identify patients with multiple sclerosis (MS) [12, 13]. Analysis of mfVEP responses in the inner ( $0.87^{\circ}$ – $5.67^{\circ}$ ) and outer rings ( $5.68^{\circ}$ – $24^{\circ}$ ) is proposed as a method for assessing optic nerve dysfunction in patients with optic disc drusen [14]. The best results achieved in implementing computer-aided diagnosis of multiple sclerosis are obtained by analysing the characteristics of the mfVEP responses when clustered by ring [15]. Clustering mfVEP responses in quadrants are useful in the study of amblyopic eyes [16] or for comparing OCT against mfVEP [17], [18].

The purpose of this paper is to propose a method of grouping the multifocal visual responses with the greatest capacity to discriminate between control subjects and patients affected by any disease identifiable in these responses. This grouping technique can be used for any pathology with neuroretinal or macular impact, and can be applied to various electrophysiological techniques (both in isolation and in combination).

This paper analyses mfERG signals in a comparative cohort of control subjects and patients affected by MS. Although MS is not an ophthalmological disease per se, eye function is very frequently affected. Moreover, as a neurodegenerative disease, MS-derived damage to the retinal nerve fibre layer (RNFL)

has been detected using OCT, reflecting the progressive axonal damage caused by the development of the disease which, in addition, has been linked to patient disability, even in those without a history of optic neuritis [19–21].

This paper also evaluates the diagnostic capacity of mfERG sector clustering, a technique that has been shown to be effective with mfVEP recordings.

## Materials and methods

### Patients and method

The system proposed may be used for any multifocal electrophysiology technique (e.g. mfERG or mfVEP) and for diagnosing any type of disease. In this paper, as proof of concept, the method may be useful to diagnose multiple sclerosis (MS) from mfERG recordings.

### Subject database and mfERG acquisition

The study procedures were performed in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki, and ethical approval was obtained from the local ethics committee [Aragón Clinical Research Ethics Committee (CEICA, Zaragoza, Spain)]. All subjects were over the age of 18 and signed informed consent prior to study procedures.

The mfERG recordings from both eyes of 15 subjects (mean age  $44.46 \pm 8.24$ , M:F = 4:11,  $n = 30$  eyes) with newly diagnosed MS (less than 6 months) and no history of optic neuritis, and those from six control subjects (mean age  $35.83 \pm 10.65$ , M:F = 3:3,  $n = 12$  eyes), were used.

A complete neuro-ophthalmic examination was performed on all subjects in order to detect any ocular alteration that might affect functional vision or mfERG results. MS was diagnosed based on the 2010 revision of the McDonald Criteria [22]. The patients had no concomitant ocular diseases, nor any previous history of retinal pathology, glaucoma or significant refractive errors (more than 5 dioptres of spherical equivalent refraction or 3 dioptres of astigmatism), strabism or systemic conditions that could affect the visual system.

The mfERGs were recorded using the RETI-port/scan 21 (Roland Consult, Berlin, Germany) visual

electrophysiology system, according to the ISCEV standard [3]. The stimulus array consisted of 61 sectors, arranged hexagonally, displayed at a 60-Hz frame rate. The luminance of each sector was independently alternated between black ( $< 2 \text{ cd/m}^2$  of luminance) and white ( $200 \text{ cd/m}^2$  of luminance) according to a pseudorandom binary  $m$ -sequence. The active channels were recorded using Dawson–Trick–Litzkow (DTL) electrodes fabricated from a flexible, lightweight nylon wire impregnated with silver and placed in contact with the conjunctival sac. The electrodes were placed below the lower eyelid, with one end being attached to the external canthus and the other end being attached at the height of the conjunctival sac. Three spoon electrodes were used, two as reference electrodes placed on each temple and the third as an earth electrode placed at the height of the nasion. An amplifier with  $10^4$  gain and 10–200 Hz bandwidth was used. The signals were digitized at a sample rate of 1017 samples/s, with the number of samples from each signal being 84 (82.61 ms long). The first-order mfERG kernel was analysed.

Before recording the mfERG signals, the characteristics of the test were explained to the subjects in order to achieve satisfactory fixation. During the test, both the acquisition device and the staff monitored the recordings to ensure that they were taken correctly. The recordings were examined by an expert ophthalmologist to identify potential issues relating to eccentric fixation, among others, before conducting a blind analysis of the signals.

### Clustering

The method proposed requires the following inputs:

- A database of multifocal recordings taken from patients (MS) and control subjects.
- Definition of one or more parameters used to evaluate the capacity to discriminate between patients and control subjects. For mfERG records, potential parameters could be wave amplitude ( $A_{N1}$ ,  $A_{P1}$ ), latencies ( $L_{N1}$ ,  $L_{P1}$ ) or other suitable parameters (for example, obtained from the signals' decomposition wavelet).
- In order to obtain a minimum signal-to-noise ratio value, each cluster is considered to comprise at least  $N_{\text{MIN}} = 5$  sectors. The maximum number of

sectors in a possible cluster is equal to the number of sectors in the visual field:  $N_{MAX}$ .

- The capacity to discriminate between patients and control subjects is evaluated using the area under the receiver operator characteristic curve (AUC). The AUC can be taken from one of the parameters or from the mean value of several.

#### Definition of valid clusters

Given a value of  $N$  ( $N_{MIN} = 5 \leq N \leq N_{MAX} = 61$ ), a cluster defined as valid contains  $N$ -contiguous sectors (i.e. all the sectors belonging to the cluster are adjacent to at least two others in the cluster). Figure 1a shows two valid clusters while Fig. 1b shows two invalid clusters. In both cases,  $N = 7$ .

All possible sector clusters were analysed as per the conditions described above, including conventional clustering by ring, with the exception of Ring 1, which comprises a single sector.

#### Implementation of the method

Drawing on the database of patients and control subjects, for every value of  $N$  ( $N_{MIN} \leq N \leq N_{MAX}$ ): (i) the valid clusters are identified; (ii) the mean of the multifocal responses of the sectors that comprise the cluster is calculated; (iii) the parameter or parameters of interest are obtained from the mean signal; (iv) the AUC between patients and control subjects is calculated; and (v) if the value of the AUC is the highest obtained so far, its details ( $N$  value, cluster identification) are saved until the procedure is completed.

It is possible to analyse two or more of the recordings' parameters. To do so, the value of the AUC must be obtained for each of them. For example, Eq. (1) shows the AUC for the mean value of the amplitudes; Eq. (2) shows the mean value of the AUC obtained in analysis of the latencies; and Eq. (3) shows the mean value of the joint analysis of those 4 parameters.

$$AUC_{AMP} = \frac{AUC_{AP1} + AUC_{AN1}}{2} \quad (1)$$

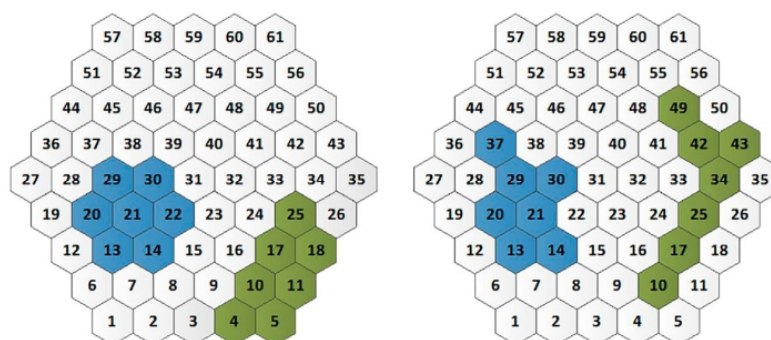
$$AUC_{LAT} = \frac{AUC_{LP1} + AUC_{LN1}}{2} \quad (2)$$

$$AUC_{MEDIA} = \frac{AUC_{AP1} + AUC_{AN1} + AUC_{LP1} + AUC_{LN1}}{4} \quad (3)$$

It would also be possible to apply a different weighting to the partial AUC values that make up the overall AUC. Equation (4) shows a hypothetical case in which the discriminant capacity of the latencies is prioritised over that of the amplitudes.

$$AUC_{GLOBAL} = 0.2 * AUC_{AP1} + 0.2 * AUC_{AN1} + 0.3 * AUC_{LP1} + 0.3 * AUC_{LN1} \quad (4)$$

The arranged hexagonal sectors of the mfERG response are codified with the system of coordinates ( $q, r$ ) shown in Fig. 2. The central sector (number 31) has the coordinates ( $q = 0, r = 0$ ). These coordinates are able to efficiently codify the six neighbouring sectors for every single hexagon (each hexagon has six equidistant neighbours). As example,  $q$  and  $r$  positive



**Fig. 1** Examples of possible clusters ( $N = 7$ ). **a** Valid clusters. **b** Invalid clusters



values from Fig. 2 codify sectors nearly corresponding to the inferior nasal quadrant.

Figure 3 shows the flowchart of the method implemented. For all  $N$  values between  $N_{\text{MIN}}$  and  $N_{\text{MAX}}$ , a search is conducted for all  $N$ -size clusters, taking each of the 61 sectors (Si) as a seed. In Step 1, the coordinates of the seed sector are obtained as per Fig. 2, while in Step 2, all the  $N$ -size clusters originating in sector Si are obtained. The condition of Step 3 dictates that for every hexagon in the cluster analysed there must be at least two other hexagons at a distance equal to 1. The distance between two hexagons ( $H_1$ ,  $H_2$ ) in the system of coordinates proposed is calculated as follows:

$$D(H_1, H_2) = \frac{|q_1 - q_2| + |(q_1 + r_1) - (q_2 + r_2)| + |r_1 - r_2|}{2} \quad (5)$$

If the cluster fulfils the conditions, the signals of the sectors are averaged in both the control subjects and the patients and the value of the AUC (Step 4) is obtained until it is verified that all possibilities have been analysed (Step 5).

The number of clusters formed and analysed depends on the  $N$ -size. For example, for a value of  $N = 5$ , a total of 2 217 groups is analysed, while for a value of  $N = 7$  the number of groups analysed rises to 26 224.

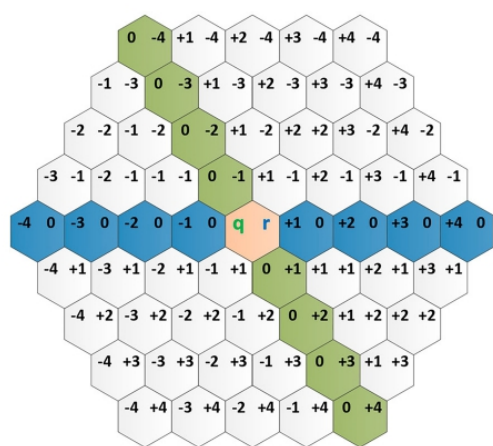


Fig. 2 System of coordinates used to find clusters

## Results

Table 1 shows the AUC values obtained from conventional analysis by ring. Although clustering by ring (except Ring 1) is considered in cluster formation, these results make it possible to evaluate the advantages of the method proposed.

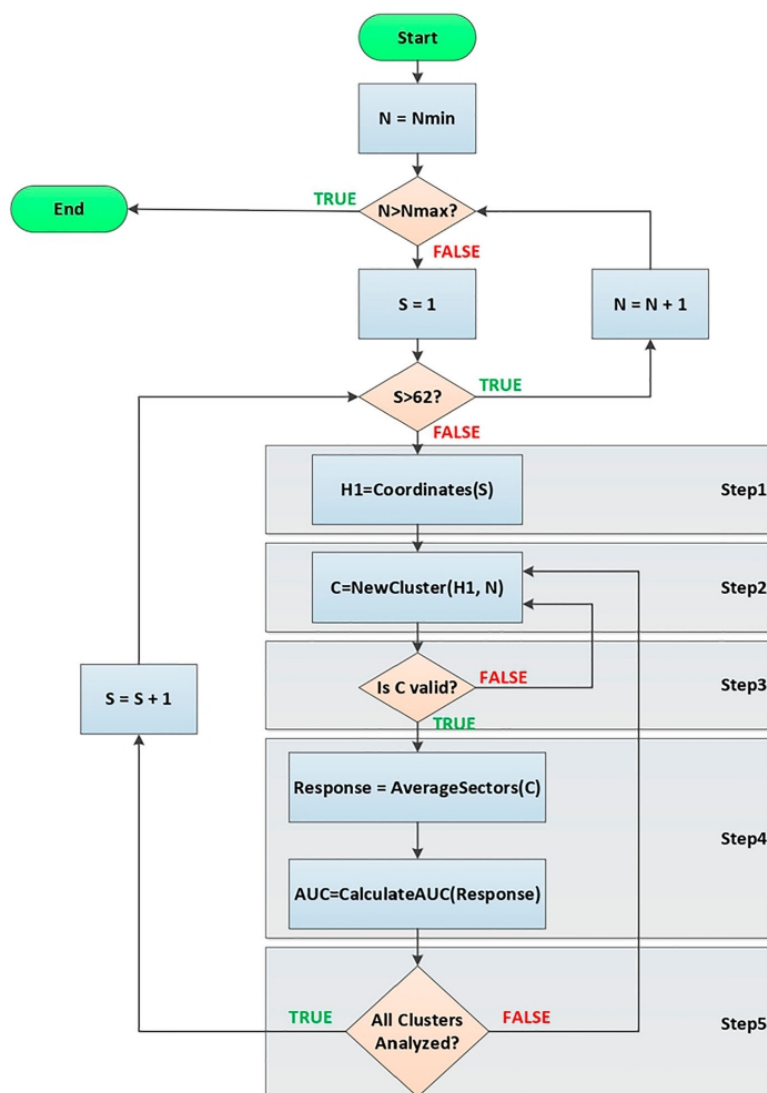
Figure 4 shows the clusters with greatest discriminant capacity ( $N = 5 \dots N = 16$ ), considering the amplitude of wave P1 ( $A_{P1}$ ) as the mfERG signal analysis parameter. The greatest discriminant value is obtained for  $N = 9$  ( $AUC_{(A_{P1}, N=9)} = 0.7042$ ), located in the inferior perifoveal quadrant (Rings 2, 3). For values of  $N > 16$ , the AUC values obtained continue to decrease.

Figure 5 shows the results produced by several clusters, taking into account the four parameters (amplitudes and latencies of waves N1 and P1), and therefore, Eq. (3). According to this criterion, the maximum capacity to discriminate between patients with MS and control subjects is  $AUC_{(A_{N1}, A_{P1}, L_{N1}, L_{P1}, N=8)} = 0.6917$ . The AUC values obtained for  $N > 16$  are less than 0.6917.

In recent publications, [10] and [23] observed that the latency of wave P1 is higher in MS patients. Figure 6 shows the results for this parameter, with the greatest discriminant capacity being  $AUC_{(L_{P1}, N=12)} = 0.8854$ , which corresponds to the nasal perifoveal area. In this case as well, clusters comprising more than 16 sectors do not obtain better AUC values.

## Discussion

One of the advantages of the multifocal electrophysiology techniques is that they obtain a high number of responses in the visual field. However, in order to obtain a clear clinical interpretation of the results, it is necessary to apply clustering methods to the responses. Although studies usually group responses into predetermined shapes (rings and quadrants) and sizes (number of sectors) depending on the technique used and the disease to diagnose, it may be beneficial to identify clusters of arbitrary shapes and sizes. When analysing multifocal visual responses, it is very common to use pre-established cluster shapes (e.g. rings, quadrants or hemispheres). With our method, all

**Fig. 3** Flowchart of the proposed method

possible options within the visual field are automatically and arbitrarily explored on the understanding that, for some signals and diseases, the optimal analysis areas do not necessarily coincide with pre-established clusters.

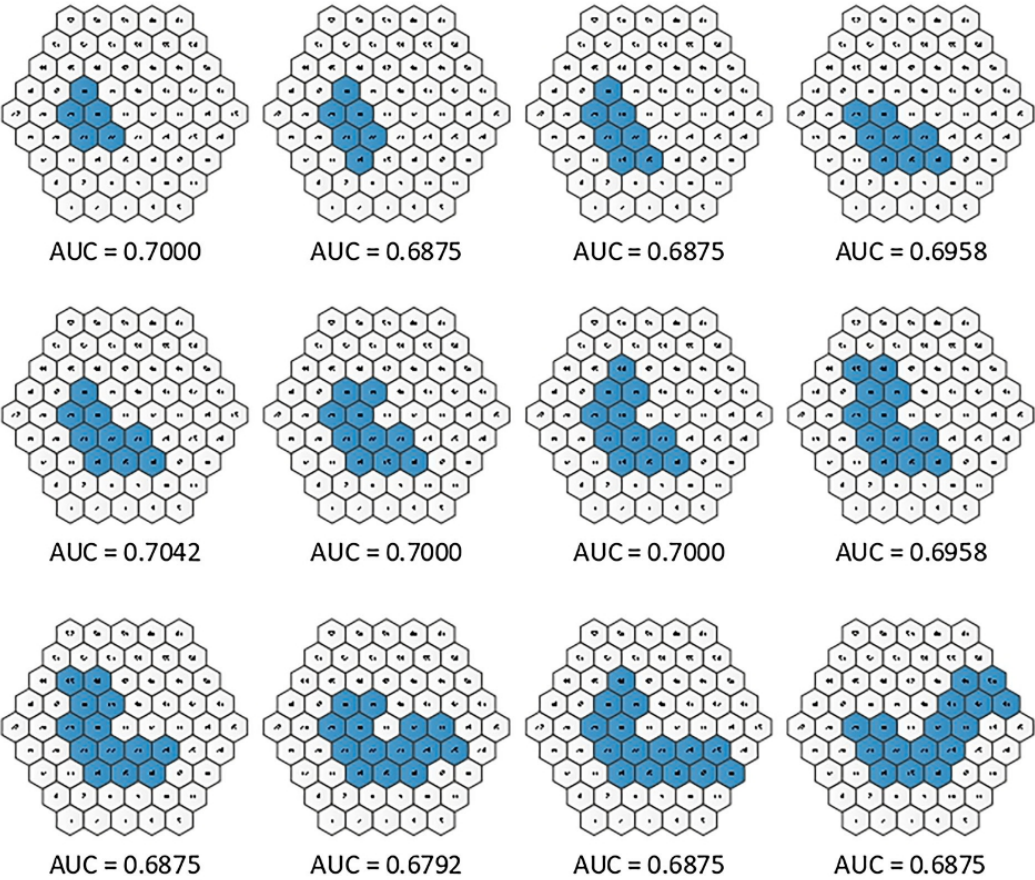
This article proposes an automatic method of selecting those areas of a topographic map of multifocal visual responses that present the greatest differences between patients and control subjects. The

method seeks the zone with greatest discriminant capacity, exceeding the AUC values obtained from clustering by ring (Table 1). Its efficacy in diagnosing MS from mfERG signals and using the amplitude and latency parameters of the first-order kernel responses to perform analysis has been demonstrated.

Among the options tested in our database, the highest AUC value is obtained by analysing the latency of wave P1 ( $AUC_{(L_{P1}, N=12)} = 0.8854$ ); this

**Table 1** AUC values obtained from analysis by ring

Region	Sectors	$AUC_{Ap1}$	$AUC_{\frac{A_{S1}+A_{P1}+L_{S1}+L_{P1}}{4}}$	$AUC_{L_{P1}}$
Ring 1	31	0.5958	0.5526	0.5771
Ring 2	22,23,30,32,39,40	0.5917	0.6115	0.6938
Ring 3	14,15,16,21,24,29,33,38,41,46,47,48	0.6417	0.5994	0.5854
Ring 4	7,8,9,10,13,17,20,25,28,34,37,42,45,49,52,53,54,55	0.5125	0.5328	0.5438
Ring 5	1,2,3,4,5,6,11,12,18,19,26,27,36,37,43,44,50,51,56,57,58,59,60,61	0.5708	0.6037	0.6896

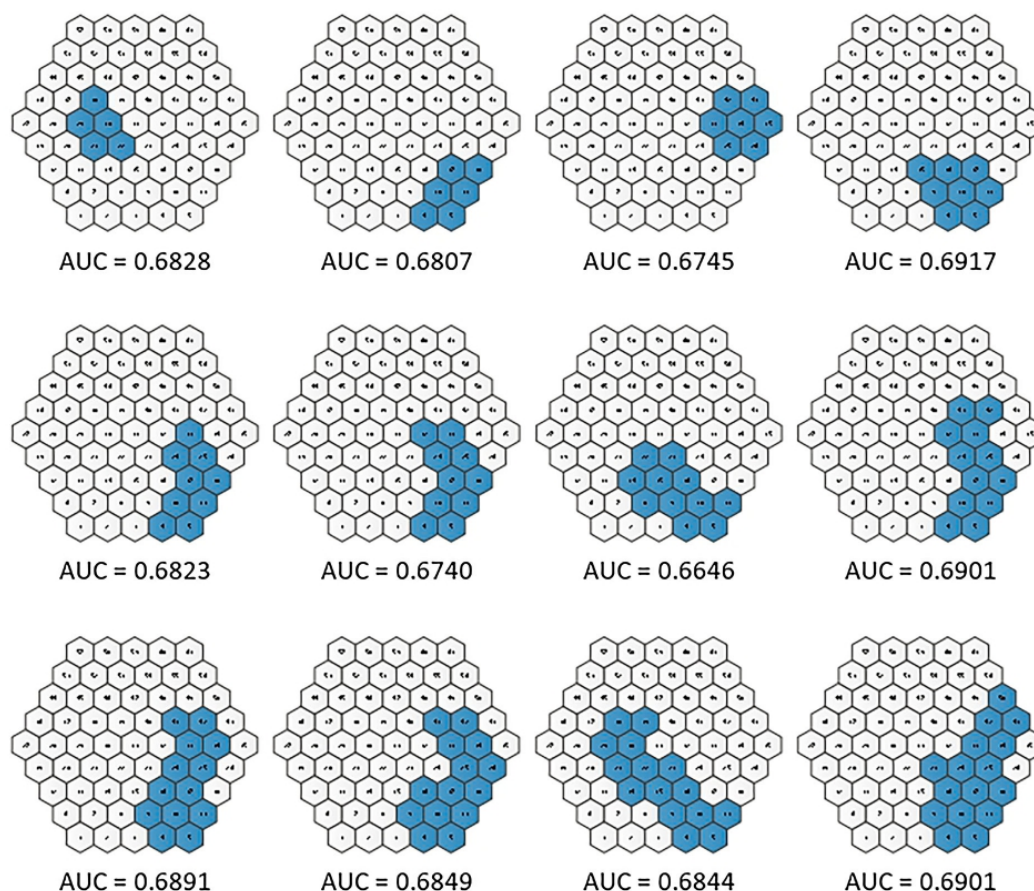


**Fig. 4** Algorithm performance in selecting the best cluster for parameter  $A_{p1}$

result is in agreement with [10] and [23]. Also, for our database, the highest AUC values were obtained by analysing clusters with fewer than 16 sectors.

The potential uses of the method proposed are listed below:

- With multifocal visual-evoked potentials, it can be used to analyse mfERG, mfVEP or mfPERG



**Fig. 5** Changes in the clusters, taking into account the maximum discriminant value for the mean of the two amplitudes and two latencies of waves N1 and P1

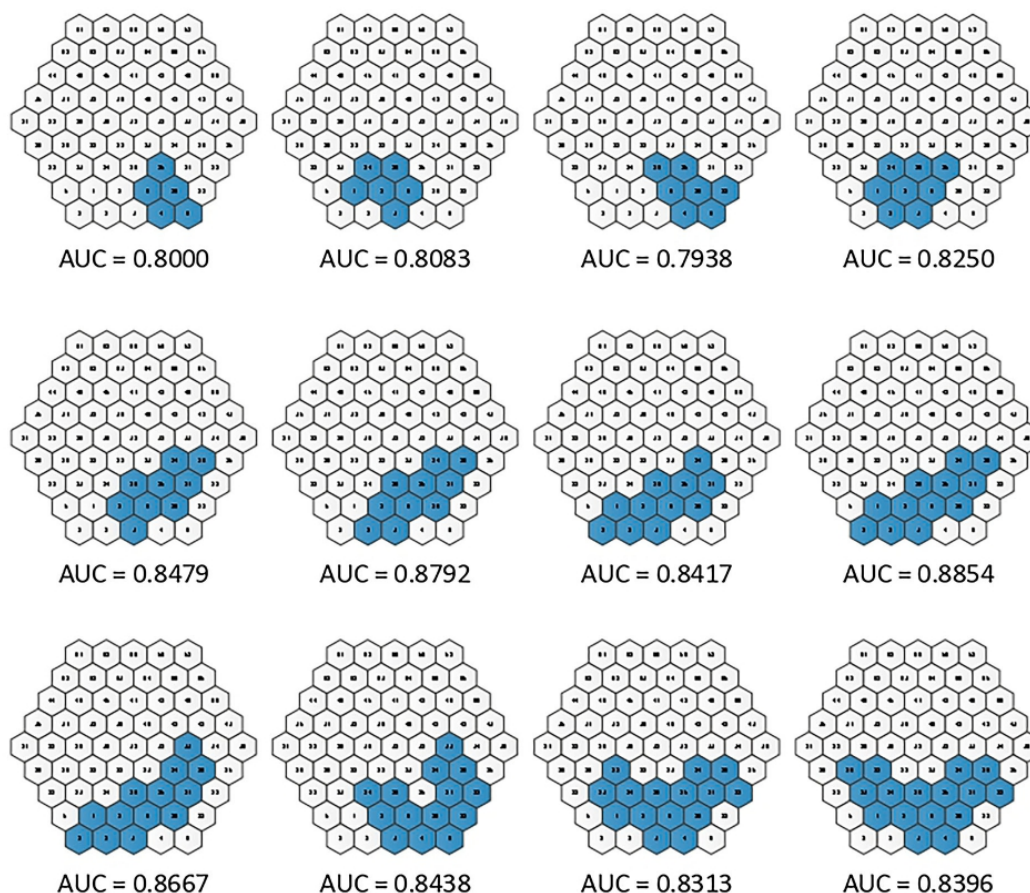
signals and can even be used to analyse areas of the automated perimetry. In general, it is applicable to any sector-based technique.

- The method is valid for any type of disease (MS, glaucoma, etc.) identifiable in these types of recordings.
- The AUC of one or several valid analysis parameters can be used. If the AUC is obtained from more than two parameters, each of them can be weighted with different coefficients.
- In studies of temporal evolution, the method can also be effective in detecting the region in which the most significant alterations appear.

It is also feasible to use it to analyse other types of tests, such as OCT. In line with this, [24] detects the retinal nerve fibre layer (RNFL) thicknesses found in angular sectors, which offer the best capacity for diagnosis in glaucoma patients.

With the method proposed in this paper it would be possible to determine which regions (of arbitrary shapes and sizes) are the most relevant for diagnosis. For example, with a Triton device with SS-OCT technology, it is possible to obtain grids of up to 60 \* 45 points of measurement of the thickness of various layers of the retina. Detecting the areas





**Fig. 6** AUC results for clusters identified using latency P1

suffering greatest alteration would be performed as follows:

- For one of the layers of the retina for which thickness measurements are available (e.g. RNFL), cells or basic sectors are formed. For example, if each cell comprises  $5 * 5$  measurements,  $N_{MAX} = 108$  sectors would be obtained.
- The mean value of the thickness in each of the sectors defined is then calculated.
- Starting from a minimum  $N$  value, a search is conducted for coherent cell clusters up to a maximum size of  $N_{MAX}$ . As the cells are square, it may be beneficial to consider that, to qualify as a valid cluster, all the cells should be adjacent to at least one other cell in the cluster. For each of the

valid clusters, the AUC is calculated and the algorithm selects the cluster and the  $N$  value with the highest AUC.

Our method found clusters that differentiated, with a high AUC, between patients with MS (as proof of concept) and healthy control subjects. However, because of the small size of our database, it is not possible to affirm that the clusters identified as having greatest discriminant capacity are specific to this disease. Our group considers it worthwhile to corroborate the results with further studies involving a higher number of patients and to compare them with other diseases. In such case, if it were possible to obtain a specific cluster for each disease, it would be possible to diagnose and monitor each of them individually. In

this regard, the clusters found in MS could be used as a valuable means of strengthening diagnosis or confirming non-definitive suspicions raised in earlier phases, such as when MRI does not reveal any damage.

In conclusion, this paper opens up the opportunity to identify sectors and clusters other than those arbitrarily chosen by the equipment manufacturer, basing them on the actual topographical affectation of a particular pathology at neuroretinal and cell level. This will enable better understanding of the physiopathological mechanisms of the diseases and expedite early diagnosis of them, which is the main objective of electrophysiological tests.

**Acknowledgements** 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] and RETICS Ofited, RD16/0008/020 to RB and LB and RD16/0008/029 to EGM.

**Funding** This study was funded by Grants PI17/01726, DPI2017-88438-R, RD16/0008/020 and RD16/0008/029.

**Data availability** The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

#### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical approval** All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee [Aragón Clinical Research Ethics Committee (CEICA, Zaragoza, Spain)] and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

**Statement of human rights** The study has been approved by local ethics committee [Aragón Clinical Research Ethics Committee (CEICA, Zaragoza, Spain)], and it was conducted in accordance to the Helsinki Declaration.

**Statement on the welfare of animals** This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.

**Informed consent** Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

**Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

#### References

1. Sutter EE (1991) The fast m -Transform: a fast computation of cross-correlations with binary m -Sequences. *SIAM J Comput* 20:686–694. <https://doi.org/10.1137/0220043>
2. Müller PL, Meigen T (2016) M-sequences in ophthalmic electrophysiology. *J Vis* 16:15. <https://doi.org/10.1167/16.1.15>
3. Hood DC, Bach M, Brigell M et al (2012) ISCEV standard for clinical multifocal electroretinography (mfERG) (2011 edition). *Doc Ophthalmol* 124:1–13. <https://doi.org/10.1007/s10633-011-9296-8>
4. Stiefelmeyer S, Neubauer AS, Berninger T et al (2004) The multifocal pattern electroretinogram in glaucoma. *Vis Res* 44:103–112. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2003.08.012>
5. Arndt C, Costantini M, Chiquet C et al (2018) Comparison between multifocal ERG and C-Scan SD-OCT (“en face” OCT) in patients with a suspicion of antimalarial retinal toxicity: preliminary results. *Doc Ophthalmol* 136:97–111. <https://doi.org/10.1007/s10633-018-9625-2>
6. González-García E, Vilela C, Navea A et al (2016) Electrophysiological and clinical tests in dry age-related macular degeneration follow-up: differences between mfERG and OCT. *Doc Ophthalmol* 133:31–39. <https://doi.org/10.1007/s10633-016-9545-y>
7. Cascavilla ML, Parisi V, Triolo G et al (2018) Retinal dysfunction characterizes subtypes of dominant optic atrophy. *Acta Ophthalmol* 96:e156–e163. <https://doi.org/10.1111/aos.13557>
8. de Araújo RB, Oyamada MK, Zacharias LC et al (2017) Morphological and functional inner and outer retinal layer abnormalities in eyes with permanent temporal hemianopia from chiasmal compression. *Front Neurol* 8:619. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00619>
9. García-García Á, Muñoz-Negrete FJ, Rebolledo G (2016) Variability of the multifocal electroretinogram based on the type and position of the electrode. *Doc Ophthalmol* 133:99–108. <https://doi.org/10.1007/s10633-016-9560-z>
10. Neroev VV, Eliseeva EK, Zueva MV et al (2016) Demyelinating optic neuritis: optical coherence tomography and multifocal electroretinography data correlation. *Hum Physiol* 42:879–884. <https://doi.org/10.1134/S0362119716080090>
11. Gong H, Tang Y, Xiao J et al (2019) Evaluation of early changes of macular function and morphology by multifocal electroretinograms in patients with nasopharyngeal carcinoma after radiotherapy. *Doc Ophthalmol* 138:137–145. <https://doi.org/10.1007/s10633-019-09678-7>
12. Laron M, Cheng H, Zhang B, Frishman LJ (2009) The effect of eccentricity on the contrast response function of

- multifocal visual evoked potentials (mfVEPs). *Vis Res* 49:1711–1716. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2009.03.021>
13. De Santiago L, Ortiz del Castillo M, Blanco R et al (2016) A signal-to-noise-ratio-based analysis of multifocal visual-evoked potentials in multiple sclerosis risk assessment. *Clin Neurophysiol* 127:1574–1580. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2015.09.129>
  14. Malmqvist L, de Santiago L, Boquete L, Hamann S (2017) Multifocal visual evoked potentials for quantifying optic nerve dysfunction in patients with optic disc drusen. *Acta Ophthalmol* 95:357–362. <https://doi.org/10.1111/aos.13347>
  15. de Santiago L, Sánchez Morla EM, Ortiz M et al (2019) A computer-aided diagnosis of multiple sclerosis based on mfVEP recordings. *PLoS ONE* 14:e0214662. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214662>
  16. Jang J, Kyung SE (2018) Assessing amblyopia treatment using multifocal visual evoked potentials. *BMC Ophthalmol* 18:196. <https://doi.org/10.1186/s12886-018-0877-0>
  17. Qiao N, Zhang Y, Ye Z et al (2015) Comparison of multifocal visual evoked potential, static automated perimetry, and optical coherence tomography findings for assessing visual pathways in patients with pituitary adenomas. *Pituitary* 18:598–603. <https://doi.org/10.1007/s11102-014-0613-6>
  18. Sousa RM, Oyamada MK, Cunha LP, Monteiro MLR (2017) Multifocal visual evoked potential in eyes with temporal hemianopia from chiasmal compression: correlation with standard automated perimetry and OCT findings. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 58:4436–4449. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-21529>
  19. Zaveri MS, Conger A, Salter A et al (2008) Retinal imaging by laser polarimetry and optical coherence tomography evidence of axonal degeneration in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 65:924–928. <https://doi.org/10.1001/archneur.65.7.924>
  20. Ayhan Z, Yaman A (2018) What does optical coherence tomography offer for evaluating physical disability in patients with multiple sclerosis? *Noro Psikiyatr Ars* 55:S37–S40. <https://doi.org/10.29399/npa.23327>
  21. Garcia-Martin E, Ara JR, Martin J et al (2017) Retinal and optic nerve degeneration in patients with multiple sclerosis followed up for 5 years. *Ophthalmology* 124:688–696. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2017.01.005>
  22. Polman CH, Reingold SC, Banwell B et al (2011) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 69:292–302. <https://doi.org/10.1002/ana.22366>
  23. Hanson JVM, Hediger M, Manogaran P et al (2018) Outer retinal dysfunction in the absence of structural abnormalities in multiple sclerosis. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 59:549. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-22821>
  24. Larrosa JM, Polo V, Ferreras A et al (2015) Neural network analysis of different segmentation strategies of nerve fiber layer assessment for glaucoma diagnosis. *J Glaucoma* 24:672–678. <https://doi.org/10.1097/IJG.0000000000000071>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**SEGUNDO ARTICULO**

de Santiago L, Ortiz del Castillo M, García-Martin E, Rodrigo MJ, Sánchez Morla EM, Cavaliere C, Cordón B, Miguel JM, López A, Boquete L. **Empirical Mode Decomposition-Based Filter Applied to Multifocal Electroretinograms in Multiple Sclerosis Diagnosis.** Sensors. 2020; 20(1):7.





Article

# Empirical Mode Decomposition-Based Filter Applied to Multifocal Electroretinograms in Multiple Sclerosis Diagnosis

Luis de Santiago <sup>1</sup>, M. Ortiz del Castillo <sup>2</sup>, Elena Garcia-Martin <sup>3,4,5</sup>,  
 María Jesús Rodrigo <sup>3,4,5,\*</sup>, Eva M. Sánchez Morla <sup>6,7,8</sup>, Carlo Cavaliere <sup>1</sup>, Beatriz Cordón <sup>3,4</sup>,  
 Juan Manuel Miguel <sup>1</sup>, Almudena López <sup>1</sup> and Luciano Boquete <sup>1,5,\*</sup>

<sup>1</sup> Biomedical Engineering Group, Department of Electronics, University of Alcalá, 28801 Alcalá de Henares, Spain; luis.desantiago@uah.es (L.d.S.); carlo.cavaliere@uah.es (C.C.); jmanuel.miguel@uah.es (J.M.M.); almudena.lopez@uah.es (A.L.)

<sup>2</sup> School of Physics, University of Melbourne, Melbourne, VIC 3010, Australia; miguel.ortizdelcastillo@unimelb.edu.au

<sup>3</sup> Department of Ophthalmology, Miguel Servet University Hospital, 50009 Zaragoza, Spain; egmvivax@yahoo.com (E.G.-M.); beatrizcordonc@gmail.com (B.C.)

<sup>4</sup> Aragon Institute for Health Research (IIS Aragon), Miguel Servet Ophthalmology Innovation and Research Group (GIMSO), University of Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain

<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, Research Institute Hospital 12 de Octubre (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.); Tel.: +34-97-6765-558 (M.J.R.); Fax: +34-97-656-623 (M.J.R.)

Received: 16 September 2019; Accepted: 16 December 2019; Published: 18 December 2019



**Abstract:** As multiple sclerosis (MS) usually affects the visual pathway, visual electrophysiological tests can be used to diagnose it. The objective of this paper is to research methods for processing multifocal electroretinogram (mfERG) recordings to improve the capacity to diagnose MS. MfERG recordings from 15 early-stage MS patients without a history of optic neuritis and from 6 control subjects were examined. A normative database was built from the control subject signals. The mfERG recordings were filtered using empirical mode decomposition (EMD). The correlation with the signals in a normative database was used as the classification feature. Using EMD-based filtering and performance correlation, the mean area under the curve (AUC) value was 0.90. The greatest discriminant capacity was obtained in ring 4 and in the inferior nasal quadrant (AUC values of 0.96 and 0.94, respectively). Our results suggest that the combination of filtering mfERG recordings using EMD and calculating the correlation with a normative database would make mfERG waveform analysis applicable to assessment of multiple sclerosis in early-stage patients.

**Keywords:** multiple sclerosis; multifocal electroretinogram; empirical mode decomposition; electrophysiology; biomarker

## 1. Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a neuroinflammatory disease that demyelinates and degenerates the central nervous system (CNS). It affects over 2 million people worldwide, mainly young adults [1]. MS principally alters the sensorimotor and cognitive functions. Its clinical development is highly

with a residue [21]. EMD and its subsequent enhancements have been successfully applied in denoising signals [22,23], trend removal [24] and trend prediction [25], feature extraction in images [26], and pattern recognition [27].

If EMD is applied to signals that present intermittency or involve components with spectral proximity, the mode-mixing problem may arise (i.e., oscillations of very dissimilar amplitudes in a mode, or very similar oscillations in different modes). This drawback can be overcome by using ensemble empirical mode decomposition (EEMD) and adding white noise to the signal to be decomposed [28]. EEMD may also present the edge effect problem when cubic spline interpolation is used to fit the upper and lower envelopes of signals. A solution may be to obtain optimum endpoint values by minimizing the deviation evaluation function of the signal and signal envelope [29].

The original univariate EMD method has been extended to bivariate [30], trivariate [31], and multivariate signals [32] (multivariate EMD, MEMD). With multivariate signals, it is necessary to redefine the local maxima and minima and oscillatory modes in relation to the criteria applied to univariate signals. MEMD obtains projections that are evenly distributed in a multidimensional space. The multiple envelopes obtained are averaged and their extrema are then interpolated (using a cubic spline) to estimate the local  $n$ -dimensional mean. Each channel is given a specific threshold when selecting the relevant IMFs. In [22], the dependent thresholds are computed based on characteristics of white Gaussian noise and are applied to each channel separately; more recently, the Mahalanobis distance measure at multiple data scales obtained from multivariate empirical mode decomposition is proposed as a denoising method [33].

In biomedical signal analysis, EMD has been used to filter multifocal visual-evoked potentials in MS diagnosis (selecting only the IMF with the highest amplitude [34]) or to analyze gamma-band activity in single-channel electroencephalography (EEG) signals [35]. EEMD was used by Naik et al. [36] in single-channel electromyography (EMG) signal classification and by Chang to remove artefacts in electrocardiograms [37]. Multivariate signal analysis using MEMD has been employed in brain–computer interfaces [38], analysis of multichannel EEG signals [39], extraction of olfactory-induced hemodynamic responses in MRI blood oxygen level dependent (BOLD) signals [40], analysis of abdominal sounds [41], mechanomyography [42], and electrogastrography [43], among other applications.

To our knowledge, EMD has not been used in analysis of mfERG signals. The objective of this paper is to improve discriminant capacity in MS diagnosis by analyzing mfERG recordings using empirical mode decomposition filtering and employing the correlation between the signals and a normative database as an analysis parameter.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Clinical Study

The study protocol was approved by the Institutional Review Board of Miguel Servet University Hospital at the University of Zaragoza and adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki. All participants provided informed consent.

The recordings were taken by the Ophthalmology Service at Miguel Servet University Hospital (Zaragoza, Spain). The signals were obtained from patients diagnosed with early-stage MS (in all cases < 12 months) with no history of optic neuritis, and from control subjects.

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 chart, contrast sensitivity using the CSV1000 test, color vision using Ishihara, pupillary reflexes, ocular motility, examination of the anterior segment, intraocular pressure (IOP) using the Goldmann applanation tonometer, and papillary morphology by fundoscopic exam, was performed

on all subjects in order to detect ocular alterations (such as primary open-angle glaucoma, cataract or corneal pathology) that could affect functional vision or mfERG results.

## 2.2. Acquisition of mfERG Recordings

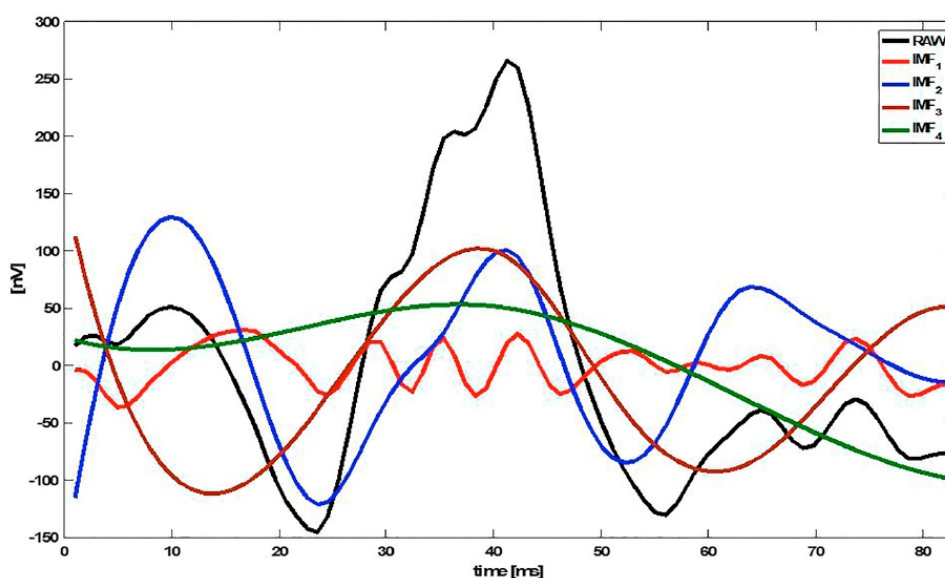
MfERGs were recorded according to the ISCEV standard [11], using a RETI-port/scan21 (Roland-Consult, Germany) device. The stimulus consisted of a set of 61 sectors, covering approximately 50 degrees in diameter of the central region of the visual field. A 21 inch monochrome CRT (cathode ray tube) monitor with a 60 Hz frame rate was used. The pupils were dilated and the eyes were adapted at room illumination prior to recording. A Dawson–Trick–Litzkow (DTL) electrode was placed on the lower eyelid conjunctiva after administering a topical anesthetic. An amplifier with a gain of  $10^4$  and a bandwidth of 10–200 Hz was used. The sampling frequency was 1017 Hz and signal length was approximately 83 ms ( $n = 84$  samples). Monocular recordings of both eyes were taken, randomly selecting the order of the tests for each subject. The records for the right eye of each participant were analyzed.

## 2.3. Empirical Mode Decomposition-based Filter

In this paper, we adopt the original EMD method given in Huang et al. [21], decomposing signal  $x(n)$  in a linear combination of  $L$  oscillating IMFs, plus a residue according to Equation (1):

$$x(n) = \sum_{k=1}^L \text{IMF}_k(n) + \text{residue}_L(n) \quad (1)$$

The first IMFs ( $k = 1, 2, \dots$ ) represent the high-frequency components of  $x(n)$ , while the higher IMFs ( $k = L, L-1, \dots$ ) show the low-frequency information. Figure 1 shows an example of an mfERG signal decomposed into 4 IMFs ( $\text{IMF}_1 \dots \text{IMF}_4$ ).

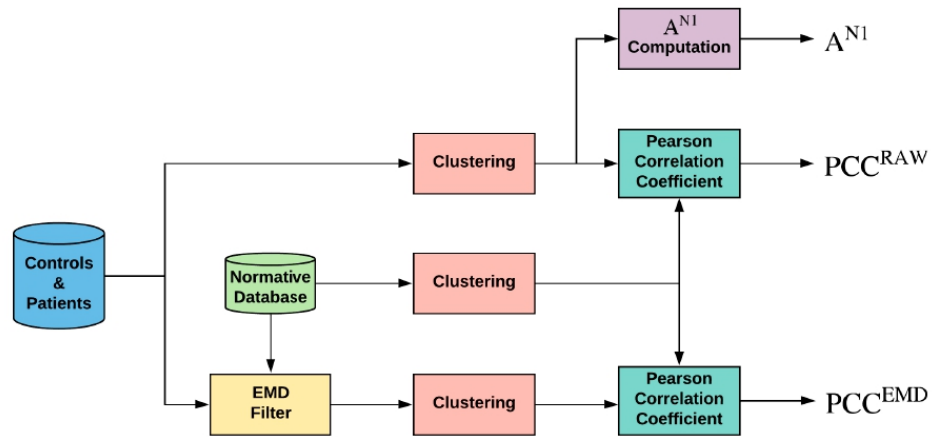


**Figure 1.** Example of an multifocal electroretinogram (mfERG) signal decomposed into 4 intrinsic mode functions (IMFs). Note: RAW = original signal.

#### 2.4. Analysis of mfERG Recordings

Briefly, the flow is shown in Figure 2:

- A template or normative database obtained from control subjects is computed for each sector by averaging those at the same location ( $X_S^{TEM}(n)$ );
- Each sector of each subject (control subjects and patients) is filtered using an adaptive EMD filtering block;
- Sectors from the original, template, and filtered signals are grouped into 10 different clusters: whole visual field (SUM), 5 rings, and 4 quadrants;
- As the analysis parameter, the Pearson correlation coefficient (PCC) is computed between each cluster and the corresponding template;
- The area under the receiver operating characteristic curve (the mean area under the curve, AUC) is computed (control subjects versus patients).



**Figure 2.** General diagram of the work performed. Note: EMD = empirical mode decomposition; PCC = Pearson correlation coefficient;  $A^{N1}$  = amplitude of wave N1 of original signals.

##### 2.4.1. Calculation of the Normative Database

As set out in the ISCEV standard [11], a template was formed from age-similar control data obtained from the same laboratory. A normative database was built for the original signals (RAW) and for each of the sectors ( $S = 1, \dots, 61$ ), averaging the traces of that sector with the sectors of the 6 control subjects (Equation (2)).

$$X_S^{TEM}(n) = \frac{1}{6} \sum_{i=1}^6 x(n); \quad (2)$$

$$S = 1 \dots 61; n = 1 \dots 84;$$

To avoid bias, when analyzing the eye of a control subject, its signals were not included in the template. Mathematically (Equation (3)), the template used to evaluate control subject  $j$  ( $j = 1, \dots, 6$ ) was as follows:

$$X_S^{TEM,j}(n) = \frac{1}{6-1} \sum_{i=1}^6 x(n); \quad (3)$$

$$i \neq j, S = 1 \dots 61; n = 1 \dots 84;$$



### 2.4.2. Adaptive EMD Filter

The adaptive filter is built independently for each of the 61 sectors of the visual field. For a recording  $x_S^{RAW}(n)$ , the first 4 IMFs plus the corresponding residue are obtained, as per the algorithm described in [21], obtaining the following 4 approximations of the original signal (Equation (4)):

$$x_S^k(n) = \sum_k^4 IMF_k(n) + residue_{L=4}(n); \quad k = 1 \dots 4; \quad (4)$$

Examination of the control database confirmed that the first 4 IMFs ( $L = 4$ :  $IMF_1 + IMF_2 + IMF_3 + IMF_4$ ) contain 92.23% of the energy of the original mfERG signals. Equation (4) produces 4 approximations of signal  $x(n)$ , in which the highest frequency components ( $IMF_1$ ,  $IMF_2$ ,  $IMF_3$ ) are progressively eliminated.

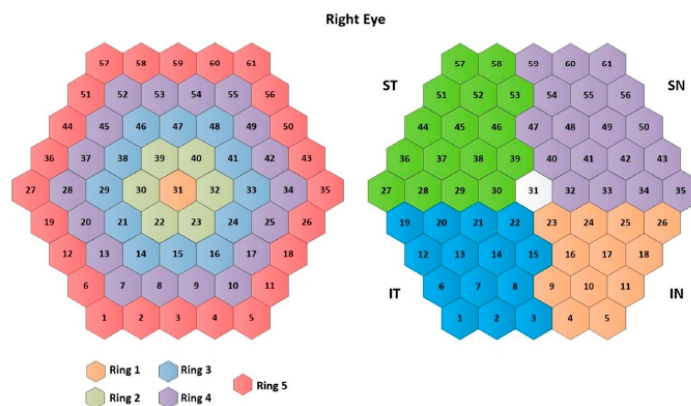
Of the 4 approximations obtained with Equation (4), the one containing the useful information is selected according to the principle of partial reconstruction. There are several options, such as energy-based methods [44], correlation-based methods [45–47], probability density function based methods [48], entropy [49], higher order statistics [50], mutual information [51], and mutual information entropy [52]. In this paper, the method described in [47] has been used, selecting as the filtered signal the one among the 4 approximations obtained in Equation (4) that has the highest Pearson correlation coefficient with the signal from the same sector of the normative database. Therefore, the filtered signal corresponding to sector  $S$  ( $S = 1, \dots, 61$ ) is (Equation (5)):

$$x_S^{EMD}(n) = x_S^k(n) \mid \max_{\text{Pearson\_corr}}(x_S^{TEM}(n), x_S^k(n)); \quad k = 1, \dots, 4; \quad (5)$$

If in Equation (5) all the correlations are negative, then the sector is considered non-analyzable (NaS); this can occur in records of sectors that are heavily contaminated by noise.

### 2.4.3. Cluster Calculation

The traces of the 61 mfERG sectors in all three cases (RAW signals, templates, and filtered signals) are averaged to form 10 different clusters: 5 rings ( $R1, \dots, R5$ ), 4 quadrants (IN: inferior nasal quadrant; SN: superior nasal quadrant; ST: superior temporal quadrant; IT: inferior temporal quadrant), and an average of the 61 sectors (SUM), according to the ISCEV standard [11]. The signal clusters are named as follows:  $X_{Ring1}(n), \dots, X_{Ring5}(n), X_{ST}(n), \dots, X_{SUM}(n)$ . Figure 3 shows the numbering assigned to each sector, as well as the clusters analyzed.



**Figure 3.** Cluster definition. Note: IN= inferior nasal quadrant; SN= superior nasal quadrant; ST= superior temporal quadrant; IT= inferior temporal quadrant.

MfERG tests generate a large number of single responses in different sectors of the retina. However, considering each single sector separately by itself does not have value for diagnosis because its signal-to-noise ratio is very low. To overcome this drawback, a signal level fusion model from multiple locations of the retina has been implemented by using a clustering in rings, quadrants, and the whole visual field. The goal of this data fusion approach is to obtain valuable diagnostic information.

#### 2.4.4. Analysis Parameters

In order to compare our results with the classic method of analyzing amplitudes and latencies, in this paper we use the amplitude of wave N1 ( $A^{N1}$ ) measured over the original signals, since in our database it is the variable that exhibits the best capacity to discriminate between control subjects and patients. The location of wave N1 corresponds to the minimum recording inside the 9–32 ms temporal window and the N1 amplitude is the difference between baseline and N1 in terms of absolute value.

As a new feature of the signals, the Pearson correlation coefficient (PCC) is obtained to discriminate between signals from control subjects and signals from MS patients. As an example, if Ring 2 is analyzed, the discriminant parameter for the RAW signal is defined as:

$$PCC_{Ring2}^{RAW} = \text{Pearson\_corr}(X_{Ring2}^{RAW}(n), X_{Ring2}^{TEM}(n)); \quad (6)$$

And for the signal filtered using EMD:

$$PCC_{Ring2}^{EMD} = \text{Pearson\_corr}(X_{Ring2}^{EMD}(n), X_{Ring2}^{TEM}(n)); \quad (7)$$

#### 2.5. Statistical Analysis

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

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

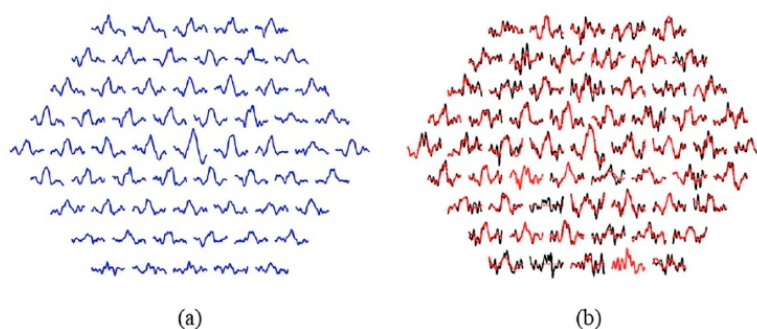
The AUC [53] was employed to assess the discrimination capability of each of the features analyzed in this study.

### 3. Results

Right-eye mfERG recordings from fifteen subjects (age =  $44.46 \pm 8.24$  years; male/female = 3:12) diagnosed with early-stage MS with no history of optic neuritis were used. Recordings were also taken from six control subjects (age =  $35.83 \pm 10.65$  years; male/female = 3:3). There was no significant difference between patient and control subject ages (t-test,  $p = 0.060$ ).

#### 3.1. Normative Database

Figure 4a shows the template obtained for the 61 sectors by averaging the RAW signals from the 6 control subjects used to filter the MS patient group:  $X_S^{TEM}$  (Equation (2)).



**Figure 4.** (a) Normative database according to Equation (2). (b) Effect of EMD filtering. Note: Black traces= original signals; red traces= filtered signals. Sectors showing a dotted red line (2 and 14): the sector is not analyzable. Sectors showing only red (4 and 21): the filtered signal is equal to the original signal.

### 3.2. Adaptive EMD Filter

Table 1 shows the number of IMFs used in adaptive filtering. In most cases, filtering is done using the sum of IMFs 2, 3, and 4 for both the control subjects (57.38%) and the patients (41.31%). In the case of the control subjects, 0.82% of the signals are non-analyzable, a figure that rises to 10.49% in MS patients.

**Table 1.** Best intrinsic mode functions (IMFs).

k Value Selected in Equation (5)	IMFs Used	Control Subjects	Multiple Sclerosis (MS) Patients
k = 1	IMF1, IMF2, IMF3, IMF4 + residue	23.50%	9.84%
k = 2	IMF2, IMF3, IMF4 + residue	57.38%	41.31%
k = 3	IMF3, IMF4 + residue	16.39%	28.31%
k = 4	IMF4 + residue	1.91%	10.05%
	NaS	0.82%	10.49%

Figure 4b shows the original and filtered signals for a patient. In this particular case, two sectors are not analyzable (2 and 14) and in two other sectors the filtered signal matches the original ( $k = 1$ , no IMFs have been discarded), namely sectors 4 and 21.

### 3.3. Analysis of Discriminant Capacity

Among the traditional methods for analyzing latencies and amplitudes, the best option (i.e., the one that produces the highest AUC values) takes the amplitude of wave N1 as a parameter. For purposes of comparison, Table 2 shows the results obtained using 3 analysis methods: (a) analysis of the amplitude of wave N1 (AN1); (b) correlation coefficient between the template and the RAW signals (unfiltered); and (c) correlation coefficient between the template and the mFERG signals filtered using the adaptive EMD method. The values obtained in each cluster (SUM, ..., IT) and the p and AUC values between control subjects and patients are included.

Table 2. Results achieved using the implemented methods.

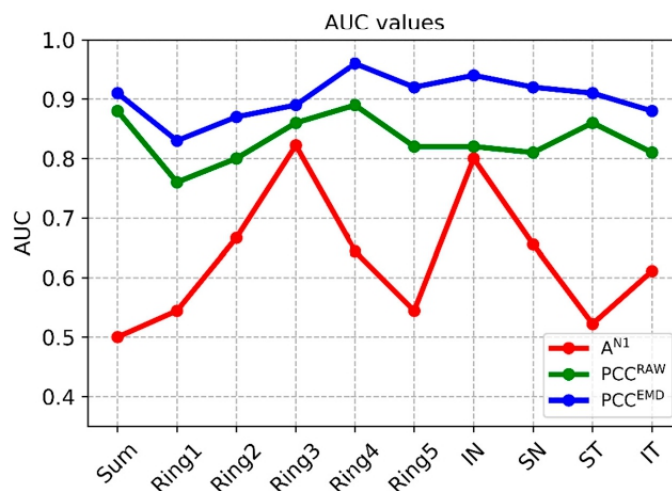
	Amplitude Analysis		Correlation Analysis: PCC			
	$A^{N1}$ (nV) (mean $\pm$ SD)		RAW Signals (mean $\pm$ SD)		EMD Filtered Signals (mean $\pm$ SD)	
	Controls	MS Patients	Controls	MS Patients	Controls	MS Patients
<b>Sum</b>	160.41 $\pm$ 53.87	155.44 $\pm$ 82.84	0.96 $\pm$ 0.03	0.73 $\pm$ 0.32	0.98 $\pm$ 0.02	0.91 $\pm$ 0.06
	p = 1 #, AUC = 0.50		p = 0.05 #, AUC = 0.88		p = 0.002 #, AUC = 0.91	
<b>Ring1</b>	308.17 $\pm$ 79.95	533.49 $\pm$ 456.84	0.90 $\pm$ 0.04	0.56 $\pm$ 0.42	0.95 $\pm$ 0.03	0.61 $\pm$ 0.39
	p = 0.79 #, AUC = 0.54		p = 0.095 #, AUC = 0.76		p = 0.014 #, AUC = 0.83	
<b>Ring2</b>	207.73 $\pm$ 59.18	274.29 $\pm$ 130.37	0.93 $\pm$ 0.04	0.71 $\pm$ 0.29	0.96 $\pm$ 0.03	0.83 $\pm$ 0.17
	p = 0.25 *, AUC = 0.67		p = 0.055 #, AUC = 0.80		p = 0.006 #, AUC = 0.87	
<b>Ring3</b>	179.97 $\pm$ 45.95	266.06 $\pm$ 96.70	0.93 $\pm$ 0.04	0.65 $\pm$ 0.40	0.96 $\pm$ 0.03	0.82 $\pm$ 0.17
	p = 0.023 #, AUC = 0.82		p = 0.006 #, AUC = 0.86		p = 0.005 #, AUC = 0.89	
<b>Ring4</b>	161.17 $\pm$ 58.22	201.03 $\pm$ 92.54	0.91 $\pm$ 0.05	0.63 $\pm$ 0.35	0.95 $\pm$ 0.02	0.80 $\pm$ 0.15
	p = 0.34 #, AUC = 0.64		p = 0.005 #, AUC = 0.89		p = 0.001 #, AUC = 0.96	
<b>Ring5</b>	158.06 $\pm$ 63.45	176.27 $\pm$ 90.63	0.90 $\pm$ 0.06	0.62 $\pm$ 0.34	0.95 $\pm$ 0.04	0.82 $\pm$ 0.11
	p = 0.79 #, AUC = 0.54		p = 0.023 #, AUC = 0.82		p = 0.002 #, AUC = 0.92	
<b>IN</b>	137.41 $\pm$ 66.43	258.50 $\pm$ 136.53	0.92 $\pm$ 0.04	0.69 $\pm$ 0.29	0.97 $\pm$ 0.02	0.86 $\pm$ 0.14
	p = 0.036 #, AUC = 0.80		p = 0.018 #, AUC = 0.82		p = 0.002 #, AUC = 0.94	
<b>SN</b>	188.45 $\pm$ 70.19	227.41 $\pm$ 88.25	0.92 $\pm$ 0.04	0.59 $\pm$ 0.46	0.96 $\pm$ 0.01	0.78 $\pm$ 0.19
	p = 0.30 #, AUC = 0.66		p = 0.018 #, AUC = 0.81		p = 0.002 #, AUC = 0.92	
<b>ST</b>	195.55 $\pm$ 41.52	228.98 $\pm$ 200.02	0.93 $\pm$ 0.04	0.70 $\pm$ 0.32	0.96 $\pm$ 0.02	0.83 $\pm$ 0.13
	p = 0.70, AUC = 0.52		p = 0.011 #, AUC = 0.86		p = 0.001 #, AUC = 0.91	
<b>IT</b>	148.12 $\pm$ 67.56	186.46 $\pm$ 95.40	0.87 $\pm$ 0.05	0.60 $\pm$ 0.34	0.93 $\pm$ 0.04	0.75 $\pm$ 0.19
	p = 0.42 #, AUC = 0.61		p = 0.045 #, AUC = 0.81		p = 0.005 #, AUC = 0.88	
<b>Mean AUC</b>	mean(AUC <sup>N1</sup> ) = 0.63		mean(AUC <sup>PCC_RAW</sup> ) = 0.83		mean(AUC <sup>PCC_EMD</sup> ) = 0.90	

Note: \* t-test; # Mann–Whitney U test; bold = significance difference. AUC = mean area under the curve;  $A^{N1}$  = amplitude of wave N1 of original signals.

In conventional analysis of the amplitude of wave N1, significant differences between patients and control subjects are only found in ring 3 and the inferior nasal (IN) quadrant (p = 0.023, p = 0.036, respectively, Mann–Whitney U test), producing AUC values of 0.82 and 0.80, respectively. The average AUC value for all the clusters analyzed using the amplitude of N1 is AUC = 0.63.

Using the value of the correlation between the signals and the normative database as the analysis parameter improves discriminant capacity. If this process is performed using unfiltered (RAW) signals, the maximum AUC value is obtained in ring 4 (AUC = 0.89) and the mean value for all clusters is AUC = 0.83. As expected, the value of the correlation coefficient is higher in the control subjects than in the patients, as since there is no dysfunction in the retina, the response is less variable, and therefore, more similar to the normative database.

The difference between control subjects and MS patients is accentuated by combining EMD filtering of the recordings with subsequent calculation of correlation with the normative database. In this case, there is significant difference in all the clusters considered (p < 0.014) and minimum AUC = 0.83 (ring 1), producing a mean value for all the clusters analyzed of 0.90. The greatest discriminant capacity is obtained in ring 4 (AUC = 0.96) and in the IN quadrant (AUC = 0.94). Figure 5 shows the discriminant capacity of the methods tested for the different clusters.



**Figure 5.** AUC values in the different methods. Note: PCC<sup>EMD</sup> = Pearson correlation coefficient of filtered signals; PCC<sup>RAW</sup> = Pearson correlation coefficient of original signals; A<sup>N1</sup> Amplitude = amplitude of wave N1 of original signals; SUM = whole visual field; IN = inferior nasal quadrant; SN = superior nasal quadrant; ST = superior temporal quadrant; IT = inferior temporal quadrant.

#### 4. Discussion

The purpose of this paper has been to research new methods of processing mfERG recordings to increase MS diagnosis capacity. The few papers that analyze the applicability of using mfERG recording analysis to diagnose MS are based on analysis of the amplitudes and latencies of first-order kernel waves, and their findings present discrepancies. These different findings may be partly due to the fact that electrophysiological tests are subject to the variability introduced by technical factors, such as device type, hardware configuration, electrodes, positioning, flash features, test with different number of stimuli arrays, or clusters analyzed (rings or quadrants). Physiological factors—such as pupil dilation or even temperature and oxygenation—can also introduce variability [54]. It should likewise be noted that the studies conducted include patients with different subtypes of the disease and with or without optic neuritis (see Table 3).

**Table 3.** Studies analyzing mfERG amplitude and latency in multiple sclerosis (MS) diagnosis.

Authors	Commercial mfERG System	Hexagons	Rings/Quadrants	MS	Results
Moura et al. (2007) [15]	VERIS Electro-Diagnostic-Imaging	103	Rings	MS with + without ON	Decreased amplitude Prolonged latency (p > 0.05)
Saidha et al. (2011) [17]	VERIS Electro-Diagnostic-Imaging	103	Rings	MS with + without ON (RR, RP, SP)	Decreased amplitude Normal latency
Neroev et al. (2016) [19]	RetiPort Roland-Consult	61	Rings	MS with ON	Decreased amplitude Prolonged latency
Vildades et al. (2017) [18]	RetiPort Roland-Consult	61	Quadrants	MS with + without ON	Decreased amplitude Prolonged latency
Gundogan et al. (2007) [16]	RetiScan Roland-Consult	61	Rings	MS without ON	Tendency to prolonged latency (p > 0.05)
Hanson et al. (2018) [7]	Espion Diagnosis LLC	61	Rings	MS with + without ON (RR, PP)	Prolonged latency

Note: RR = relapsing-remitting; PP = primary-progressive; SP = secondary-progressive; ON = optic neuritis.



In MS diagnosis based on the amplitude and latency parameters of first-order kernel waves in previous studies, prolonged latency is the altered parameter found most frequently [7,15,16,18,19], and even Neroev et al. [19] suggested using the latency of wave P1 in the parafovea as a marker of MS progression. The studies that detected the classical parameters with greatest alteration (lower amplitudes or higher latencies) in MS patients generally employed a 61-hexagon test [7,16,18,19].

The studies that employed 103 hexagons either did not find any statistically significant differences (SSDs) between MS patients and healthy subjects [15] or found normal latencies [17]. In our case, the 61-hexagon test was selected because it was shorter. This was to avoid fatigue, and with it, possible fixation losses, noise, signal quality issues, and errors due to tiredness, and so avoid retests that could influence the results [55]. The strength of our results—which did show SSDs even when analyzing a small number of subjects—supported by existing evidence, seem to suggest that in MS patients, conducting short tests with 61 hexagons is more appropriate.

Another aspect that may explain why there are no clear findings that support the ability of mfERGs to diagnose MS may be the need to use advanced processing algorithms and to develop parameters with greater diagnostic capacity. This paper proposes using an EMD-based method to filter mfERG recordings and employing the correlation of filtered signals with a normative database as the analysis parameter. The findings of this paper show a clear potential marker ( $\text{mean}(\text{AUC}^{\text{FILTER}} = 0.90)$ ) of the alterations in the mfERG responses in the early stages of MS, which if confirmed in a broader study, could enable clinical applicability.

When looking for a deeper justification for the findings, the involvement of glutamate in MS and the origin of the mfERG recordings should be analyzed. Glutamate is the central nervous system's main excitatory neurotransmitter, but when present in excess it triggers a chain of negative reactions. Glutamate neurotoxicity's involvement in the pathogenesis of demyelination and neuronal and synaptic damage in MS has been demonstrated on numerous occasions [56]; activated immune cells and astrocytes release large amounts of glutamate, damaging myelin sheaths and axons [57,58], and changes in glutamate levels in these areas have been associated with the later stages of MS, episodes, and secondary progression. An imbalance in glutamate receptor levels and expression can also occur in earlier stages or even when no damage is observed in white matter with MRI. High levels of glutamate have been found in serum and white and grey matter [59,60]. On the other hand, neurodegenerative diseases, such as MS, may not affect all cell types equally, making studying types rather than individual neurons more appropriate.

The mfERG wave is the overlapping of the responses of ON (activated) OFF (desactivated) bipolar cells, with a small contribution made by the inner retina and photoreceptors (mainly cones) [61]. In total, 12 types of bipolar cells have been described. These are progressively stratified in depth in the inner nuclear layer of the retina and form synaptic connections with the ganglion cells in the inner plexiform layer and with the photoreceptors in the outer plexiform layer. Studies on animals have shown that most bipolar cells appear to have connections with cones. These are sometimes specific between particular bipolar cell and cone types (e.g., M cone and CBC1, or S cone and CBC9), and only one type of bipolar cell would connect with the rods, although there also appear to be connections between rod and cone pathways [62]. Bipolar cells respond to the release of glutamate by photoreceptors in their synaptic communication [63] and adopt a mosaic arrangement, in which the overlapping contacts are potential synaptic pairings. Connectivity can be studied using electron microscopy, molecular markers, or more recently, computational methods. However, in all these cases histological tissue is required [64]. Using mfERG allows practitioners to study the mediated response of these synaptic responses non-invasively in vivo.

In animal studies using electrophysiological analysis, Vielma and Schmachtenberg [63] reported the existence of various types of OFF bipolar cells that exhibit different responses depending on glutamate levels; specifically, bipolar cells BC 3a, 3b, and 4 exhibited a significant inhibitory input in response to glutamate and were subject to inhibitory modulation with nitric oxide (NO). They also showed 6 functionally distinguishable types of bipolar cells with combinations of individual glutamate channels and receptors that give them unique electrophysiological filtering and signal-processing properties.

In justifying the findings, it can be hypothesized that using advanced filtering techniques such as EMD has the capacity to separate the responses of different bipolar cell types.

If our hypothesis can be corroborated, the features of the waves could be topographically extrapolated to photoreceptor/bipolar ON/bipolar OFF synaptic functionality. Although most studies detected increased P1 affectation, in our case it was the amplitude of N1 that showed the greatest affectation and diagnostic reliability. This may be a reflection of an early photoreceptor/bipolar cell synaptic alteration due to glutamate disbalance in MS. In addition, the inferior nasal quadrant showed the greatest discriminant capacity, which would correspond topographically to lower temporal affectation of the optic disc, which is typically affected in this disease.

Our findings show that as in previous studies [7,16], the outermost rings (R4 in our case)—as well as the nasal quadrant [18]—and therefore those close to the optic disc, show greater alteration. In the case of [18], significant affectation in mfERG amplitude and latency at the inferonasal ( $p = 0.045$ ) and superonasal ( $p = 0.042$ ) quadrants is reported in MS patients with and without prior ON. In our study, the decision to analyze only MS without ON, and therefore in the earliest stage, may be the reason why affectation was not (yet) found in the superonasal quadrant.

Our results showed higher N1 amplitudes (cone response reflex) in MS patients than in healthy control subjects. This may be due to the cones adapting to light, as described by Harrison et al. in 2018 [55], who detected greater (not clinically relevant) amplitudes in the mfERG recordings after exploration with ffERG. As these authors found, the effect is not very great, which is why our findings do not show statistically significant differences. Repetition of the exploratory phases in MS patients due to increased tiredness compared to healthy control subjects was likely to produce this long-term adaptation of the cones, as was mentioned earlier. Another possible explanation would concur with the results obtained in other neurodegenerative diseases such as Alzheimer's; Lopez et al. [65] found increased functional brain activity in anterior circuits using magnetoencephalography in mild cognitive impairment (an early condition in dementia). In [66], it was suggested that this hyperactivity may be one of the earliest dysfunctions of the pathophysiological process of neurodegeneration and would subsequently decline as dementia develops [67].

Our hypothesis is that the glutamate imbalance would be transported anterogradely from the brain by the axons, reaching the optic nerve. It would be possible to detect topographical retinal dysfunction in the outer rings and the nasal quadrant in the form of an increase in mfERG amplitude in early-stage MS. With time, in later or more severe stages [7,15,17–19] there would be a decline, as was detected in [17], in which 5 out of 7 patients showed decreased amplitude with predominant macular thinning when examined using optical coherence tomography.

In conclusion, a minimally invasive, simple, and accessible test such as mfERG could detect a glutamate imbalance in MS, even in very early stages of onset or without MRI evidence of damage, which would facilitate topographical diagnosis. If our hypothesis were to be corroborated, it would even allow practitioners to view the advance of secondary degeneration and the efficacy of glutamatergic balance-regulating treatments over time [68].

#### *Limitations and Future Work*

The main limitation of our study is the small size of our database, although the results obtained are statistically significant and a clear potential biomarker has been identified.

We also consider it necessary to conduct longitudinal follow-up and to monitor late stages of disease onset to ascertain how this response evolves, as it could indicate the topography of secondary neurodegeneration or dissemination or those areas most susceptible to damage. It would also be interesting to assess it during symptomatic episodes.

On the other hand, it would be interesting to analyze and compare the mfERG responses in this same type of patient but using larger exploratory sectors, as well as adopting shorter exploratory protocols to make it a faster, simpler, and more comfortable test for the patient, and so reduce the need for re-explorations that could influence the results due to light adaptation.

In this study, glutamate levels have not been analyzed, and most patients were being treated with anti-CD-20 (fingolimod, adalimumab), which could alter these levels due to immunity control.

Regarding our second hypothesis that decomposition of mfERG waves could reveal the responses of different bipolar cell types; as described above, this could open the way for both basic or translational and clinical studies.

From the point of view of signal analysis, since the basic version of the EMD algorithm has been used in this paper to analyze univariate signals, it would be worth evaluating the merits of multivariate decomposition (MEMD).

The latest clinical decision support systems for diagnosing MS are based on artificial intelligence analyze multifocal visual evoked potentials (mfVEP) [34], optical coherence tomography [69], EEG signals [70], functional magnetic resonance imaging (fMRI) [71], among others. Biomedical data fusion with advanced strategies for the analysis by selecting those more discriminant parameters from each exploratory test would reduce the decision error probability, increase reliability, and therefore reach an earlier and more precise diagnosis.

## 5. Conclusions

This paper has researched a possible method of obtaining a valid MS biomarker by analyzing mfERG recordings. Previous papers have analyzed the morphological characteristics of the signals (wave amplitudes and latencies), leading to conflicting results in different studies. By combining signal filtering with EMD and by using the correlation with signals from a normative database as an analysis parameter, a clear marker (mean value of AUC = 0.90) has been obtained, having greater discriminant capacity in ring 4 (AUC = 0.96) and in the lower nasal quadrant (AUC = 0.94). Although these results cannot be generalized due to the small data size and need to be confirmed in a larger study, they suggest that the combination of filtering mfERG recordings using EMD and calculating the correlation with a normative database would make mfERG waveform analysis applicable to assessment of multiple sclerosis in early stage patients.

**Author Contributions:** Conceptualization, E.G.-M., M.J.R., E.M.S.M., and L.B.; methodology, L.d.S., M.O.d.C., C.C., J.M.M., A.L., and B.C.; software, L.d.S., M.O.d.C., C.C., J.M.M., and A.L.; validation, L.d.S., M.O.d.C., C.C., J.M.M., and A.L.; formal Analysis, M.O.d.C. and J.M.M.; investigation, E.G.-M., M.J.R., E.M.S.M., and L.B.; resources, L.B. and E.G.-M.; data Curation, L.d.S., M.O.d.C., C.C., J.M.M., A.L., and B.C.; writing—original draft preparation, L.B., E.G.-M., and M.J.R.; writing—review and editing, L.B., E.G.-M., and M.J.R.; visualization, L.B. and E.G.-M.; supervision, L.B. and E.G.-M.; project administration, L.B. and E.G.-M.; funding acquisition, L.B. and E.G.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Secretariat of State for Research, Development, and Innovation grant number DPI2017-88438-R (AEI/FEDER, EU), awarded to L.B.; by Carlos III Health Institute grant number PI17/01726 for “Neuro-ophthalmological evaluation as biomarker of diagnosis, monitoring, and prognosis in multiple sclerosis”, awarded to E.G.M.; by and RETICS Oftared (Thematic Networks for Co-operative Research in Health for Ocular Diseases), RD16/0008/020, awarded to L.B., and RD16/0008/029, awarded to E.G.M. The APC was funded by DPI2017-88438-R (AEI/FEDER, EU).

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

## References

1. GBD 2016 Multiple Sclerosis Collaborators. Global, regional, and national burden of multiple sclerosis 1990–2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet. Neurol.* **2019**, *18*, 269–285. [\[CrossRef\]](#)
2. 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. [\[CrossRef\]](#)
3. London, A.; Benhar, I.; Schwartz, M. The retina as a window to the brain—from eye research to CNS disorders. *Nat. Rev. Neurol.* **2013**, *9*, 44–53. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)



4. 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. Neuro-Ophthalmol.* **2011**, *31*, 362–373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Toosy, A.T.; Mason, D.F.; Miller, D.H. Optic neuritis. *Lancet Neurol.* **2014**, *13*, 83–99. [[CrossRef](#)]
6. Backner, Y.; Petrou, P.; Glick-Shames, H.; Raz, N.; Zimmermann, H.; Jost, R.; Scheel, M.; Paul, F.; Karussis, D.; Levin, N. Vision and Vision-Related Measures in Progressive Multiple Sclerosis. *Front. Neurol.* **2019**, *10*, 455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. 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. [[CrossRef](#)]
8. McCulloch, D.L.; Marmor, M.F.; Brigell, M.G.; Hamilton, R.; Holder, G.E.; Tzekov, R.; Bach, M. ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2015 update). *Doc. Ophthalmol.* **2015**, *130*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Hood, D.C. Assessing retinal function with the multifocal technique. *Prog. Retin. Eye Res.* **2000**, *19*, 607–646. [[CrossRef](#)]
10. Hood, D.C.; Odel, J.G.; Chen, C.S.; Winn, B.J. The Multifocal Electroretinogram. *J. Neuro-Ophthalmol.* **2003**, *23*, 225–235. [[CrossRef](#)]
11. Hood, D.C.; Bach, M.; Brigell, M.; Keating, D.; Kondo, M.; Lyons, J.S.; Marmor, M.F.; McCulloch, D.L.; Palmowski-Wolfe, A.M. ISCEV standard for clinical multifocal electroretinography (mfERG) (2011 edition). *Doc. Ophthalmol.* **2012**, *124*, 1–13. [[CrossRef](#)]
12. Müller, P.L.; Meigen, T. M-sequences in ophthalmic electrophysiology. *J. Vis.* **2016**, *16*, 15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Wilsey, L.J.; Fortune, B. Electroretinography in glaucoma diagnosis. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **2016**, *27*, 118–124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. González-García, E.; Vilela, C.; Navea, A.; Arnal, E.; Muriach, M.; Romero, F.J. Electrophysiological and clinical tests in dry age-related macular degeneration follow-up: Differences between mfERG and OCT. *Doc. Ophthalmol.* **2016**, *133*, 31–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. 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.
16. 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. [[CrossRef](#)]
17. 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. [[CrossRef](#)]
18. Vildades Palomar, E.; Orduna Hospital, E.; Ciprés, M.; Obis, J.; Rodrigo SanJuan, M.J.; SatuéPalacian, M.; Garcia-Martin, E. Correlation between electrophysiological test and visual dysfunction in multiple sclerosis patients. *Acta Ophthalmol.* **2017**, *95*. [[CrossRef](#)]
19. 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. [[CrossRef](#)]
20. 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. [[CrossRef](#)]
21. Huang, N.E.; Shen, Z.; Long, S.R.; Wu, M.C.; Shih, H.H.; Zheng, Q.; Yen, N.-C.; Tung, C.C.; Liu, H.H. The empirical mode decomposition and the Hilbert spectrum for nonlinear and non-stationary time series analysis. *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **1998**, *454*, 903–995. [[CrossRef](#)]
22. Hao, H.; Wang, H.L.; Rehman, N.U. A joint framework for multivariate signal denoising using multivariate empirical mode decomposition. *Signal Process.* **2017**, *135*, 263–273. [[CrossRef](#)]
23. Blanco-Velasco, M.; Weng, B.; Barner, K.E. ECG signal denoising and baseline wander correction based on the empirical mode decomposition. *Comput. Biol. Med.* **2008**, *38*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

24. Lentka, L.; Smulko, J. Methods of trend removal in electrochemical noise data—Overview. *Measurement* **2019**, *131*, 569–581. [\[CrossRef\]](#)
25. Zhou, F.; Zhou, H.; Yang, Z.; Yang, L. EMD2FNN: A strategy combining empirical mode decomposition and factorization machine based neural network for stock market trend prediction. *Expert Syst. Appl.* **2019**, *115*, 136–151. [\[CrossRef\]](#)
26. Bajaj, V.; Pawar, M.; Meena, V.K.; Kumar, M.; Sengur, A.; Guo, Y. Computer-aided diagnosis of breast cancer using bi-dimensional empirical mode decomposition. *Neural Comput. Appl.* **2019**, *31*, 3307–3315. [\[CrossRef\]](#)
27. Zeng, W.; Yuan, C.; Wang, Q.; Liu, F.; Wang, Y. Classification of gait patterns between patients with Parkinson's disease and healthy controls using phase space reconstruction (PSR), empirical mode decomposition (EMD) and neural networks. *Neural Netw.* **2019**, *111*, 64–76. [\[CrossRef\]](#)
28. Wu, Z.; Huang, N.E. Ensemble empirical mode decomposition: A noise-assisted data analysis method. *Adv. Adapt. Data Anal.* **2009**, *1*, 1–41. [\[CrossRef\]](#)
29. Guo, Y.; Huang, S.; Li, Y.; Naik, G.R. Edge Effect Elimination in Single-Mixture Blind Source Separation. *Circuits Syst. Signal Process.* **2013**, *32*, 2317–2334. [\[CrossRef\]](#)
30. Rilling, G.; Flandrin, P.; Goncalves, P.; Lilly, J.M. Bivariate Empirical Mode Decomposition. *IEEE Signal Process. Lett.* **2007**, *14*, 936–939. [\[CrossRef\]](#)
31. Ur Rehman, N.; Mandic, D.P. Empirical Mode Decomposition for Trivariate Signals. *IEEE Trans. Signal Process.* **2010**, *58*, 1059–1068. [\[CrossRef\]](#)
32. Rehman, N.; Mandic, D.P. Multivariate empirical mode decomposition. *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **2010**, *466*, 1291–1302. [\[CrossRef\]](#)
33. Ur Rehman, N.; Khan, B.; Naveed, K. Data-Driven Multivariate Signal Denoising Using Mahalanobis Distance. *IEEE Signal Process. Lett.* **2019**, *26*, 1408–1412. [\[CrossRef\]](#)
34. De Santiago, L.; Sánchez-Morla, E.; Blanco, R.; Miguel, J.M.; Amo, C.; del Castillo, M.O.; López, A.; Boquete, L. Empirical mode decomposition processing to improve multifocal-visual-evoked-potential signal analysis in multiple sclerosis. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0194964. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Amo, C.; de Santiago, L.; Barea, R.; López-Dorado, A.; Boquete, L. Analysis of Gamma-Band Activity from Human EEG Using Empirical Mode Decomposition. *Sensors* **2017**, *17*, 989.
36. Naik, G.R.; Selvan, S.E.; Nguyen, H.T. Single-Channel EMG Classification with Ensemble-Empirical-Mode-Decomposition-Based ICA for Diagnosing Neuromuscular Disorders. *IEEE Trans. Neural Syst. Rehabil. Eng.* **2016**, *24*, 734–743. [\[CrossRef\]](#)
37. Chang, K.-M. Arrhythmia ECG Noise Reduction by Ensemble Empirical Mode Decomposition. *Sensors* **2010**, *10*, 6063–6080. [\[CrossRef\]](#)
38. Gaur, P.; Pachori, R.B.; Wang, H.; Prasad, G. An Automatic Subject Specific Intrinsic Mode Function Selection for Enhancing Two-Class EEG-Based Motor Imagery-Brain Computer Interface. *IEEE Sens. J.* **2019**, *19*, 6938–6947. [\[CrossRef\]](#)
39. Mert, A.; Akan, A. Emotion recognition from EEG signals by using multivariate empirical mode decomposition. *Pattern Anal. Appl.* **2018**, *21*, 81–89. [\[CrossRef\]](#)
40. Wang, K.-W.; Chen, C.-Y.; Chang, H.-H.; Hsu, C.-C.; Lan, G.-Y.; Hsu, H.-T.; Shyu, K.-K.; Chan, W.P.; Lee, P.-L. A Multivariate Empirical Mode Decomposition-Based Data-Driven Approach for Extracting Task-Dependent Hemodynamic Responses in Olfactory-Induced fMRI. *IEEE Access* **2019**, *7*, 15375–15388. [\[CrossRef\]](#)
41. Kölle, K.; Aftab, M.F.; Andersson, L.E.; Fougner, A.L.; Stavdahl, Ø. Data driven filtering of bowel sounds using multivariate empirical mode decomposition. *Biomed. Eng. Online* **2019**, *18*, 28. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Wang, D.; Wu, H.; Xie, C.; Gao, L. Suppression of Motion Artifacts in Multichannel Mechanomyography Using Multivariate Empirical Mode Decomposition. *IEEE Sens. J.* **2019**, *19*, 5732–5739. [\[CrossRef\]](#)
43. Mika, B.; Komorowski, D.; Tkacz, E. Assessment of slow wave propagation in multichannel electrogastrography by using noise-assisted multivariate empirical mode decomposition and cross-covariance analysis. *Comput. Biol. Med.* **2018**, *100*, 305–315. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Abdelkader, R.; Kaddour, A.; Derouiche, Z. Enhancement of rolling bearing fault diagnosis based on improvement of empirical mode decomposition denoising method. *Int. J. Adv. Manuf. Technol.* **2018**, *97*, 3099–3117. [\[CrossRef\]](#)
45. Ayenu-Prah, A.; Attah-Okine, N. A Criterion for selecting relevant intrinsic mode functions in empirical mode decomposition. *Adv. Adapt. Data Anal.* **2010**, *2*, 1–24. [\[CrossRef\]](#)

46. Rong, H.; Gao, Y.; Guan, L.; Zhang, Q.; Zhang, F.; Li, N. GAM-Based Mooring Alignment for SINS Based on An Improved CEEMD Denoising Method. *Sensors* **2019**, *19*, 3564. [\[CrossRef\]](#)
47. Peng, Z.K.; Tse, P.W.; Chu, F.L. An improved Hilbert–Huang transform and its application in vibration signal analysis. *J. Sound Vib.* **2005**, *286*, 187–205. [\[CrossRef\]](#)
48. Komaty, A.; Boudraa, A.-O.; Augier, B.; Dare-Emzivat, D. EMD-Based Filtering Using Similarity Measure Between Probability Density Functions of IMFs. *IEEE Trans. Instrum. Meas.* **2014**, *63*, 27–34. [\[CrossRef\]](#)
49. Feng, W.; Zhou, X.; Zeng, X.; Yang, C. Ultrasonic Flaw Echo Enhancement Based on Empirical Mode Decomposition. *Sensors* **2019**, *19*, 236. [\[CrossRef\]](#)
50. El Bouny, L.; Khalil, M.; Adib, A. ECG signal filtering based on CEEMDAN with hybrid interval thresholding and higher order statistics to select relevant modes. *Multimed. Tools Appl.* **2019**, *78*, 13067–13089. [\[CrossRef\]](#)
51. Zheng, H.; Dang, C.; Gu, S.; Peng, D.; Chen, K. A quantified self-adaptive filtering method: Effective IMFs selection based on CEEMD. *Meas. Sci. Technol.* **2018**, *29*, 085701. [\[CrossRef\]](#)
52. Chen, Y.; Wu, C.; Liu, H. EMD self-adaptive selecting relevant modes algorithm for FBG spectrum signal. *Opt. Fiber Technol.* **2017**, *36*, 63–67. [\[CrossRef\]](#)
53. Zweig, M.H.; Campbell, G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: A fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin. Chem.* **1993**, *39*, 561–577. [\[PubMed\]](#)
54. Ross, M.; Honig, H.; Ezra-Elia, R.; Banin, E.; Obolensky, A.; Averbukh, E.; Rosov, A.; Gootwine, E.; Ofri, R. Consecutive unilateral recording of the two eyes affects dark-adapted ERG responses, when compared to simultaneous bilateral recording. *Doc. Ophthalmol.* **2018**, *137*, 183–192. [\[CrossRef\]](#)
55. Harrison, W.; Osmotherly, K.; Biancardi, N.; Langston, J.; Gray, R.; Kneip, T.; Loveless, R. Foveal amplitudes of multifocal electroretinograms are larger following full-field electroretinograms. *Doc. Ophthalmol.* **2018**, *137*, 143–149. [\[CrossRef\]](#)
56. Vercellino, M.; Merola, A.; Piacentino, C.; Votta, B.; Capello, E.; Mancardi, G.L.; Mutani, R.; Giordana, M.T.; Cavalla, P. Altered glutamate reuptake in relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis cortex: Correlation with microglia infiltration, demyelination, and neuronal and synaptic damage. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2007**, *66*, 732–739. [\[CrossRef\]](#)
57. Yi, W.; Schlüter, D.; Wang, X. Astrocytes in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis: Star-shaped cells illuminating the darkness of CNS autoimmunity. *Brain. Behav. Immun.* **2019**, *80*, 10–24. [\[CrossRef\]](#)
58. Pitt, D.; Werner, P.; Raine, C.S. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat. Med.* **2000**, *6*, 67–70. [\[CrossRef\]](#)
59. Al Gawwam, G.; Sharquie, I.K. Serum Glutamate Is a Predictor for the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Sci. World J.* **2017**, *2017*, 9320802. [\[CrossRef\]](#)
60. Tisell, A.; Leinhard, O.D.; Warmtjes, J.B.M.; Aalto, A.; Smedby, Ö.; Landtblom, A.-M.; Lundberg, P. Increased concentrations of glutamate and glutamine in normal-appearing white matter of patients with multiple sclerosis and normal MR imaging brain scans. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e61817. [\[CrossRef\]](#)
61. Hood, D.C.; Frishman, L.J.; Saszik, S.; Viswanathan, S. Retinal origins of the primate multifocal ERG: Implications for the human response. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2002**, *43*, 1673–1685.
62. Behrens, C.; Schubert, T.; Haverkamp, S.; Euler, T.; Berens, P. Connectivity map of bipolar cells and photoreceptors in the mouse retina. *Elife* **2016**, *5*, e20041. [\[CrossRef\]](#)
63. Vielma, A.H.; Schmachtenberg, O. Electrophysiological fingerprints of OFF bipolar cells in rat retina. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 30259. [\[CrossRef\]](#)
64. Seung, H.S.; Sumbül, U. Neuronal cell types and connectivity: Lessons from the retina. *Neuron* **2014**, *83*, 1262–1272. [\[CrossRef\]](#)
65. López, M.E.; Engels, M.M.A.; van Straaten, E.C.W.; Bajo, R.; Delgado, M.L.; Scheltens, P.; Hillebrand, A.; Stam, C.J.; Maestú, F. MEG Beamformer-Based Reconstructions of Functional Networks in Mild Cognitive Impairment. *Front. Aging Neurosci.* **2017**, *9*, 107. [\[CrossRef\]](#)
66. Maestú, F.; Cuesta, P.; Hasan, O.; Fernández, A.; Funke, M.; Schulz, P.E. The Importance of the Validation of M/EEG With Current Biomarkers in Alzheimer’s Disease. *Front. Hum. Neurosci.* **2019**, *13*, 17. [\[CrossRef\]](#)
67. Smilovic, U.; Koenig, T.; Kåreholt, L.; Andersson, T.; Kramberger, M.G.; Winblad, B.; Jelic, V. Quantitative EEG power and synchronization correlate with Alzheimer’s disease CSF biomarkers. *Neurobiol. Aging* **2018**, *63*, 88–95. [\[CrossRef\]](#)

68. Gentile, A.; Musella, A.; De Vito, F.; Fresegna, D.; Bullitta, S.; Rizzo, F.R.; Centonze, D.; Mandolesi, G. Laquinimod ameliorates excitotoxic damage by regulating glutamate re-uptake. *J. Neuroinflamm.* **2018**, *15*, 5. [[CrossRef](#)]
69. Cavaliere, C.; Vilades, E.; Alonso-Rodríguez, M.; Rodrigo, M.; Pablo, L.; Miguel, J.; López-Guillén, E.; Morla, E.; Boquete, L.; Garcia-Martin, E. Computer-Aided Diagnosis of Multiple Sclerosis Using a Support Vector Machine and Optical Coherence Tomography Features. *Sensors* **2019**, *19*, 5323. [[CrossRef](#)]
70. Ahmadi, A.; Davoudi, S.; Daliri, M.R. Computer Aided Diagnosis System for multiple sclerosis disease based on phase to amplitude coupling in covert visual attention. *Comput. Methods Programs Biomed.* **2019**, *169*, 9–18. [[CrossRef](#)]
71. Saccà, V.; Sarica, A.; Novellino, F.; Barone, S.; Tallarico, T.; Filippelli, E.; Granata, A.; Chiriaco, C.; Bruno Bossio, R.; Valentino, P.; et al. Evaluation of machine learning algorithms performance for the prediction of early multiple sclerosis from resting-state fMRI connectivity data. *Brain Imaging Behav.* **2019**, *13*, 1103–1114. [[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/>).

**TERCER ARTICULO**

Cordon B, Viladés E, Orduna E, Satue M, Perez-Velilla J, Sebastian B, Polo V, Larrosa JM, Pablo LE, García-Martin E. **Angiography with optical coherence tomography as a biomarker in multiple sclerosis.** PLoS One. 2020;15(12): e0243236. doi: 10.1371/journal.pone.0243236. PMID: 33290417; PMCID: PMC7723290.



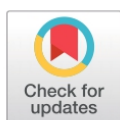
## RESEARCH ARTICLE

## Angiography with optical coherence tomography as a biomarker in multiple sclerosis

Beatriz Cordon<sup>1,2\*</sup>, Elisa Vilades<sup>1,2</sup>, Elvira Orduna<sup>1,2</sup>, María Satue<sup>1,2</sup>, Javier Perez-Velilla<sup>1,2</sup>, Berta Sebastian<sup>3</sup>, Vicente Polo<sup>1,2,4</sup>, Jose Manuel Larrosa<sup>1,2,4</sup>, Luis Emilio Pablo<sup>1,2,4</sup>, Elena Garcia-Martin<sup>1,2,4</sup>

**1** Ophthalmology Department, Miguel Servet University Hospital, Zaragoza, Spain, **2** Miguel Servet Ophthalmology Innovation and Research Group (GIMSO), Aragon Institute for Health Research (IIS Aragon), University of Zaragoza, Zaragoza, Spain, **3** Neurology Department, Miguel Servet University Hospital, Zaragoza, Spain, **4** National Ocular Pathology Network (OFTARED) at the Carlos III Institute of Health, Madrid, Spain

\* [beatrizcordonc@gmail.com](mailto:beatrizcordonc@gmail.com)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Cordon B, Vilades E, Orduna E, Satue M, Perez-Velilla J, Sebastian B, et al. (2020) Angiography with optical coherence tomography as a biomarker in multiple sclerosis. PLoS ONE 15(12): e0243236. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243236>

**Editor:** Ireneusz Grulkowski, Nicolaus Copernicus University, POLAND

**Received:** May 12, 2020

**Accepted:** November 18, 2020

**Published:** December 8, 2020

**Peer Review History:** PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243236>

**Copyright:** © 2020 Cordon 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.

## Abstract

## Purpose

To investigate superficial retinal microvascular plexuses detected by optical coherence tomography angiography (OCT-A) in multiple sclerosis (MS) subjects and compare them with healthy controls.

## Methods

A total of 92 eyes from 92 patients with relapsing-remitting MS and 149 control eyes were included in this prospective observational study. OCT-A imaging was performed using Triton Swept-Source OCT (Topcon Corporation, Japan). The vessel density (VD) percentage in the superficial retinal plexus and optic disc area (6 x 6 mm grid) was measured and compared between groups.

## Results

MS patients showed a significant decrease VD in the superior ( $p = 0.005$ ), nasal ( $p = 0.029$ ) and inferior ( $p = 0.040$ ) parafoveal retina compared with healthy subjects. Patients with disease durations of more than 5 years presented lower VD in the superior ( $p = 0.002$ ), nasal ( $p = 0.017$ ) and inferior ( $p = 0.022$ ) parafoveal areas compared with healthy subjects. Patients with past optic neuritis episodes did not show retinal microvasculature alterations, but patients with an EDSS score of less than 3 showed a significant decrease in nasal ( $p = 0.024$ ) and superior ( $p = 0.006$ ) parafoveal VD when compared with healthy subjects.

## Conclusions

MS produces a decrease in retinal vascularization density in the superficial plexus of the parafoveal retina. Alterations in retinal vascularization observed in MS patients are independent of the presence of optic nerve inflammation. OCT-A has the ability to detect subclinical

**Funding:** The author(s) received no specific funding for this work.

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

vascular changes and is a potential biomarker for diagnosing the presence and progression of MS.

## Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory demyelinating autoimmune disease of the central nervous system with axonal degeneration being the main determinant of neurological disability. The etiology is unknown and the course of MS cannot be predicted. Some patients are minimally affected by the disease while in others MS progresses quickly towards total disability. Symptoms of MS will depend on the damaged area and the phenotype. Patients with the relapsing-remitting (RRMS) phenotype suffer symptoms in the form of outbreaks, which can last days or even months, and usually disappear leaving functional sequelae. Some of the most common symptoms are blurred or double vision, muscular weakness, loss of dexterity, numbness or tingling and pain [1,2].

Examination of patients with MS has shown that abnormalities found in the central nervous system are also widespread in the neuro-retina. The visual afferent pathway, from the retina to the visual cortex, is one of the most affected systems, which underlines the importance of studying the visual pathway as a source of potential biomarkers in MS. Inflammation, demyelination and axonal degeneration in the afferent visual pathway are the main cause of visual symptoms in MS.

In recent years, optical coherence tomography (OCT) has demonstrated its ability as a non-invasive way of monitoring neurodegenerative diseases (such as MS, Parkinson's or Alzheimer's) based on quantification of axonal loss in the retina [3–6]. With this technique, the visual pathway is recognized as a model for correlating retinal neurodegeneration and disability in MS and some authors have demonstrated its potential as an early diagnostic tool [7]. In addition, the latest OCT software provides measurements of each retinal layer and even measurements of the choroidal plexus, which seems to provide more accurate measurements of axonal damage and ischemic processes [8–10].

Current diagnostic methods are evolving very rapidly. However, there is still a large time lapse between the first outbreak of the disease and definitive diagnosis. Early diagnosis is related to treatment prescription and therefore a good prognosis for the disease. OCT is a painless, innocuous, and non-invasive imaging test capable of providing high-quality images of the different layers of the retina. In the last 5 years, and due to the high definition of the acquired images, OCT has become able to determine the existence of vascular density (VD) by analyzing contrast in images of blood cells in movement [11]. This finding makes it possible to quickly and easily obtain a 3D cube containing the vascular structures of the retina and the choroid without the need for contrast injection. Based on the results of previous studies on MS and retinal/choroidal vessel density it has been suggested that MS patients show retinal vascular alterations [12–14]. However, research into the use of OCT-A in this field is still scarce [15,16]. This study aims to analyze retinal VD in patients with MS using optical coherence tomography angiography (OCT-A).

## Material and methods

All procedures in this study adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki; the experimental protocol was approved by the Ethics Committee of the Miguel Servet Hospital (CEICA), and all participants provided written informed consent to participate in the study.

Based on a preliminary study conducted by our group, we calculated the sample size needed to detect differences of at least 5  $\mu\text{m}$  in the thickness of the CFNR measured by OCT [3], applying a bilateral test with risk  $\alpha$  of 5% and risk  $\beta$  of 10% (i.e. with a power of 90%). In order to obtain enough sample of patients with MS, which would allow us to study in depth the natural history of the disease, the non-exposed/exposed ratio was determined to be 0.5. With these data it was concluded that at least 146 eyes would be necessary (73 from healthy subjects and 73 from MS patients). We included more subjects in both groups to improve power of the study.

The study group included only patients with the relapsing-remitting multiple sclerosis phenotype. MS was diagnosed on the basis of the 2010 revision of the McDonald Criteria and was confirmed by a neurologist specializing in MS [17]. The control group consisted of subjects who did not have any type of relevant ocular (epiretinal membranes, glaucoma, age related macular disease etc) or systemic disease previous were related with retinal vascular density such as Diabetes mellitus, arterial hypertension etc. Subjects with visual acuity  $< 0.4$  decimal (6/15 on the Snellen chart), intraocular pressure  $> 20$  mmHg, refractive errors greater than 5 diopters of spherical equivalent refraction or 3 diopters of astigmatism and/or active MS flare (of any neurological deficit) in the 6 months prior to enrollment in the study were excluded from the study. Active MS flare was considered a reason for exclusion because acute axonal loss or neuro-retinal edema could mask neuronal damage secondary to MS progression (i.e., chronic neurodegeneration) or modify retinal VD, which were the main targets of this study. The previous neurological ophthalmological examination was used to detect ocular impairments such as glaucoma, cataract or media opacity that could affect functional vision or retinal microvascularization. During 12 months all subjects were evaluated for best-corrected visual acuity (BCVA), pupillary reflexes, ocular motility, anterior segment examinations, intraocular pressure (IOP) using the Goldmann applanation tonometer, and papillary morphology by funduscopy. Subjects with ocular disease or prior ocular surgery were excluded.

Neurological and ophthalmological examinations were performed less than 3 months before OCT-A data acquisition.

Evaluation of best-corrected visual acuity was performed using the ETDRS optotype, composed of retro-illuminated sheets under photopic light conditions. Patients were seated at a 4-meter distance from the test and best correction was applied until the best possible visual acuity was achieved. The BCVA was expressed in LogMAR. Contrast sensitivity was measured using the Pelli Robson test. This test consists of 6 letters on each line and contrast varies from major to minor. Each line has two different groups, and triplets of letters have the same contrast. It uses a unique spatial frequency of 1 cycle/degree. The test was performed in monocular mode and with the subject at a distance of 1 meter.

Swept-source optical coherence tomography (SS-OCT) (Triton plus; Topcon Corporation, Tokyo, Japan) coupled with non-invasive OCT angiography technology (SS-OCT Angio™) was used to obtain the retinal images. The Topcon SS-OCT uses a tunable laser as a light source to provide a 1050 nm-centered wavelength. This device reaches a scanning speed of 100,000 A-scans per second. Because of this, Topcon SS-OCT visualizes the deepest structures of the retina, detecting even low microvascular density with high sensitivity [18]. All measurements were taken by a single observer, and only images with signal strength index (SSI) and analyzed images with quality score above 50 and 40 respectively [19] were included and also images with movement artefacts were excluded from the analysis.

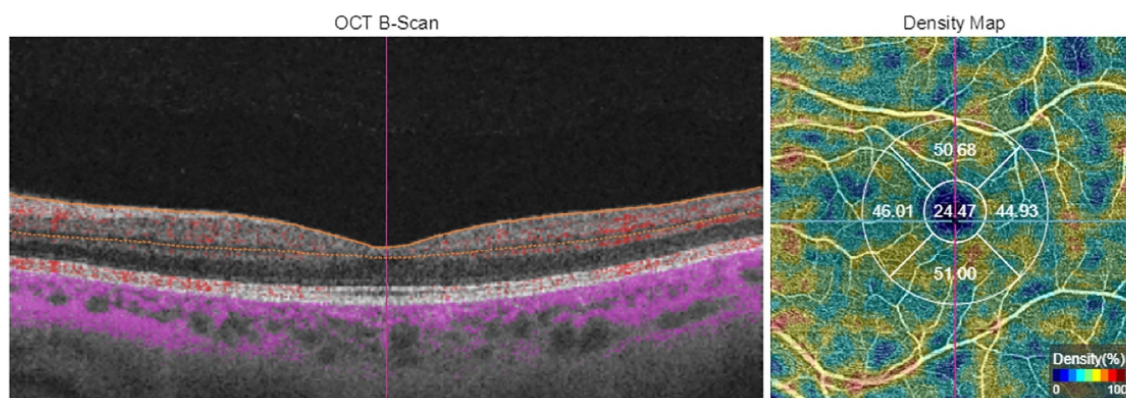
SS-OCT Angio™ images were acquired using a 6 x 6 mm cube—one cube centered on the fovea and the other centered on the optic disc—with a resolution of 320 x 320. Surface area (SA) was measured using Topcon IMAGENet® (version 1.19) proprietary software after automated segmentation of the macular area into superficial vascular plexuses (SVP) (SVP-FAZ)



including large vessels. Vessel density values were calculated from the internal limiting membrane to the inner plexiform layer. VD refers to the surface, measured in mm<sup>2</sup>, which limits the cube in which erythrocyte movement is detected. This software interprets the vascular density of the blood vessels in the scanning area (6 x 6 mm) as the percentage of that area that is occupied by the lumens of the vessels. It provides an ETDRS circular grid (3 mm diameter) which delivers a VD percentage in each of the sections that compose this grid. The grid centered on the fovea divides the macular region into the central foveal area and a perifoveal ring divided into the superior, inferior, nasal and temporal sections. The same grid is transferred to the center of the pit in the optic disc (Fig 1).

Finally, following the Advised Protocol for OCT Study Terminology and Elements (APOSTEL) recommendations for reporting quantitative OCT studies, our study was performed using only one eye in MS patients (randomly selected), except in those patients in which only one eye had a history of optic neuritis (in these cases, both eyes were included in the analysis and were treated as independent) [20].

The neurological evaluation in the MS group included the Expanded Disability Status Scale (EDSS) [21] score, designed by John Kurtzke, which measures patients' functional disability and classifies it into specific ranges that indicate the level of disability presented by the patient: 0–3.5 mild; 4–6 moderate; 7–8 severe; 8.5–9.5 very severe; and 10 death. We also categorized disease duration, prescribed treatments, prior episodes of optic neuritis, and quality of life (QoL) using the multiple sclerosis quality-of-life score (MSQoL-54). This questionnaire is based on a generic survey (the RAND 36-Item Health 1.0) with 18 additional MS-specific items. It consists of a total of 54 items: 52 spread across 12 dimensions (physical health, limitations due to physical problems, limitations due to emotional problems, pain, emotional well-being, energy, perception of health, social function, cognitive function, concern for health, quality of life as a whole, sexual function) plus 2 individual items that measure the change in health status (comparison of current health with that of a year ago) and satisfaction with sexual function. The dimensions are scored from 0 to 100, where a higher value indicates better Health-Related Quality of Life. In addition, two subtotals of mental and physical health are obtained. The MSQoL-54 has been shown to offer good internal consistency, reliability and theoretical validity [22–25].



**Fig 1.** Image of angiography optical coherence tomography measured in 6x6mm area in superficial vascular plexus with grid centered in macula. Left image shows a B-scan with orange lines limiting analyzed zone. Right image shows density map with grid divided in five areas; central, nasal, inferior, temporal and superior with number of percentages of vessel density.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243236.g001>

**Statistical analysis:** All data studied were recorded in an Excel database and analyzed using the IBM-SPSS statistical package (SPSS Inc, Chicago, IL, USA, version 20.0). The Kolmogorov-Smirnov test showed that most of the study variables were not normally distributed. Thus, non-parametric tests were used in our analysis. Comparison between MS patients and control subjects was performed using the Mann Whitney U test. Differences between groups were analyzed using a one-way ANOVA and a Games-Howell *post hoc* test and significance was set at  $p < 0.05$ . To avoid a high false positive rate, the Bonferroni correction for multiple tests was calculated and the corrected  $p$  values were added to the previously calculated data (see Tables).

## Results

The study group comprised 149 eyes of healthy subjects (20 males and 129 females) and 92 eyes of MS patients (12 males and 80 females). The average age of the sample was  $41.76 \pm 16.23$  years, with no age differences existing between groups ( $p = 0.955$ ) (Table 1).

MSQoL-54 was completed by 20 MS patients. The scores on the various functional quality-of-life evaluation scales are shown in Table 2.

The structural analysis performed using OCT-A revealed a higher vascular density in the peripapillary area in both groups when compared with the perimacular area. It is necessary to consider that retinal vasculature has some anatomical variations sensitive to axial length, refraction, age... [26], which causes variability in vascular density values. Fig 2 show VD values in control group and EM group related with age (Fig 2).

The MS group showed significant thinning in the ETDRS nasal macular area ( $p = 0.029$ ), superior macular area ( $p = 0.005$ ) and inferior macular area ( $p = 0.040$ ) and a significant reduction in contrast sensitivity ( $p = 0.008$ ) compared with the control group. Superior macular area remains minimally significantly low vascular density in EM groups despite removing the outlier data ( $p = 0.047$ ) (Table 3) (Fig 3).

A lower vascular density tendency is observed in the group of MS patients, with significance existing in the nasal, inferior and superior macular areas.

## Analysis by subgroup

Analysis by subgroup was performed on the sample of MS patients based on disease duration, existence or otherwise of previous episodes of optic neuritis and degree of functional impairment by the disease.

**Table 1. Baseline characteristics of the subjects included in the study.**

	CONTROL	MS	P
N (eyes)	149	92	-
Eye			-
Right eye (%)	79 (53)	46 (50)	
Left eye (%)	70 (47)	46 (50)	
Sex			-
Female (%)	129 (86.6)	80 (87)	
Male (%)	20 (13.4)	12 (13)	
Age (years)	$41.81 \pm 18.36$	$41.70 \pm 12.11$	-
IOP (mmHg)	$15.15 \pm 1.57$	$15.37 \pm 2.04$	0.959
EDSS	-	$2.02 \pm 1.43$	0.359

Abbreviations: MS, multiple sclerosis; N, number of eyes; IOP, Intraocular pressure; EDSS, Expanded Disability Status Scale.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243236.t001>

**Table 2. Mean and standard deviation of MSQoL-54 values in MS patients.**

	MS group	
	Mean	Mean $\pm$ Std. deviation
MSQoL-MENT	69.92	26.60
DISTRESS	64.97	32.66
OVERALL	63.84	30.47
EMOTIONAL	65.27	28.87
MENTAL LIMIT	55.74	45.32
COGNITIVE	57.39	34.90
MSQoL-PHY	65.64	21.29
PHYSICAL	68.63	30.49
HEALTH PERCEP	45.29	23.65
ENERGY	48.08	27.86
PHYSICAL LIMIT	43.70	42.67
PAIN	60.73	32.10
SEXUAL FUNC	56.49	35.43
SOCIAL	66.62	35.14
DISTRESS	64.66	33.21
CHANGE	45.00	26.41
SEX SATISF	70.00	29.91

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243236.t002>

To analyze disease duration, one subgroup was created containing patients diagnosed with MS less than or equal to 5 years earlier (44 eyes) and another subgroup was created with patients diagnosed with MS more than 5 years earlier (48 eyes). No significant differences in age, sex or IOP levels were found between the two subgroups. ANOVA analysis with a *post hoc* Games-Howell test found a significant decrease in the nasal macular area ( $p = 0.001$ ), inferior macular area ( $p = 0.003$ ) and superior macular area ( $p < 0.001$ ) in the group that had had the disease for more than 5 years when compared with the healthy subjects. Also, without outliers, superior area macular has a decreased vascular density in EM group. There was also a decrease in contrast sensitivity in both MS groups when compared with healthy subjects ( $p = 0.026$  and  $p = 0.041$ ) (Table 4).

Two subgroups were also analyzed in the patient group: subgroup MS+ON comprising eyes of patients with a history of optic neuritis, and subgroup MS-ON comprising eyes that had never suffered an episode of neuritis. The *post hoc* analysis indicated a significant decrease in vascular in the nasal and superior macular areas in the MS+ON group in comparison with the control group ( $p = 0.015$ ,  $p = 0.033$ ) and in the MS-ON group in comparison with the control group ( $p = 0.019$ ,  $p = 0.009$ ). Lower contrast sensitivity was observed in the subgroup with a history of neuritis when compared with the control group ( $p = 0.004$ ) and with the group of patients with no history of ON ( $p = 0.036$ ) (Table 5).

Based on the score on the Expanded Disability Status Scale, patients were divided into two groups: one group with EDSS scores of less than 3 and another group with EDSS scores equal to or greater than 3. The ANOVA test and the *post hoc* Games-Howell test for non-parametric tests showed levels of contrast sensitivity and vascular density (nasal macular area,  $p = 0.003$ ; superior macular area,  $p = 0.001$ ) that were significantly lower in the group with EDSS scores of less than 3 than among the healthy subjects. However, no differences were observed between the two EDSS groups (Table 6).

The correlation between the EDSS score and quality-of-life questionnaire values was analyzed using Spearman's correlation test, revealing a significant negative correlation between

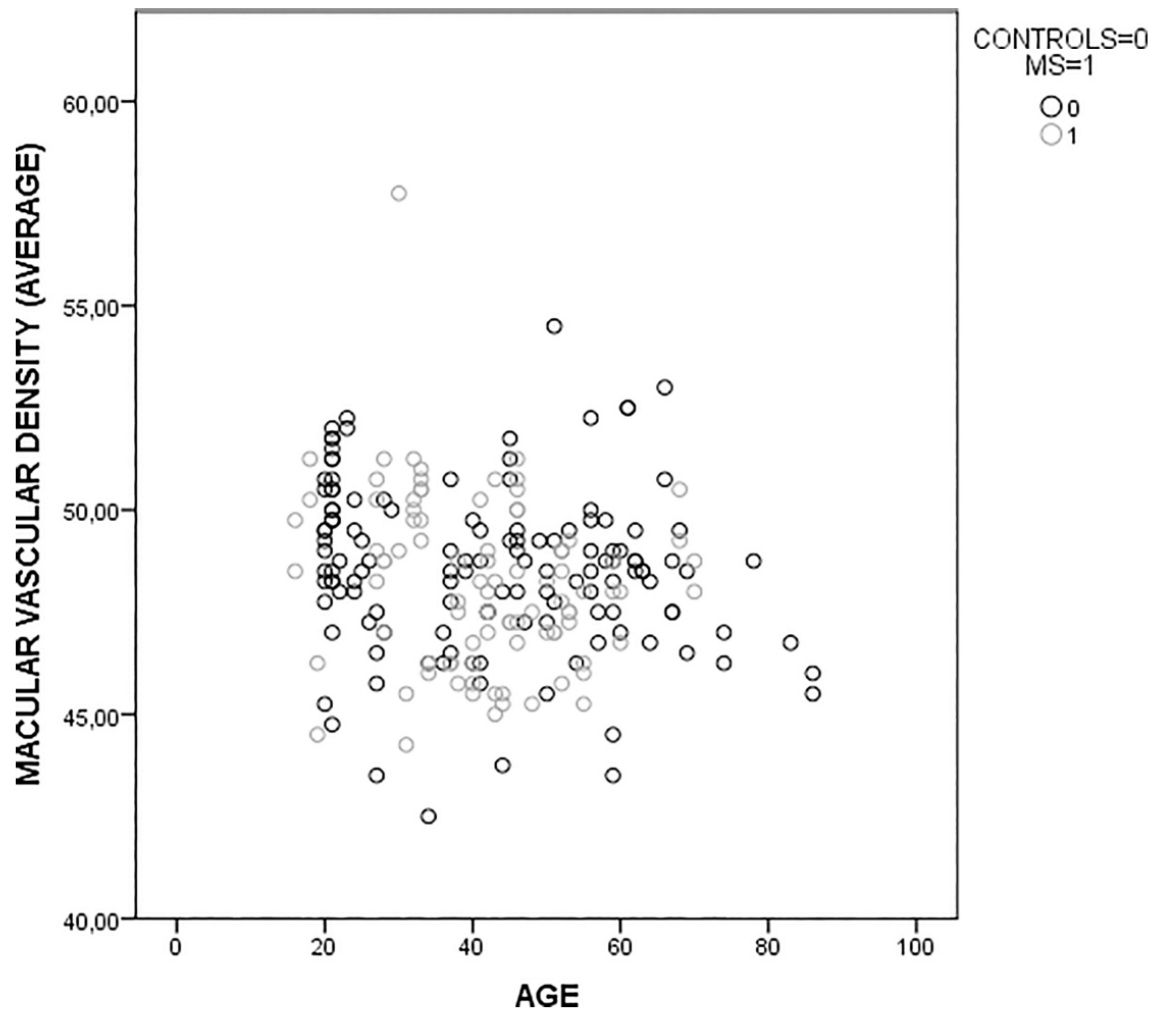


Fig 2. Scatterplot graphic of vascular density and age in control group and MS group.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243236.g002>

the mental quality-of-life (-0.478), physical limitations (-0.467) and perceived change in comparison with the year before (-0.455). A strongly significant negative correlation was also observed between the EDSS score and physical quality-of-life (Spearman's Correlation  $p = -0.623$ ) (Table 7).

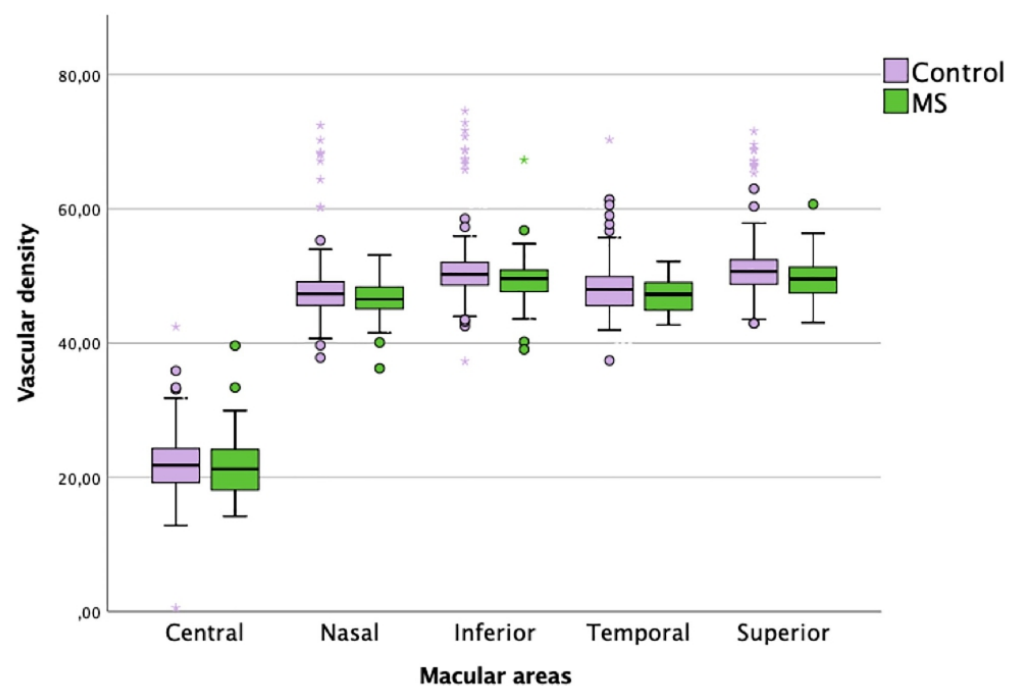
In addition, the correlation between the EDSS score and VD was analyzed, revealing a negative correlation (-0.271) in VD in the nasal area of the optic disc. (Table 8) and a positive correlation between the inferior VD area of the optic disc and the questions related to mental state in general (Spearman's correlation  $p = 0.503$ ).

**Table 3. Mean and standard deviation of vascular density.** Average of the vascular density of the four macular quadrants. Best-corrected visual acuity and contrast sensitivity in each group, and significance.

		CONTROLS	MS	P
		Mean $\pm$ Std. deviation / (without outliers)	Mean $\pm$ Std. deviation / (without outliers)	P / (without outliers)
BCVA		0.05 $\pm$ 0.07	0.04 $\pm$ 0.08	0.447
Contrast sensitivity		1.86 $\pm$ 0.13	1.75 $\pm$ 0.15	0.008*
Vascular density (%)	Central macula	21.89 $\pm$ 4.80 / 21.78 $\pm$ 3.99	21.45 $\pm$ 4.51 / 21.47 $\pm$ 4.51	0.322 / 0.394
	Nasal macula	48.21 $\pm$ 5.52 / 47.20 $\pm$ 3.13	46.50 $\pm$ 2.56 / 46.51 $\pm$ 2.57	0.029* / 0.104
	Inferior macula	51.19 $\pm$ 5.8 / 49.84 $\pm$ 2.99	49.50 $\pm$ 3.50 / 49.53 $\pm$ 3.52	0.040* / 0.262
	Temporal macula	48.24 $\pm$ 4.21 / 47.73 $\pm$ 3.21	47.26 $\pm$ 2.46 / 47.24 $\pm$ 2.45	0.158 / 0.292
	Superior macula	51.53 $\pm$ 5.43 / 50.32 $\pm$ 3.17	49.51 $\pm$ 3.04 / 49.53 $\pm$ 3.05	0.005* / 0.047 *
	Average	49.79 $\pm$ 4.72	48.21 $\pm$ 2.09	0.011*
	Central disc	23.29 $\pm$ 12.80 / 23.32 $\pm$ 12.73	22.59 $\pm$ 11.61 / 22.58 $\pm$ 11.65	0.606 / 0.575
	Nasal disc	57.98 $\pm$ 5.66 / 58.13 $\pm$ 5.46	57.28 $\pm$ 5.34 / 57.29 $\pm$ 5.35	0.173 / 0.136
	Inferior disc	65.86 $\pm$ 6.27 / 65.97 $\pm$ 6.09	65.62 $\pm$ 7.83 / 65.65 $\pm$ 7.84	0.870 / 0.851
	Temporal disc	55.18 $\pm$ 6.59 / 55.49 $\pm$ 5.15	55.57 $\pm$ 3.82 / 55.60 $\pm$ 3.79	0.964 / 0.992
	Superior disc	64.23 $\pm$ 5.73 / 64.47 $\pm$ 5.41	64.21 $\pm$ 4.3 / 64.23 $\pm$ 4.32	0.379 / 0.342

Abbreviations: MS, multiple sclerosis; Std., standard; BCVA, best-corrected visual acuity. Asterisk marks significance based on Mann-Whitney test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243236.t003>

**Fig 3. Graphic of percentage of superficial plexus macular in both groups.**

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243236.g003>



**Table 4. Mean and standard deviation of vascular density.** BCVA and contrast sensitivity in each group and significance in patients diagnosed with the disease less than 5 years earlier and in patients diagnosed with the disease more than 5 years earlier. Average of the vascular density of the four macular quadrants.

		CONTROL	MS ≤ 5 years	MS > 5 years	P
		Mean ± Std. deviation / (without outliers)	Mean ± Std. deviation / (without outliers)	Mean ± Std. deviation / (without outliers)	P / (without outliers)
N		145	44	48	
BCVA		0.05 ± 0.07	0.02 ± 0.05	0.06 ± 0.11	0.075
Contrast sensitivity		1.86 ± 0.13	1.75 ± 0.15	1.75 ± 0.15	0.029*
Vascular density (%)	Central macula	21.89 ± 4.80 / 21.78 ± 3.99	22.35 ± 4.56 / 22.36 ± 4.58	20.62 ± 4.34 / 20.65 ± 4.32	0.165 / 0.125
	Nasal macula	48.21 ± 5.52 / 47.20 ± 3.13	46.91 ± 2.59 / 46.95 ± 2.60	46.14 ± 2.50 / 46.10 ± 2.50	0.017* / 0.084
	Inferior macula	51.19 ± 5.8 / 49.84 ± 2.99	50.15 ± 3.65 / 50.16 ± 3.70	48.90 ± 3.27 / 48.96 ± 3.27	0.022* / 0.155
	Temporal macula	48.24 ± 4.21 / 47.73 ± 3.21	47.72 ± 2.44 / 47.68 ± 2.43	46.83 ± 2.42 / 46.83 ± 2.42	0.065 / 0.177
	Superior macula	51.53 ± 5.43 / 50.32 ± 3.17	50.18 ± 2.69 / 50.20 ± 2.69	48.89 ± 3.24 / 48.92 ± 3.25	0.002* / 0.025*
	Average	49.79 ± 4.72	48.74 ± 3.21	47.69 ± 3.52	0.014*
	Central disc	23.29 ± 12.80 / 23.32 ± 12.73	23.47 ± 12.16 / 23.50 ± 12.21	21.68 ± 11.06 / 21.62 ± 11.11	0.735 / 0.708
	Nasal disc	57.98 ± 5.66 / 58.13 ± 5.46	57.57 ± 4.86 / 57.61 ± 4.86	56.97 ± 5.85 / 56.95 ± 5.86	0.577 / 0.448
	Inferior disc	65.86 ± 6.27 / 65.97 ± 6.09	66.96 ± 5.27 / 66.98 ± 5.25	64.22 ± 9.70 / 64.26 ± 9.72	0.175 / 0.168
	Temporal disc	55.18 ± 6.59 / 55.49 ± 5.15	56.49 ± 3.68 / 56.57 ± 3.64	54.61 ± 3.78 / 54.60 ± 3.73	0.277 / 0.146
Superior disc	64.23 ± 5.73 / 64.47 ± 5.41	64.69 ± 4.31 / 64.70 ± 4.40	63.71 ± 4.28 / 63.74 ± 4.24	0.687 / 0.636	

Abbreviations: MS, multiple sclerosis; Std., standard; BCVA, best-corrected visual acuity. Asterisk marks significance based on ANOVA and posterior post hoc Games-Howell test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243236.t004>

**Table 5. Mean and standard deviation of vascular density.** Average of the vascular density of the four macular quadrants. Best-corrected visual acuity and contrast sensitivity in MS group with past optic neuritis (MS+ON) and MS group without optic neuritis (MS-ON).

		CONTROL	MS-ON	MS+ON	P
		Mean ± Std. deviation / (without outliers)	Mean ± Std. deviation / (without outliers)	Mean ± Std. deviation / (without outliers)	P / (without outliers)
N		151	72	20	
BCVA		0.05 ± 0.07	0.02 ± 0.06	0.07 ± 0.12	0.177
Contrast sensitivity		1.83 ± 0.14	1.78 ± 0.15	1.68 ± 0.11	0.016*
Vascular density (%)	Central macula	21.89 ± 4.80 / 21.78 ± 3.99	21.60 ± 4.81 / 21.62 ± 4.82	20.80 ± 3.62 / 20.80 ± 3.59	0.683 / 0.697
	Nasal macula	48.21 ± 5.52 / 47.20 ± 3.13	46.65 ± 2.45 / 46.66 ± 2.46	46.15 ± 1.95 / 46.13 ± 1.92	0.046* / 0.305
	Inferior macula	51.19 ± 5.8 / 49.84 ± 2.99	49.74 ± 3.74 / 49.79 ± 3.76	48.56 ± 2.77 / 48.53 ± 2.75	0.053 / 0.336
	Temporal macula	48.24 ± 4.21 / 47.73 ± 3.21	47.32 ± 2.57 / 47.31 ± 2.56	47.00 ± 2.20 / 46.93 ± 2.22	0.147 / 0.464
	Superior macula	51.53 ± 5.43 / 50.32 ± 3.17	49.73 ± 3.01 / 49.75 ± 3.04	48.78 ± 3.37 / 48.87 ± 3.27	0.012* / 0.193
	Average	49.79 ± 4.72	48.39 ± 2.15	47.61 ± 2.06	0.021*
	Central disc	23.29 ± 12.80 / 23.32 ± 12.73	21.05 ± 10.87 / 21.03 ± 10.95	22.32 ± 10.46 / 22.33 ± 10.35	0.281 / 0.265
	Nasal disc	57.98 ± 5.66 / 58.13 ± 5.46	58.10 ± 5.06 / 58.12 ± 5.06	55.60 ± 5.67 / 55.53 ± 5.63	0.288 / 0.233
	Inferior disc	65.86 ± 6.27 / 65.97 ± 6.09	65.52 ± 8.65 / 65.55 ± 8.66	65.13 ± 4.38 / 65.13 ± 4.32	0.854 / 0.809
	Temporal disc	55.18 ± 6.59 / 55.49 ± 5.15	56.04 ± 3.71 / 56.08 ± 3.67	53.81 ± 4.19 / 53.80 ± 4.13	0.336 / 0.228
Superior disc	64.23 ± 5.73 / 64.47 ± 5.41	64.50 ± 4.28 / 64.54 ± 4.30	64.07 ± 3.82 / 64.07 ± 3.83	0.882 / 0.936	

Abbreviations: MS, multiple sclerosis; Std., standard; BCVA, best-corrected visual acuity; ON, optic neuritis. Asterisk marks significance based on ANOVA and posterior post hoc Games-Howell test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243236.t005>

**Table 6. Mean and standard deviation of vascular density.** Average of the vascular density of the four macular quadrants. Best-corrected visual acuity and contrast sensitivity in control subjects. MS group with EDSS of less than 3 and MS group with EDSS of more than 3.

		CONTROLS	MS EDSS < 3	MS EDSS ≥ 3	P
		Mean ± Std. deviation / (without outliers)	Mean ± Std. deviation / (without outliers)	Mean ± Std. deviation / (without outliers)	P / (without outliers)
N		151	56	30	–
BCVA		0.04 ± 0.07	0.04 ± 0.08	0.05 ± 0.1	0.930
Contrast sensitivity		1.84 ± 0.13	1.74 ± 0.16	1.76 ± 0.14	0.027*
Vascular density (%)	Central macula	21.89 ± 4.80 / 21.78 ± 3.99	21.36 ± 4.82 / 21.39 ± 4.84	21.66 ± 4.08 / 21.67 ± 4.03	0.791 / 0.859
	Nasal macula	48.21 ± 5.52 / 47.20 ± 3.13	46.22 ± 2.76 / 46.23 ± 2.80	47.03 ± 2.14 / 47.03 ± 2.11	0.024* / 0.126
	Inferior macula	51.19 ± 5.8 / 49.84 ± 2.99	49.59 ± 3.69 / 49.63 ± 3.72	49.46 ± 3.46 / 49.53 ± 3.45	0.078 / 0.894
	Temporal macula	48.24 ± 4.21 / 47.73 ± 3.21	47.21 ± 2.31 / 47.21 ± 2.33	47.43 ± 2.72 / 47.40 ± 2.70	0.185 / 0.575
	Superior macula	51.53 ± 5.43 / 50.32 ± 3.17	49.29 ± 3.08 / 49.39 ± 3.07	49.76 ± 3.16 / 49.67 ± 3.21	0.006* / 0.148
	Average	49.79 ± 4.72	48.08 ± 3.44	48.42 ± 3.09	0.057
	Central disc	23.29 ± 12.80 / 23.32 ± 12.73	22.19 ± 11.96 / 22.20 ± 11.95	24.47 ± 11.89 / 24.42 ± 12.07	0.744 / 0.752
	Nasal disc	57.98 ± 5.66 / 58.13 ± 5.46	57.67 ± 5.25 / 57.68 ± 5.21	55.19 ± 4.94 / 55.25 ± 5.09	0.053 / 0.038*
	Inferior disc	65.86 ± 6.27 / 65.97 ± 6.09	66.48 ± 5.18 / 66.48 ± 5.18	62.72 ± 12.15 / 62.79 ± 12.16	0.064 / 0.061
	Temporal disc	55.18 ± 6.59 / 55.49 ± 5.15	55.08 ± 4.11 / 55.11 ± 4.06	56.28 ± 3.30 / 56.33 ± 3.31	0.674 / 0.559
	Superior disc	64.23 ± 5.73 / 64.47 ± 5.41	64.62 ± 4.37 / 64.64 ± 4.41	63.36 ± 4.45 / 63.37 ± 4.31	0.617 / 0.569

Abbreviations: MS, multiple sclerosis; Std., standard. Asterisk marks significance based on ANOVA and posterior post hoc Games-Howell test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243236.t006>**Table 7. Spearman's correlation between MSQoL-54 values and EDSS.**

Spearman's correlation	EDSS	Macular					Disc				
		Central	Nasal	Inferior	Temporal	Superior	Central	Nasal	Inferior	Temporal	Superior
MSQoL-MENT	-0.478*	0.450*	-0.204	-0.235	-0.044	-0.090	-0.162	-0.326	-0.110	-0.068	-0.095
DISTRESS	-0.216	0.015	-0.066	-0.132	-0.239	-0.224	-0.079	0.273	0.257	-0.026	0.223
OVERALL	-0.129	0.023	0.115	-0.002	-0.038	-0.254	-0.119	0.203	0.503*	0.086	0.343
EMOTIONAL	-0.138	-0.06	0.053	-0.038	-0.181	-0.294	0.036	0.083	0.202	-0.013	0.080
MENTAL LIMIT	-0.141	0.367	0.063	0.106	-0.274	-0.086	0.040	-0.019	0.234	0.307	-0.022
COGNITIVE	-0.227	-0.289	0.122	0.010	0.049	-0.219	-0.062	0.277	0.216	-0.040	0.109
MSQoL-PHI	-0.623**	0.352	-0.296	-0.337	-0.038	-0.208	-0.081	-0.313	-0.126	-0.223	0.114
PHYSICAL	-0.321	-0.011	-0.374	-0.229	-0.335	-0.336	0.122	0.051	0.062	-0.154	0.223
HEALTH PERCEP	-0.157	-0.199	-0.172	-0.219	-0.174	-0.267	-0.063	-0.006	0.123	-0.100	0.180
ENERGY	-0.253	-0.053	-0.016	-0.168	-0.357	-0.386	0.097	0.131	0.101	-0.100	0.0132
PHYSICAL LIMIT	-0.467*	0.087	0.009	-0.126	-0.094	-0.359	0.307	0.213	0.240	-0.106	0.269
PAIN	-0.040	-0.118	-0.110	-0.002	-0.132	-0.143	0.097	-0.057	0.144	0.134	0.087
SEXUAL FUNC	-0.159	0.107	0.107	0.156	-0.053	-0.159	0.030	0.311	0.402	0.241	0.125
SOCIAL	-0.161	-0.033	0.063	-0.026	-0.173	-0.286	-0.017	0.044	0.292	0.099	0.291
DISTRESS	-0.216	0.015	-0.066	-0.132	-0.239	-0.224	-0.079	0.273	0.257	-0.026	0.223
CHANGE	-0.455*	0.351	0.031	-0.116	-0.0147	-0.204	-0.203	0.115	0.184	-0.084	-0.101
SEX SATISF	-0.157	0.314	-0.132	0.008	0.150	0.148	-0.091	0.065	0.364	0.228	0.178

Asterisk marks significance based on Bonferroni correction for multiple comparisons.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243236.t007>

**Table 8. Spearman correlation between vascular density, OCTA values and EDSS.**

	EDSS Spearman's Correlation
Macular (C)	-0.006
Macular (N)	0.194
Macular (I)	0.033
Macular (T)	0.032
Macular (S)	0.072
Disc (C)	0.184
Disc (N)	-0.271*
Disc (I)	-0.211
Disc (T)	0.074
Disc (S)	-0.093

Asterisk marks significance based on Bonferroni correction for multiple comparisons.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243236.t008>

## Discussion

Several studies have found that brain blood density is significantly affected in both early-diagnosed RRMS and primary progressive MS, indicating that this affection is already present in the early stages of the pathology [27,28]. Animal studies have shown that chronic hypoperfusion of the brain can induce neurodegenerative changes, including the axonal degeneration so characteristic of this disease [29].

In this study, a significant decrease in VD was observed in the superior, nasal and inferior macular areas in patients suffering from MS with Triton Plus OCTA. More precisely, VD decrease remains significant when we remove outliers. Our results support previous research, such as Lanzillo R et al [12] (with Octovue OCTA device) and Olwen C Murphy et al [30] (Spectralis OCTA), both showing a loss of VD in SVP macular ETDRS in MS patients. Only one study evidenced an increase in VD in MS patients [31], which was realized with Angioplex Zeiss device.

Other studies as García-Martín et al [32], conduct five-year follow-up of MS patients, observed that the retinal nerve fiber layer and the ganglion cell layer measured in the peripapillary ring are thinner in MS patients, especially in the temporal and superior areas. In light of these results, it may be hypothesized that a relationship exists between the decrease in the temporal and superior peripapillary RNFL and vasculature that nourishes this layer, especially in superior macular area that shows a marked decrease in our results. Feucht et al [33] in his study shows this with a high correlation between loss retinal vasculature and thinning retinal layers. However, there are still very few published studies on OCT-A and MS, and it is still not known whether retinal degeneration occurs due to the decrease in VD or whether it is an unrelated phenomenon that could precede the disease or occur simultaneously with it [34]. Follow-up studies of MS patients could determine the relationship between neuronal loss and VD in the retina. Other neurodegenerative diseases such as Alzheimer's also produced similar decreases in VD in the superficial plexus of the retina when measured using OCT-A, which suggests that this test is able to detect ophthalmological impairments that occur in the course of neurodegenerative diseases [35].

Our study shows that several macular areas present VD less in patients who have had the disease for more than 5 years when compared with healthy subjects, indicating that the advance of MS is reflected at the level of the superficial plexus of the retina in the form of macular level impairment. There was a strong negative correlation between the quality-of-life values and the EDSS score. At the same time, structural analysis by subgroup based on the EDSS reveals that the group with scores of less than 3 exhibited less VD in the superior and nasal



areas than healthy subjects. These results suggest that OCT-A is able to detect a reduction in retinal VD in patients with a mild disability and that perhaps this vascular impairment is not as marked in subjects with more severe cases of the disease. It would be revealing to evaluate this test in subjects with clinically isolated syndrome and to observe whether OCT-A is able to anticipate diagnosis of MS. There was, however, no significant correlation between either VD and EDSS values or the quality-of-life questionnaire scores.

The results of this study show that retinal microvascularization is not impaired in patients who have suffered episodes of optic neuritis when compared with patients who have not suffered neuritis. However, contrast sensitivity is diminished after an episode of neuritis, as is reported in the literature [36]. The sample of eyes with prior ON is small—just 20 affected eyes—meaning that a study with a greater number of patients who have suffered this disease is required. Structural disorders in these patients, highly evidenced in several studies, are related to the inner layers of the retina, which leads to the hypothesis that VD in the intermediate layers is not affected by the inflammatory episode. Likewise, the macular area is not particularly damaged by ON. Therefore, our results suggest, in line with other previous studies [37], that in the course of MS the vascularization of the retina is not exclusively affected by inflammatory lesion of the optic nerve, but rather by the disease itself.

Our study has some limitations. In OCT-A, proper segmentation and analysis of the vascular plexuses require high-quality images. This presents a challenge in patients with debilitating diseases, especially in those suffering severe cognitive and physical impairments that make it difficult for them to follow instructions and maintain concentration and this affected the small sample size presented in this study. Additionally, the number of patients who answered MSQoL-54 was small compared to the total sample. Another limitation is the fact that the ETDRS grid needs to be positioned manually by the operator using the zone of minimum central value for the VD as the point of reference. The study did not consider analyze immunotherapy treatment that patient taken which could alter the results. The optic disc presents a wide range of anatomical variations within the parameters of normality. Therefore, although patients with atypical eye characteristics were excluded, it should be noted that vascular data may be conditioned by the characteristics of each optic nerve. We expose a retinal vessel density loss in FM patients without consider structural retinal state, this device does not measure thickness in same mensuration of OCTA, but more information about thickness of the retinal layers would complete the study.

In conclusion, our study shows that there is microvascular impairment in the perifoveal retina of MS patients. This decrease in VD is detectable in patients with mild functional impairment and is most evident in those who have had the disease for longer. OCT-A is a rapid, simple, non-invasive and easy-to-manage test that is useful in diagnosing the disease as it flags decreased VD values even in patients with mild disabilities. Although the analysis area is still small and we can only quantify the superficial plexus, the rapid development of optical coherence tomography will eventually remove these limitations.

## Supporting information

**S1 Data.**  
(XLSX)

## Author Contributions

**Conceptualization:** Beatriz Cordon, Elisa Vilades, Elvira Orduna, María Satue, Berta Sebastian, Vicente Polo, Luis Emilio Pablo, Elena Garcia-Martin.

**Data curation:** Beatriz Cordon, Elisa Vilades, Elvira Orduna, Elena Garcia-Martin.

**Formal analysis:** Beatriz Cordon, Elisa Vilades, Elvira Orduna, María Satue, Elena Garcia-Martin.

**Funding acquisition:** Beatriz Cordon.

**Investigation:** Beatriz Cordon, Elisa Vilades, Elvira Orduna, María Satue, Javier Perez-Velilla, Berta Sebastian, Vicente Polo, Jose Manuel Larrosa, Luis Emilio Pablo, Elena Garcia-Martin.

**Methodology:** Beatriz Cordon, Elisa Vilades, Elvira Orduna, Elena Garcia-Martin.

**Project administration:** Beatriz Cordon, Elisa Vilades, María Satue.

**Resources:** Beatriz Cordon, Elisa Vilades, Elvira Orduna, María Satue.

**Software:** Beatriz Cordon, Elisa Vilades, Elvira Orduna, María Satue, Elena Garcia-Martin.

**Supervision:** Beatriz Cordon, Elisa Vilades, Elvira Orduna, María Satue, Javier Perez-Velilla, Berta Sebastian, Vicente Polo, Jose Manuel Larrosa, Luis Emilio Pablo, Elena Garcia-Martin.

**Validation:** Beatriz Cordon, Elisa Vilades, María Satue, Javier Perez-Velilla, Berta Sebastian, Vicente Polo, Jose Manuel Larrosa, Luis Emilio Pablo, Elena Garcia-Martin.

**Visualization:** Beatriz Cordon, Elisa Vilades, María Satue, Javier Perez-Velilla, Berta Sebastian, Vicente Polo, Jose Manuel Larrosa, Luis Emilio Pablo, Elena Garcia-Martin.

**Writing – original draft:** Beatriz Cordon, María Satue, Elena Garcia-Martin.

**Writing – review & editing:** Beatriz Cordon, Elisa Vilades, Elvira Orduna, María Satue, Javier Perez-Velilla, Berta Sebastian, Vicente Polo, Jose Manuel Larrosa, Luis Emilio Pablo, Elena Garcia-Martin.

## References

1. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2000; 343: 938–52. PMID: [11006371](#)
2. Prineas J. Pathology of the early lesion in multiple sclerosis. *Hum Pathol*. 1975; 6(5): 531–554.
3. Satue M, Obis J, Rodrigo MJ, Otin S, Fuertes MI, Vilades E, et al. Optical coherence tomography as a biomarker for diagnosis, progression, and prognosis of neurodegenerative diseases. *J Ophthalmol*. 2016; 2016: 850385
4. Akçam H. T, Capraz I. Y, Aktas Z, Batur Caglayan H. Z, OzhanOktar S, Hasanreisoglu et al. Multiple sclerosis and optic nerve: an analysis of retinal nerve fiber layer thickness and color Doppler imaging parameters. *Eye (Lond.)*. 2014;(10):1206–1211.
5. Gordon-Lipkin E, Chodkowski B, Reich D. S, Smith S. A, Pulicken M, Balcer L. J, et al. Retinal nerve fiber layer is associated with brain atrophy in multiple sclerosis. *Neurology*. 2007; 69(16): 1603–1609
6. <jPulicken M, Gordon-Lipkin E, Balcer L. J, Frohman E, Cutter G, Calabresi P. A, Optical coherence tomography and disease subtype in multiple sclerosis. *Neurology*. 2007; 69(22): 2085–2092.
7. Martinez-Lapiscina EH, Amow S, Wilson JA, Saidha S, Preiningerova JL, Oberwahrenbrock T, et al; IMSVISUAL consortium. Retinal thickness measured with optical coherence tomography and risk of disability worsening in multiple sclerosis: a cohort study. *Lancet Neurol*. 2016; 15(6):574–584.
8. Pérez Del Palomar A, Cegoñino J, Montolio A, Orduna E, Vilades E, Sebastián B, et al. Swept source optical coherence tomography to early detect multiple sclerosis disease. The use of machine learning techniques. *PLoS One*. 2019; 14(5): e0216410. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216410> PMID: [31059539](#)
9. Garcia-Martin E, Pablo LE, Herrero R, Ara JR, Martin J, Larrosa JM, et al. Neural networks to identify multiple sclerosis with optical coherence tomography. *Acta Ophthalmol*. 2013; 91: e628–e634.

10. Garcia-Martin E, Jarauta L, Pablo LE, Bambo MP, Ara JR, Martin J, et al. Changes in peripapillary choroidal thickness in patients with multiple sclerosis. *Acta Ophthalmol.* 2019; 97(1): e77–e83.
11. de Carlo TE, Romano A, Waheed NK, Duker JS. A review of optical coherence tomography angiography (OCTA). *Int J Retina Vitreous.* 2015; 1:5. <https://doi.org/10.1186/s40942-015-0005-8> PMID: 27847598
12. Lanzillo R, Cennamo G, Criscuolo C, Carotenuto A, Velotti N, Spamelli F, et al. Optical coherence tomography angiography retinal vascular network assessment in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2018; 24(13):1706–1714.
13. Yilmaz H, Ersoy A, Icel E. Assessments of vessel density and foveal avascular zone metrics in multiple sclerosis: an optical coherence tomography angiography study. *Eye (Lond).* 2020; 34:771–778.
14. Spain RI, Liu L, Zhang X, Jia Y, Tan O, Bourdette D, et al. Optical coherence tomography angiography enhances the detection of optic nerve damage in multiple sclerosis. *Br J Ophthalmol.* 2018; 102:520–524 <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2017-310477> PMID: 28814415
15. Wang X, Jia Y, Spain R, Potsaid B, Liu JJ, Baumann B, et al. Optical coherence tomography angiography of optic nerve head and parafovea in multiple sclerosis. *Br J Ophthalmol.* 2014; 98:1368–1373.
16. Garcia-Martin E., Jarauta L., Vilades E., Ara J.R., Martin J., Polo V, et al. Ability of Swept-Source Optical Coherence Tomography to Detect Retinal and Choroidal Changes in Patients with Multiple Sclerosis. *J. Ophthalmol.* 2018; 7361212.
17. 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.
18. Stanga PE, Tsamis E, Papayannis A, Stringa F, Cole T, Jalil A. Swept-source optical coherence tomography angiography™ (Topcon Corp, Japan): technology review. *Dev Ophthalmol.* 2016; 56: 13–17.
19. Tang FY, Chan Erica O, Sun Z, Wong R, Lok J, Szeto S et al. Clinically relevant factors associated with quantitative optical coherence tomography angiography metrics in deep capillary plexus in patients with diabetes. *Eye and vision.* 2020; 7:7.
20. Cruz-Herranz A, Balk LJ, Oberwahrenbrock T, Saidha S, Martinez-Lapiscina EH, Lagreze WA, et al; IMSVISUAL consortium. The APOSTEL recommendations for reporting quantitative optical coherence tomography studies. *Neurology* 2016; 86: 2303–2309.
21. Kurtzke J.F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983; 33: 1444–1452.
22. Vickrey BG, Hays RD, Harooni R, Myers LW, Ellison GW. A health-related quality of life for multiple sclerosis. *Qual Life Res* 1995; 4: 187–206.
23. Meyers AR, Gage H, Hendricks A. Health-related quality of life in neurology. *Arch Neurol* 2000; 57: 1224–1227.
24. Garcia-Martin E, Rodriguez-Mena D, Herrero R, Almarcegui C, Dolz U, Martin J, et al. Neuro-ophthalmologic evaluation, quality of life, and functional disability in patients with MS. *Neurology* 2013; 81:76–83.
25. Heiskanen S, Meriläinen P, Pietilä AM. Health-related quality of life-testing the reliability of the MSQOL-54 instrument among MS patients. *Scand J Caring Sci.* 2007; 21: 199–206. PMID: 17559438
26. Orlov NV, Coletta C, van Asten F, Qian Y, Ding J, AlGhatrif M, et al. Age-related changes of the retinal microvasculature. *PLoS One.* 2019 May 2; 14(5): e0215916.
27. Ley M, Saindane AM, Ge Y, Babb JS, Johnson G, Mannon LJ, et al. Microvascular abnormality in relapsing-remitting multiple sclerosis: perfusion MR imaging findings in normal-appearing white matter. *Radiology.* 2004; 231 (3): 645–652.
28. Adhya S, Johnson G, Herbert J, Jaggi H, Babb JS, Grossman RI, et al. Pattern of hemodynamic impairment in multiple sclerosis: dynamic susceptibility contrast perfusion MR imaging at 3.0 T. *Neuroimaging.* 2006; 33 (4): 1029–1035.
29. Wakita H, Tomimoto H, Akiguchi I, Matsuo A, Lin JX, Ihara M, et al. Axonal damage and demyelination in the white matter after chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Brain Res.* 2002; 924 (1): 63–70.
30. Murphy OC., Kwakyi O, Iftikhar M, Zafar S, Lambe J, Pellegrini N. et al. Alterations in the retinal vasculature occur in multiple sclerosis and exhibit novel correlations with disability and visual function measures. *Multiple Sclerosis Journal.* 2020; 26(7), 815–828.
31. Jiang H, Gameiro GR, Liu Y, Lin Y, Hernandez J, Deng Yet al. Visual Function and Disability Are Associated with Increased Retinal Volumetric Vessel Density in Patients with Multiple Sclerosis. *Am J Ophthalmol.* 2020; 213:34–45.
32. 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 (5):688–696

33. Feucht N., Maier M., Lepennetier G., Pettenkofer M., Wetzlmair C., Daltrozzo T, et al. Optical coherence tomography angiography indicates associations of the retinal vascular network and disease activity in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2019; 25(2), 224–234.
34. Bhaduri B, Nola RM, Shelton R, Pilutti LA, Molt RW, Moss HE, et al. Detection of retinal blood vessel changes in multiple sclerosis with optical coherence tomography. *Biomed. Opt. Express*. 2016; 7(6):2321–2330
35. Yoon SP, Grewal DS, Thompson AC, Polascik BW, Dunn C, Burke JR, et al. Retinal Microvascular and Neurodegenerative Changes in Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment Compared with Control Participants. *Ophthalmology Retina*. 2019; 3(6): 489–499
36. Pillay G, Ganger A, Singh D, Bhatia R, Sharma P, Menon V, et al. Retinal nerve fiber layer and ganglion cell layer changes on optical coherence tomography in early multiple sclerosis and optic neuritis cases. *Indian J Ophthalmol*. 2018; 66: 114–119. [https://doi.org/10.4103/ijo.IJO\\_539\\_17](https://doi.org/10.4103/ijo.IJO_539_17) PMID: 29283135
37. Lamirel C, Newman NJ, Biousse V. Optical coherence tomography (OCT) in optic neuritis and multiple sclerosis. *Rev Neurol*. 2010; 166(12):978–86.

**CUARTO ARTICULO**

Viladés E, Cordon B, Perez-Velilla J, Orduna E, Satué M, Polo V, Sebastian B, Larrosa JM, Júlvez LP, Garcia-Martin E. **Evaluation of multiple sclerosis severity using new oct tool.** PLoS One. 2023. (Accepted 03/07/2023. Pending publication)

**Date:** Jul 03 2023 12:19AM  
**To:** "Beatriz Cordon" beatrizcordonc@gmail.com  
**cc:** "Elisa Viladés" elisavilades@hotmail.com, "Javier Perez-Velilla" jpv.javier@gmail.com, "Elvira Orduna" elvisabi14@hotmail.com, "Maria Satue" mariasatue@gmail.com, "Vicente Polo" vpolo@unizar.es, "Berta Sebastian" neube78@gmail.com, "Jose Manuel Larrosa" jlarrosa@unizar.es, "Luis Emilio Pablo" lpablo@unizar.es, "Elena Garcia-Martin" egmvivax@yahoo.com  
**From:** "PLOS ONE" plosone@plos.org  
**Subject:** PONE-D-21-07812R5: Final Decision Being Processed

EVALUATION OF MULTIPLE SCLEROSIS SEVERITY USING NEW OCT TOOL.  
PONE-D-21-07812R5

Dear Dr. Cordon,

We're pleased to inform you that your manuscript has been judged scientifically suitable for publication and will be formally accepted for publication once it meets all outstanding technical requirements.

Within one week, you'll receive an e-mail detailing the required amendments. When these have been addressed, you'll receive a formal acceptance letter and your manuscript will be scheduled for publication.

An invoice for payment will follow shortly after the formal acceptance. To ensure an efficient process, please log into Editorial Manager at <http://www.editorialmanager.com/pone/>, click the 'Update My Information' link at the top of the page, and double check that your user information is up-to-date. If you have any billing related questions, please contact our Author Billing department directly at [authorbilling@plos.org](mailto:authorbilling@plos.org).

If your institution or institutions have a press office, please notify them about your upcoming paper to help maximize its impact. If they'll be preparing press materials, please inform our press team as soon as possible -- no later than 48 hours after receiving the formal acceptance. 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).

Kind regards,

Alon Harris  
Academic Editor  
PLOS ONE

**1 Evaluation of multiple sclerosis severity using a new OCT tool**

**2 AUTHORS:**

**3 Viladés E,<sup>1,2</sup> Cordon B,<sup>1,2</sup> Pérez-Velilla J,<sup>1</sup> Orduna E,<sup>1,2</sup> Satue M,<sup>1,2</sup> Polo V,<sup>1,2</sup> Sebastian B,<sup>1,3</sup>**

**4 Larrosa JM,<sup>1,2</sup> Pablo LE,<sup>1,2</sup> Garcia-Martin E<sup>1,2</sup>**

**5 AFFILIATIONS:**

**6 1. Miguel Servet Ophthalmology Research and Innovation Group (GIMSO), Aragon**

**7 Institute for Health Research (IIS Aragón). University of Zaragoza, Zaragoza (Spain)**

**8 2. Ophthalmology Department, Miguel Servet University Hospital, Zaragoza (Spain)**

**9 3. Neurology Department, Miguel Servet University Hospital, Zaragoza (Spain)**

**10**

**11 CORRESPONDING AUTHOR:**

**12 Beatriz Cordon**

**13 Paseo Isabel la Católica 1-3. Servicio de Oftalmología, 50009-Zaragoza (Spain)**

**14 Email: beatrizcordonc@gmail.com Phone number: +34 976 76 55 00**

**15 RUNNING HEAD: OCT-based posterior pole analysis in multiple sclerosis**

**16 KEYWORDS: OCT, optical coherence tomography, retinal nerve fiber layer, ganglion**

**17 cells, multiple sclerosis, retinal layers**

**18 Competing interests: The authors declare no competing interests.**

**19 Authorship agreement: All authors have read the journal's authorship agreement. All**

**20 subjects gave detailed consent to participate in this study, which was conducted in**



21     **accordance with the guidelines determined by the Ethics Committee of the Miguel Servet**  
22     **University Hospital and the principles of the Declaration of Helsinki.**  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47



## 48 ABSTRACT

49 Purpose: To assess the ability of a new posterior pole protocol to detect areas with significant  
50 differences in retinal nerve fiber layer (RNFL) and ganglion cell layer (GCL) thickness in  
51 patients with multiple sclerosis versus healthy control subjects; in addition, to assess the  
52 correlation between RNFL and GCL thickness, disease duration, and the Expanded Disability  
53 Status Scale (EDSS).

54 Methods: We analyzed 66 eyes of healthy control subjects and 100 eyes of remitting-relapsing  
55 multiple sclerosis (RR-MS) patients. Double analysis based on first clinical symptom onset  
56 (CSO) and conversion to clinically definite MS (CDMS) was performed. The RR-MS group  
57 was divided into subgroups by CSO and CDMS year: CSO-1 ( $\leq 5$  years) and CSO-2 ( $\geq 6$  years),  
58 and CDMS-1 ( $\leq 5$  years) and CDMS-2 ( $\geq 6$  years).

59 Results: Significant differences in RNFL and GCL thickness were found between the RR-MS  
60 group and the healthy controls and between the CSO and CDMS subgroups and in both layers.  
61 Moderate to strong correlations were found between RNFL and GCL thickness and CSO and  
62 CDMS. Furthermore, we observed a strong correlation with EDSS 1 year after the OCT  
63 examination.

64 Conclusions: The posterior pole protocol is a useful tool for assessing MS and can reveal  
65 differences even in early stages of the disease. RNFL thickness shows a strong correlation with  
66 disability status, while GCL thickness correlates better with disease duration.

67  
68  
69  
70  
71  
72

## 73 INTRODUCTION.

74 Although multiple sclerosis (MS) has traditionally been considered a rare disease, it is now the  
75 most common chronic autoimmune, demyelinating, and neurodegenerative disease of the central  
76 nervous system (CNS) and, after traumatic injury, is the second most common cause of  
77 permanent disability among young adults.<sup>1</sup>

78 In 2019 it was estimated that there were 2.2 million people with MS worldwide.<sup>2</sup> Furthermore,  
79 several countries have observed significant increases in MS incidence, changes in the  
80 male:female ratio, or new pediatric cases.<sup>3-5</sup>

81 In the last decade, studies have widely demonstrated that the anterior visual pathway provides  
82 information about the dynamics of axonal degeneration in MS caused by episodes of acute optic  
83 neuritis, subclinical optic neuropathy, and/or retrograde degeneration.<sup>6-10</sup>

84 The retina is an accessible and visible "window to the brain" that provides *in vivo* information  
85 about the CNS via non-invasive imaging techniques such as optical coherence tomography  
86 (OCT). Previous studies have suggested that axons and neurons in the retina can be quantified  
87 by spectral-domain OCT.<sup>9-14</sup> The peripapillary retinal nerve fiber layer (pRNFL), composed of  
88 unmyelinated axons, has been suggested as a biomarker representing axonal degeneration in the  
89 brain of MS patients. Given OCT's very high degree of reproducibility, it offers a potential  
90 means of tracking neuroaxonal loss in MS at individual patient level.<sup>6-8</sup>

91 Monitoring of early degeneration and disease progression, as well as treatment success, may all  
92 be enhanced by analyzing axonal microstructure integrity.<sup>6</sup> However, monitoring pRNFL  
93 thickness may not be as accurate at detecting early alterations in axonal microstructure. Previous  
94 cross-sectional studies using SD-OCT have shown macular ganglion cell + inner plexiform  
95 layer (mGCIPL) thickness to offer greater reliability and repeatability, as well as better  
96 connection with visual function and clinical disability in MS, than pRNFL thickness.<sup>7,15</sup>  
97 Although retinal injury worsens as the disease progresses,<sup>16,17</sup> retinal axonal loss has been noted

98 at initial onset of the disease. Development of the algorithms used by SD-OCT software enables  
 99 more precise segmentation of the various retinal layers and pinpoints potential abnormalities.

100 The mGCIPL thinning rate is accelerated in MS patients exhibiting inflammatory activity<sup>18</sup> and  
 101 correlates strongly with brain atrophy, particularly gray matter atrophy, over time. A large-scale  
 102 pathology study concluded that retinal injury includes not only axonal loss (thinning of the  
 103 pRNFL), but also a reduction in ganglion cell density, demonstrating that inner retinal thinning  
 104 in MS reflects neuronal and axonal loss.<sup>7,16</sup> Detecting the relationship between the different  
 105 types of retinal injury in MS might help us understand which factors drive both inflammatory  
 106 and tissue atrophy.

107 The objective of this study is to analyze the retinal nerve fiber layer (RNFL) and ganglion cell  
 108 layer (GCL) in MS patients using a new software protocol designed for SD-OCT: the posterior  
 109 pole protocol. Previous studies conducted using this new protocol have mainly addressed  
 110 glaucoma<sup>19</sup> and healthy Caucasian populations.<sup>20,21</sup> The findings showed that in early-stage  
 111 glaucoma, clusters of sectors in the GCL provided better sensitivity and specificity values than  
 112 clusters in the pRNFL.<sup>19</sup> However, the posterior pole protocol's ability to detect changes in  
 113 pRNFL and GCL thickness in MS patients has not been studied yet. The McDonald Criteria  
 114 must be used to correctly diagnose MS because time plays a significant role in the disease and is  
 115 linked to subsequent deterioration and impairment. The criteria indicate that in order to diagnose  
 116 MS, there must be evidence of damage separated in time and space, with lesions in two  
 117 independent areas of the CNS. These tests attempt to make an early diagnosis of MS while  
 118 maintaining high sensitivity and specificity.

119 Our study aims to evaluate the correlation between disease duration and the damage that occurs  
 120 in the retina and so predict the future disability of the patient.

121

## 122    **METHODS**

123    All procedures in this study adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki; the  
124    experimental protocol was approved by the Ethics Committee of Miguel Servet University  
125    Hospital (CEICA), and all participants provided written informed consent to participate in the  
126    study.

127    We included patients with definite relapsing-remitting MS (RR-MS), diagnosed according to  
128    the 2010 revision of the McDonald Criteria and confirmed by a specialized neurologist.<sup>22</sup>  
129    Patients were assigned to the clinically definite multiple sclerosis (CDMS) group based on the  
130    date they met the criteria, or to the clinical symptom onset (CSO) group based on the date that  
131    symptoms were identified but did not yet meet the MS diagnosis criteria. The Expanded  
132    Disability Status Scale (EDSS) scores at OCT examination (EDSS-0) and 1 year later (EDSS-1)  
133    were collected from neurological examinations.

134    A total of 100 eyes from 100 MS patients and 66 eyes from 66 healthy individuals were  
135    evaluated by a neuro-ophthalmologist. One eye per subject was randomly selected. In the RR-  
136    MS group, the eye without previous episodes of optic neuritis was randomized and eyes with  
137    previous episodes of optic neuritis were excluded to avoid bias when assessing the extent to  
138    which neurodegeneration is detectable in retinal layers. Eyes longer than 25.2 mm or with  
139    refractive errors  $\geq 5$  diopters (D) of spherical equivalent or  $\geq 3$  D of astigmatism were excluded  
140    from the study. In addition, ophthalmological examination was used to detect ocular alterations  
141    such as macular or optic disc damage, cataract, or media opacity that could affect functional  
142    vision or captured images.

143    We classified the 100 RR-MS patients from the main group into two subgroups based on time  
144    of diagnosis of CDMS for the first analysis, and created another two subgroups based on first  
145    CSO for the second analysis. The latter were divided into CSO-1 ( $\leq 5$  years) comprising 38 eyes  
146    from 38 individuals and CSO-2 ( $\geq 6$  years) comprising 62 eyes from 62 subjects; and CDMS-1

147 ( $\leq 5$  years) comprising 50 eyes from 50 individuals and CDMS-2 ( $\geq 6$  years) comprising 49  
148 eyes from 49 subjects.

149 Structural measurements of the retina were obtained using the Spectralis OCT device  
150 (Heidelberg Engineering, Germany). The posterior pole protocol was used for all subjects  
151 (Figure 1). This protocol allows for detailed segmentation of the retinal layers. It incorporates  
152 the Anatomic Positioning System (APS), which describes a horizontal line between the fovea  
153 and the Bruch membrane opening. Based on that reference line, 61 parallel explorations are  
154 performed inside a  $25^\circ \times 30^\circ$  area. APS plus the True Track eye-tracking system ensure accurate  
155 detection of macula position in each individual based on head tilt and eye cyclotorsion. All  
156 measurements were taken by a single operator blind to group classification. Low-quality images  
157 (quality score below 25/40) and images with movement artifacts were excluded from the  
158 analysis. This  $25^\circ \times 30^\circ$  area is divided into an  $8 \times 8$  grid, which provides global retinal  
159 thickness and segments the thickness of each layer into 64 independent cells. The Spectralis  
160 OCT device has an axial (in tissue) resolution of  $3.9 \mu\text{m}$  and the thickness value is obtained  
161 from the average of each cell ( $1 \times 1 \text{ mm}$ ). This protocol also provides a color map scale for  
162 visual changes of  $10\text{--}15 \mu\text{m}$ , thus permitting improved detection of small tissue thickness losses  
163 by visual inspection of the retinal thickness map. In this study, we evaluated the RNFL and the  
164 GCL.

165 No manual correction was applied to the OCT output. An internal fixation target was used  
166 because it is reported to have the highest reproducibility.<sup>23</sup> The quality of the scans was assessed  
167 prior to the analysis and poor-quality scans were rejected. The Spectralis OCT device uses a  
168 blue quality bar in the image to indicate signal strength. The quality score ranges from 0 (poor  
169 quality) to 40 (excellent quality). Based on previously published studies on the effect of image  
170 quality on tissue thickness measurements using similar devices, only images with quality scores  
171 above 25 were included in the analysis.<sup>24</sup> Due to the number of cells with data, and to better  
172 visualize and understand the information, descriptive data from 64 measured cells were grouped

173 into 6 zones. RNFL and GCL measurements were recorded in a database and analyzed with the  
174 IBM-SPSS Statistics package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA, version 20.0).

175 The Kolmogorov–Smirnov test identified the study variables as normally distributed. As the  
176 RNFL data were parametric, Student's *t*-test was used to compare the controls and the MS  
177 patients, and the one-way ANOVA test was used to perform multiple comparisons between the  
178 subgroups. As the GCL data were not parametric, the Mann–Whitney *U* test was used to  
179 compare the control and MS cohorts, and the one-way ANOVA Kruskal–Wallis *H* test was used  
180 to perform multiple comparisons between the subgroups. For correlation, the Pearson  
181 correlation coefficient was used for the RNFL and the Spearman correlation coefficient was  
182 used for the GCL. We then analyzed the correlations between visual acuity, MS severity  
183 measured by EDSS, and retinal thickness (using the average of the RNFL and the GCL)

184 The numerical data obtained with SPSS were analyzed in MATLAB (R2020a, Mathworks,  
185 Massachusetts, USA),<sup>24</sup> which allows matrix representation using the M language. This program  
186 has previously been used in biological tissue research and in ophthalmic research.<sup>26–29</sup> Since  
187 posterior pole protocol analysis is based on an  $8 \times 8$  grid, which works as a matrix, numerical  
188 data can be reassembled and processed in MATLAB. The mean RNFL and GCL thicknesses  
189 from 64 cells were represented on a contour map (Figure 2); taking the p-values obtained from  
190 the one-way ANOVA test and the Pearson and Spearman correlation coefficients, we obtained  
191 image plots (Figures 3 and 4, respectively).

## 192 RESULTS

193 In the control group, mean age was  $44.52 \pm 18.91$  years, intraocular pressure (IOP) was  
194  $13.67 \pm 2.38$  mm Hg, and gender distribution was 17 males (25.8%) and 49 females (74.2%). In  
195 the MS group, mean age was  $41.94 \pm 13.86$  years, IOP was  $13.68 \pm 2.10$  mm Hg, gender  
196 distribution was 20 males (20.0%) and 80 females (80.0%), mean EDSS score was  $2.39 \pm 1.73$   
197 (range: 0–7.5), and 1 year after OCT acquisition mean EDSS score was  $2.43 \pm 2.17$  (range: 0–  
198 7.5).

Mean visual acuity was  $0.91 \pm 0.23$  in the control group and  $0.85 \pm 0.33$  in the MS group. We did not find any correlation between visual acuity and MS severity measured by EDSS ( $r = 0.611$ ;  $p = 0.452$ ) or between mean RNFL ( $r = 0.589$ ;  $p = 0.101$ ) and GCL thickness ( $r = 0.515$ ;  $p = 0.277$ ).

#### Retinal Nerve Fiber Layer

Patients with RR-MS presented significant RNFL thinning versus controls (Table 1; Figure 2).

**Table 1. Mean retinal nerve fiber and ganglion cell layer thickness  $\pm$  standard deviation, in microns, of 6 zones for healthy controls and remitting-relapsing multiple sclerosis patients. Bold numbers indicate  $p < 0.05$ . Abbreviations: RNFL, retinal nerve fiber layer; SD, standard deviation; GCL, ganglion cell layer; RR-MM, remitting-relapsing multiple sclerosis.**

		CONTROLS		RR-MS		Student's <i>t</i> -test
		Mean ( $\mu\text{m}$ )	$\pm$ SD	Mean ( $\mu\text{m}$ )	$\pm$ SD	
RNFL	ZONE 1	35.01	3.75	29.79	5.36	<0.001
	ZONE 2	29.82	3.04	26.31	3.88	<0.001
	ZONE 3	67.39	8.99	59.79	12.17	<0.001
	ZONE 4	82.18	13.15	72.47	13.87	<0.001
	ZONE 5	30.77	4.73	28.83	5.15	0.015
	ZONE 6	23.15	3.59	22.19	4.57	0.156
GCL	ZONE 1	42.11	3.00	36.78	5.93	<0.001
	ZONE 2	49.95	3.74	43.70	6.97	<0.001
	ZONE 3	28.57	2.35	27.45	3.19	0.015
	ZONE 4	26.63	2.60	25.59	2.50	0.011
	ZONE 5	28.69	2.59	26.62	2.72	<0.001



	ZONE 6	29.38	2.61	27.11	3.25	<0.001
--	--------	-------	------	-------	------	--------

212

213 **The one-way** ANOVA test revealed significant differences in the CSO RR-MS subgroups

214 versus healthy controls (Table 2) in 26 cells: zones 1, 2, 3, 4, and 5 in the RNFL and all zones in

215 the GCL (Figure 3, upper)

216 **Table 2. Mean retinal nerve fiber and ganglion cell layer thickness  $\pm$  standard deviation, in**217 **microns, of 6 zones for remitting-relapsing multiple sclerosis patients classified by years**218 **since onset of symptoms and comparison between both groups. Bold numbers indicate**219  **$p < 0.05$ . The asterisks mark significant levels that overcome Bonferroni correction for**220 **multiple comparisons. Abbreviations: RNFL, retinal nerve fiber layer; SD, standard**221 **deviation; GCL, ganglion cell layer; RR-MM, remitting-relapsing multiple sclerosis; CSO,**222 **clinical symptom onset.**

223

		CONTROLS		CSO-1		CSO-2		One-way ANOVA
		n = 66		n = 38		n = 62		
		Mean ( $\mu\text{m}$ )	$\pm$ SD	Mean ( $\mu\text{m}$ )	$\pm$ SD	Mean ( $\mu\text{m}$ )	$\pm$ SD	
RNFL	ZONE 1	35.01	3.75	30.71	4.94	29.22	5.57	<0.001*
	ZONE 2	29.82	3.04	27.28	3.40	25.72	4.05	<0.001*
	ZONE 3	67.39	8.99	62.57	9.08	58.08	13.51	<0.001*
	ZONE 4	82.18	13.15	74.99	10.81	70.92	15.26	<0.001*
	ZONE 5	30.77	4.72	29.74	4.02	28.27	5.69	0.019
	ZONE 6	23.15	3.59	22.08	2.28	22.26	5.55	0.360
GCL	ZONE 1	42.11	3.00	36.99	5.86	36.65	6.02	<0.001*
	ZONE 2	49.95	3.74	44.78	6.93	43.05	6.97	<0.001*
	ZONE 3	28.57	2.35	28.18	3.35	27.01	3.02	0.011
	ZONE 4	26.63	2.60	25.38	2.37	25.72	2.59	0.030
	ZONE 5	28.69	2.59	26.81	2.79	26.50	2.69	<0.001*



	ZONE 6	29.38	2.61	27.55	3.33	26.84	3.19	<0.001*
--	--------	-------	------	-------	------	-------	------	---------

224

225 *Post hoc* Bonferroni analysis (Figure 3, upper) showed significant differences in subgroup  
 226 CSO-1 versus healthy controls in zones 1 ( $p < 0.001$ ), 2 ( $p = 0.002$ ), and 4 ( $p = 0.030$ ). In CSO-  
 227 2, significant thinning was observed in zones 1 ( $p < 0.001$ ), 2 ( $p < 0.001$ ), 3 ( $p < 0.001$ ), 4  
 228 ( $p < 0.001$ ), and 5 ( $p = 0.015$ ) versus healthy controls. No differences were found between the  
 229 two CSO subgroups.

230 The one-way ANOVA test showed significant differences in the CDMS subgroups (Table 3,  
 231 lower) in 27 cells. When the CDMS subgroups of MS patients were compared with healthy  
 232 controls, *post hoc* analysis (Figure 3, lower) revealed significant differences versus healthy  
 233 controls in CDMS-1: zones 1 ( $p < 0.001$ ), 2 ( $p < 0.001$ ), and 4 ( $p = 0.020$ ). CDMS-2 showed  
 234 significant differences in zones 1 ( $p < 0.001$ ), 2 ( $p < 0.001$ ), 3 ( $p < 0.001$ ), 4 ( $p < 0.001$ ), and 5  
 235 ( $p = 0.005$ ). Significant differences were found in CDMS-1 and CDMS-2 between zones 1  
 236 ( $p = 0.011$ ), 2 ( $p = 0.026$ ), and 3 ( $p = 0.012$ ).

237 **Table 3. Mean retinal nerve fiber and ganglion cell layer thickness  $\pm$  standard deviation, in**  
 238 **microns, of 6 zones for remitting-relapsing multiple sclerosis patients classified by years**  
 239 **since clinically definite multiple sclerosis diagnosis and comparison between both groups.**  
 240 **Bold numbers indicate  $p < 0.05$ . The asterisks mark significant levels that overcome**  
 241 **Bonferroni correction for multiple comparisons. Abbreviations: RNFL, retinal nerve fiber**  
 242 **layer; SD, standard deviation; GCL, ganglion cell layer; RR-MM, remitting-relapsing**  
 243 **multiple sclerosis; CDMS, clinically definite multiple sclerosis.**

244

		CONTROLS		CDMS-1		CDMS-2		One-way ANOVA
		n = 66		n = 50		n = 49		
		Mean ( $\mu m$ )	$\pm$ SD	Mean ( $\mu m$ )	$\pm$ SD	Mean ( $\mu m$ )	$\pm$ SD	
RNF	ZONE 1	35.01	3.75	31.22	5.35	28.44	5.06	<0.001*

	ZONE 2	29.82	3.04	27.25	3.50	25.38	4.08	<0.001*
	ZONE 3	67.39	8.99	62.89	9.43	56.57	13.93	<0.001*
	ZONE 4	82.18	13.15	75.31	11.02	69.19	15.63	<0.001*
	ZONE 5	30.77	4.73	29.79	3.87	27.78	6.08	0.007
	ZONE 6	23.15	3.59	22.34	2.62	22.06	6.01	0.358
GCL	ZONE 1	42.11	3.00	38.15	5.89	35.29	5.69	<0.001*
	ZONE 2	49.95	3.74	45.59	6.72	41.63	6.69	<0.001*
	ZONE 3	28.57	2.35	28.43	3.25	26.37	2.76	<0.001*
	ZONE 4	26.63	2.60	25.92	2.59	25.18	2.34	0.011
	ZONE 5	28.69	2.59	27.00	2.74	26.15	2.62	<0.001*
	ZONE 6	29.38	2.61	27.90	3.16	26.28	3.19	<0.001*

245

246 Correlation analysis between retinal measurements and MS severity (by EDSS) showed a  
 247 moderate correlation with mean RNFL thickness ( $r = 0.605$ ;  $p = 0.043$ ). Particularly in relation  
 248 to time of CDMS diagnosis, more than 50% of cells showed a mild inverse correlation with the  
 249 Pearson correlation coefficient. In addition, the RNFL showed a significant moderate inverse  
 250 correlation with the EDSS baseline (EDSS-0) score and with the EDSS score at 1-year follow-  
 251 up (EDSS-1) (Figure 4).

252

253 **Table 4. Correlation between retinal nerve fiber layer and ganglion cell layer thickness and**  
 254 **time since onset of symptoms, time since clinically definite multiple sclerosis diagnosis,**  
 255 **Expanded Disability Status Scale (EDSS) at time of optical coherence tomography (OCT)**  
 256 **examination, and EDSS 1 year later. The asterisks mark significant levels, \*  $p < 0.05$  and \*\***  
 257  **$p \leq 0.005$ . Abbreviations: RNFL, retinal nerve fiber layer; GCL, ganglion cell layer; Pcc,**  
 258 **Pearson correlation coefficient; CSO, clinical symptom onset; CDMS, clinically definite**  
 259 **multiple sclerosis; EDSS, Expanded Disability Status Scale.**

260

		Years since CSO n = 100	Years since CDMS n = 99	EDSS (OCT date) n = 97	EDSS (+1 year) n = 79
RNFL	ZONE 1	-0.193	-0.288**	-0.232*	-0.317**
	ZONE 2	-0.227*	-0.299**	-0.254*	-0.296**
	ZONE 3	-0.307**	-0.378**	-0.344**	-0.331**
	ZONE 4	-0.259**	-0.352**	-0.317**	-0.264*
	ZONE 5	-0.173	-0.289**	-0.301**	-0.218
	ZONE 6	-0.111	-0.149	-0.101	-0.16
GCL	ZONE 1	-0.180	-0.268**	-0.109	-0.108
	ZONE 2	-0.243*	-0.320**	-0.162	-0.201
	ZONE 3	-0.283**	-0.323**	-0.070	-0.086
	ZONE 4	-0.085	-0.143	-0.001	-0.012
	ZONE 5	-0.198*	-0.274*	-0.048	0.012
	ZONE 6	-0.258**	-0.332**	-0.121	-0.128

261

262 *Ganglion Cell Layer:*

263 When compared with controls using the Mann–Whitney *U* test, the RR-MS group presented 35  
 264 cells with significant differences ( $p < 0.001^*$ ) (Table 1; Figure 2). The Kruskal–Wallis *H* test  
 265 revealed several differences versus healthy controls in the CSO RR-MS subgroups (Table 2),  
 266 and highly significant differences were observed in 5 zones.

267 *Post hoc* analysis with Bonferroni correction (Table 2; Figure 3, upper) showed significant  
 268 differences in subgroup CSO-1 versus healthy controls in zones 1 ( $p < 0.001$ ), 2 ( $p < 0.001$ ), 5  
 269 ( $p = 0.009$ ), and 6 ( $p = 0.024$ ). In subgroup CSO-2, significant differences were found in zones  
 270 1 ( $p < 0.001$ ), 2 ( $p < 0.001$ ), 3 ( $p = 0.008$ ), 5 ( $p < 0.001$ ), and 6 ( $p < 0.001$ ). No differences were  
 271 found between CSO subgroups at GCL layer level.

272 In the CDMS subgroups, significant differences ( $p < 0.001^*$ ) were observed in 31 cells (Table  
 273 3; Figure 3, lower). When the CDMS subgroups were compared with healthy controls, *post hoc*  
 274 analysis revealed significant differences with Bonferroni correction in subgroup CDMS-1 in  
 275 zones 1 ( $p < 0.001$ ), 2 ( $p < 0.001$ ), 5 ( $p = 0.004$ ), and 6 ( $p = 0.045$ ). Subgroup CDMS-2 showed  
 276 significant differences in zones 1 ( $p < 0.001$ ), 2 ( $p < 0.001$ ), 3 ( $p < 0.001$ ), 4 ( $p = 0.009$ ), 5  
 277 ( $p < 0.001$ ), and 6 ( $p < 0.001$ ). In subgroups CDMS-1 and CDMS-2, significant differences  
 278 were found between zones 1 ( $p = 0.036$ ), 2 ( $p = 0.015$ ), 3 ( $p = 0.004$ ), and 6 ( $p = 0.028$ ).

279 Correlation analysis between mean GCL thickness and MS severity (EDSS) did not identify  
 280 statistical significance ( $r = 0.701$ ;  $p = 0.094$ ). The Spearman test revealed similar results for  
 281 both the GCL and the RNFL for the CSO and CDMS time point correlations (Table 4);  
 282 significant mild inverse correlation was found with CDMS, and no correlation was observed  
 283 with EDSS-0 or EDSS-1 (Figure 4).

284

## 285 DISCUSSION

286 The aim of this study was to ascertain whether the OCT Spectralis posterior pole protocol  
 287 provides precise information about retinal layers usable in early detection and monitoring of  
 288 multiple sclerosis. This is a novel study; according to our bibliography review, this is the first  
 289 paper to use the posterior pole protocol with MS patients.

290 Using the posterior pole protocol, we found that both the GCL and the RNFL showed  
 291 significant thinning when comparing RR-MS patients with healthy controls. Our results support  
 292 previous findings in studies that used the classic Spectralis protocols.<sup>12,16–18,25,30</sup> This study,  
 293 however, provides new results achieved with the posterior pole protocol, which offers the  
 294 opportunity to analyze larger areas than the classic macular protocols based on ETDRS grid  
 295 analysis. In addition, the posterior pole protocol improves anatomical determination of the  
 296 location of the papillomacular bundle. This bundle is very important in MS since previous

297 studies have demonstrated that the papillomacular bundle indicates onset of one of the first  
298 anatomopathological processes established in MS, hence its potential value as an early  
299 diagnostic biomarker.<sup>31</sup>

300 Considerable reduction in axonal density has been demonstrated in areas of demyelination, but  
301 not all axons are damaged to the same extent. Axons with smaller diameters are more vulnerable  
302 than those with larger ones.<sup>32</sup> It is known that axons are distributed in the retina in differing  
303 proportions depending on their diameter, and that there is a greater density of axons of smaller  
304 diameter around the macula and the papillomacular bundle.<sup>31-32</sup>

305 In our study of patients with early-stage MS, it is precisely this region that exhibits the most  
306 notable decline in thickness. These small dimensions have the drawback of being challenging  
307 for OCT to measure, potentially making segmentation in areas of thinning less precise.

308  
309 Traditionally, the peripapillary RNFL has been used to evaluate MS patients.<sup>6,8,33,34</sup> Our results  
310 confirm previous findings regarding the significant impact MS has on the GCL, even in early  
311 stages of the disease following symptom onset. These results do not diminish the importance of  
312 the RNFL as significant correlations were observed in GCL and RNFL thickness. Our results  
313 also suggest that the GCL is affected before the RNFL. This was observed in the CSO-1 and  
314 CDMS-1 groups, which had zones with significant GCL damage. Meanwhile, zone 5 (inferior-  
315 temporal) and zone 6 (superior-temporal) did not exhibit differences in RNFL. In zone 4  
316 (inferior-nasal), while the RNFL was affected the GCL was not affected for the first 5 years in  
317 both groups and subgroups.

318 These results are in accordance with those reported by Green, Ratchford, Pietroboni et al.<sup>17,18,35</sup>  
319 Additionally, Altan et al.<sup>21</sup> found that, in contrast with the RNFL, GCL thickness seems to have  
320 no intra-eye asymmetry in healthy Caucasian subjects. This, in addition to our own findings,  
321 gives more consistency to the hypothesis of GCL as a biomarker for MS diagnosis and follow-  
322 up.

323 Regarding the EDSS in our patients, significant correlations were observed in the retinal fiber  
324 layer at the time of the OCT scan but not in the GCL; similar findings were made by Eslami et  
325 al.<sup>36</sup> and Shi C et al.<sup>37</sup> The reason for this, we believe, is that the EDSS is a parameter without a  
326 complete linear progression; it varies with disease episodes (intensity and type). Interestingly,  
327 we found areas of correlation between the RNFL and the EDSS 1 year after the OCT  
328 examination. Similar results were observed by Montolio et al.<sup>38</sup> and Rothman et al.,<sup>39</sup> who found  
329 a significant inverse correlation between macular volume and EDSS 10 years later.

330 Our results suggest that, in MS, the posterior pole protocol detects GCL affection earlier than  
331 changes in the RNFL are detected. Also, the GCL seems to be the layer best correlated with  
332 disease duration even when starting from the time of symptom onset. A time lapse between  
333 symptom onset and definite MS diagnosis exists and while in some cases this lapse may extend  
334 to several years, retinal changes are already established. In addition, our results suggest that the  
335 RNFL is a good indicator of disease severity prognosis (EDSS score 1 year later); the greater  
336 the macular RNFL thinning, the greater the possibility of disability progression.

337 The main limitations of this study are as follows: i) It is monocentric and has used a single OCT  
338 acquisition system. It would be useful to analyze whether the conclusions of this paper can be  
339 generalized to include other conditions, other populations, and even other OCT devices; ii) It is  
340 a cross-sectional study. If it included longitudinal patient follow-up, the usefulness of the  
341 method in monitoring the disease could be assessed; iii) The time-based allocation of the  
342 subgroups could include errors due to the lack of precision in the information on the dates of  
343 disease diagnosis and outbreak in the available documents.

344 In conclusion, wide macular OCT, as well as the posterior pole protocol, are helpful tools with  
345 which to diagnose and monitor RR-MS in eyes without a previous history of optic neuritis.  
346 Protocols not based on the ETDRS grid allow practitioners to identify individual areas of  
347 damage and to detect clusters on retinal layers and so enable accurate follow-up. This protocol  
348 could also offer a useful way to predict disability due to the measurement accuracy of the APS



349 system, which defines the papillomacular bundle better than other alternatives and provides  
 350 greater scan density: 61 scans versus 49 scans under the classic fast macular protocol. Further  
 351 studies evaluating the capability of this new posterior pole protocol to diagnose early-stage MS  
 352 in different MS phenotypes and in eyes with a history of optic neuritis would help us to  
 353 understand the pathophysiology of this disease better.

354 The greatest advantage of this protocol is that analyzes all the layers of the retina in their actual  
 355 location rather than drawing conclusions from small analyses obtained using automatic ETDRS  
 356 analysis. The International Multiple Sclerosis Vision System Consortium (IMVISUAL)<sup>40</sup>  
 357 acknowledges that data published in recent years demonstrate the effectiveness of OCT in the  
 358 diagnosis and treatment of MS. The future of this research is oriented toward applying artificial  
 359 intelligence in the diagnosis and management of neurodegenerative diseases using OCT.

360

# 361 REFERENCES:

- 362 1. Biernacki T, Sandi D, Fricska-Nagy Z, Kincses ZT, Fűvesi J, Laczkó R, et al.  
 363 Epidemiology of multiple sclerosis in Central Europe, update from Hungary. *Brain*  
 364 *Behav.* 2020;20.
- 365 2. Kaufmann M, Puhon MA, Salmen A, Kamm CP, Manjaly ZM, Calabrese P, et al.  
 366 60/30: 60% of the Morbidity-Associated Multiple Sclerosis Disease Burden Comes  
 367 From the 30% of Persons With Higher Impairments. *Front Neurol.* 2020; 11:156.
- 368 3. Campbell JA, Simpson S Jr, Ahmad H, Taylor BV, van der Mei I, Palmer AJ. Change  
 369 in multiple sclerosis prevalence over time in Australia 2010-2017 utilising disease-  
 370 modifying therapy prescription data. *Mult Scler.* 2019;1352458519861270.
- 371 4. GBD 2016 Neurology Collaborators. Global, regional, and national burden of  
 372 neurological disorders, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of  
 373 Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 2019 ;18(5):459-480.

- 374 5. Agrawal M, Shah S, Patel A, Pinotti R, Colombel JF, Burisch J. Changing  
375 epidemiology of immune-mediated inflammatory diseases in immigrants: A systematic  
376 review of population-based studies. *J Autoimmun.* 2019;105:102303.
- 377 6. Petzold A, de Boer JF, Schippling S, Vermersch P, Kardon R, Green A, Calabresi PA,  
378 Polman C. Optical coherence tomography in multiple sclerosis: a systematic review and  
379 meta-analysis. *Lancet Neurol.* 2010 Sep;9(9):921-32.
- 380 7. Balk LJ, Cruz-Herranz A, Albrecht P, Arnow S, Gelfand JM, Tewarie P, et al. Timing  
381 of retinal neuronal and axonal loss in MS: a longitudinal OCT study. *J Neurol.* 2016  
382 ;263(7):1323-31.
- 383 8. Garcia-Martin E, Pueyo V, Martin J, Almarcegui C, Ara JR, Dolz I, et al. Progressive  
384 changes in the retinal nerve fiber layer in patients with multiple sclerosis. *FJ.Eur J*  
385 *Ophthalmol.* 2010;20(1):167-173.
- 386 9. Manogaran P, Samardzija M, Schad AN, Wicki CA, Walker-Egger C, Rudin M, et al.  
387 Retinal pathology in experimental optic neuritis is characterized by retrograde  
388 degeneration and gliosis. *Acta Neuropathol Commun.* 2019;7(1):116.
- 389 10. Britze J, Frederiksen JL. Optical coherence tomography in multiple sclerosis. *Eye*  
390 *(Lond).* 2018 May;32(5):884-888. doi: 10.1038/s41433-017-0010-2.
- 391 11. Siger M, Dziegielewska K, Jasek L, Bieniek M, Nicpan A, Nawrocki J, Selmaj K.  
392 Optical coherence tomography in multiple sclerosis: thickness of the retinal nerve fiber  
393 layer as a potential measure of axonal loss and brain atrophy. *J Neurol.* 2008  
394 Oct;255(10):1555-60.
- 395 12. Cavaliere C, Vilades E, Alonso-Rodríguez MC, Rodrigo MJ, Pablo LE, Miguel JM, et  
396 al. Computer-Aided Diagnosis of Multiple Sclerosis Using a Support Vector Machine  
397 and Optical Coherence Tomography Features. *Sensors (Basel).* 2019 ;19(23).
- 398 13. Carcelén-Gadea M, Quintanilla-Bordás C, Gracia-García A, García-Villanueva C,  
399 Jannone-Pedro N, Álvarez-Sánchez L, et al. Functional and structural changes in the  
400 visual pathway in multiple sclerosis. *Brain Behav.* 2019 ;9(12).



- 401 14. Chisari CG, Toro MD, Cimino V, Rejdak R, Luca M, Rapisarda L, et al. Retinal Nerve  
 402 Fiber Layer Thickness and Higher Relapse Frequency May Predict Poor Recovery after  
 403 Optic Neuritis in MS Patients. *J Clin Med*. 2019 ;8(11).
- 404 15. Button J, Al-Louzi O, Lang A, Bhargava P, Newsome SD, Frohman T, et al. Disease-  
 405 modifying therapies modulate retinal atrophy in multiple sclerosis: A retrospective  
 406 study. *Neurology*. 2017 ;88(6):525-532.
- 407 16. Trip SA, Schlottmann PG, Jones SJ, Altmann DR, Garway-Heath DF, Thompson AJ, et  
 408 al. Retinal nerve fiber layer axonal loss and visual dysfunction in optic neuritis. *Ann*  
 409 *Neurol*. 2005;58(3):383–391.
- 410 17. Green AJ, McQuaid S, Hauser SL, Allen IV, Lyness R. Ocular pathology in multiple  
 411 sclerosis: retinal atrophy and inflammation irrespective of disease duration. *Brain*.  
 412 2010;133(6):1591–1601.
- 413 18. Ratchford JN, Saidha S, Sotirchos ES, Oh JA, Seigo MA, Eckstein C, et al. Active MS  
 414 is associated with accelerated retinal ganglion cell/inner plexiform layer thinning.  
 415 *Neurology* 2013; 80:47–54
- 416 19. Casado A, Cerveró A, López-de-Eguileta A, Fernández R, Fonseca S, González JC, et  
 417 al. Topographic correlation and asymmetry analysis of ganglion cell layer thinning and  
 418 the retinal nerve fiber layer with localized visual field defects. *PLoS One*. 2019 ;14(9):  
 419 e0222347.
- 420 20. Ghassabi Z, Nguyen AH, Amini N, Henry S, Caprioli J, Nouri-Mahdavi K. The Fovea-  
 421 BMO Axis Angle and Macular Thickness Vertical Asymmetry Across The Temporal  
 422 Raphe. *J Glaucoma*. 2018 ;27(11):993-998.
- 423 21. Altan C, Arman BH, Arici M, Urdem U, Solmaz B, Pasaoglu I, et al. Normative  
 424 posterior pole asymmetry analysis data in healthy Caucasian population. *Eur J*  
 425 *Ophthalmol*. 2019 ;29(4):386-393.
- 426 22. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, et al. Diagnostic  
 427 criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol*.  
 428 2005 ;58:840-846.

23. Schuman JS, Pedut-Kloizman T, Hertzmark E, Hee MR, Wilkins JR, Coker JG et al. Reproducibility of nerve fibre layer thickness measurements using optical coherence tomography. *Ophthalmol.* 1996; 103 (11): 1889–1898.
24. Balasubramanian M, Bowd C, Vizzeri G, Weinreb RN, Zangwill LM. Effect of image quality on tissue thickness measurements obtained with spectral domain-optical coherence tomography. *Opt Express* 2009;17:4019-4036
25. Carney KR1, Bryan CD1, Gordon HB1, Kwan KM2. LongAxis: A MATLAB-based program for 3D quantitative analysis of epithelial cell shape and orientation. *Dev Biol.* 2020 ;458(1):1-11.
26. Tang FY, Chan EO, Sun Z, Wong R, Lok J, Szeto S, et al. Clinically relevant factors associated with quantitative optical coherence tomography angiography metrics in deep capillary plexus in patients with diabetes. *Eye Vis (Lond).* 2020 ;7:7.
27. Jędzierowska M, Koprowski R, Wilczyński S, Kryś K A new method for detecting the outer corneal contour in images from an ultra-fast Scheimpflug camera. *Biomed Eng Online.* 2019 ;18(1):115.
28. Ratanapakorn T, Daengphoonphol A, Eua-Anant N, Yospaiboon Y. Digital image processing software for diagnosing diabetic retinopathy from fundus photograph. *Clin Ophthalmol.* 2019 ;13:641-648.
29. Seol BR, Yoo BW, Kim YK, Jeoung JW, Park KH. Comparison of changes of macular ganglion cell-inner plexiform layer defect between stable group and progression group in primary open-angle glaucoma. *Jpn J Ophthalmol.* 2018 ;62(4):491-498.
30. Hu H, Jiang H, Gameiro GR, Hernandez J, Delgado S, Wang J. Focal Thickness Reduction of the Ganglion Cell-Inner Plexiform Layer Best Discriminates Prior Optic Neuritis in Patients With Multiple Sclerosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2019 ;60(13):4257-4269.
31. Pérez Del Palomar A, Cegoñino J, Montolio A, Orduna E, Vilades E, Sebastián B, et al. Swept source optical coherence tomography to early detect multiple sclerosis disease. The use of machine learning techniques. *PLoS One.* 2019 ;14(5).

- 457 32. Evangelou, N, D Konz, M M Esiri, S Smith, J Palace, and P M Matthews. 2001. Size-  
458 Selective Neuronal Changes in the Anterior Optic Pathways Suggest a Differential  
459 Susceptibility to Injury in Multiple Sclerosis. *Brain*. 2001 ;124 (9): 1813–1820
- 460 33. Jankowska-Lech I, Wasyluk J, Palasik W, Terelak-Borys B, Grabska-Liberek I.  
461 Peripapillary retinal nerve fiber layer thickness measured by optical coherence  
462 tomography in different clinical subtypes of multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord*.  
463 2019 ; 27:260-268.
- 464 34. Birkeldh U, Manouchehrinia A, Hietala MA, Hillert J, Olsson T, Piehl F, et al. The  
465 Temporal Retinal Nerve Fiber Layer Thickness Is the Most Important Optical  
466 Coherence Tomography Estimate in Multiple Sclerosis. *Front Neurol*. 2017 ;8:675.
- 467 35. Pietroboni AM, Dell'Arti L, Caprioli M, Scarioni M, Carandini T, Arighi A, et al. The  
468 loss of macular ganglion cells begins from the early stages of disease and correlates  
469 with brain atrophy in multiple sclerosis patients. *Mult Scler*. 2019 ;25(1):31-38.
- 470 36. Shi C, Jiang H, Gameiro GR, Hu H, Hernandez J, Delgado S, et al. Visual Function and  
471 Disability Are Associated With Focal Thickness Reduction of the Ganglion Cell-Inner  
472 Plexiform Layer in Patients With Multiple Sclerosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2019  
473 ;60(4):1213-1223.
- 474 37. Eslami F, Ghiasian M, Khanlariade E, Moradi E. Retinal Nerve Fiber Layer Thickness  
475 and Total Macular Volume in Multiple Sclerosis Subtypes and Their Relationship with  
476 Severity of Disease, a Cross-Sectional Study. *Eye Brain*. 2020;12:15-23.
- 477 38. Montolio A, Cegoñino J, Orduna E, Sebastian B, Garcia-Martin E, Pérez Del Palomar  
478 A. A mathematical model to predict the evolution of retinal nerve fiber layer thinning in  
479 multiple sclerosis patients. *Comput Biol Med*. 2019 ;111:103357.
- 480 39. Rothman A, Murphy OC, Fitzgerald KC, Button J, Gordon-Lipkin E, Ratchford JN, et  
481 al. Retinal measurements predict 10-year disability in multiple sclerosis. *Ann Clin*  
482 *Transl Neurol*. 2019 ;6(2):222-232.
- 483 40. Balcer LJ, Balk LJ, Brandt AU, Calabresi PA, Martinez-Lapiscina EH, Nolan RC, Paul  
484 F, Petzold A, Saidha S. The International Multiple Sclerosis Visual System Consortium:

Advancing Visual System Research in Multiple Sclerosis. *J Neuroophthalmol.* 2018  
Dec;38(4):494-501. doi: 10.1097/WNO.0000000000000732. PMID: 30418332;  
PMCID: PMC8898562.

# FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** Image of posterior pole protocol. A: Color thickness map of the 64 OCT scans and the 8 × 8 analysis grid positioned on the macula for the RNFL; B: Color thickness map of the 64 OCT scans and the 8 × 8 analysis grid positioned on macula for the GCL; numerical values on the grid indicate microns of thickness for each cell. The color map associates warm colors with higher thickness values and cool colors with lower thickness values in a gradient, indicating the value in the legend every 25 microns (RNFL. Image A) and every 10 microns (GCL. Image B); C: six proposed zones on the macular thickness map, labeled with different colors.

**Figure 2.** Contour map, generated from numerical data on each cell measured using the posterior pole protocol, showing mean retinal fiber layer thickness analysis in Mathworks. The legend indicates 10-micron thickness steps, with warm colors representing higher thickness values and cool colors representing lower thickness values. A: retinal fiber layer from control group; B: retinal fiber layer from remitting-relapsing multiple sclerosis; C: ganglion cell layer from control group; D: ganglion cell layer from remitting-relapsing multiple sclerosis. Abbreviations: RR-MS, remitting-relapsing multiple sclerosis.

510 **Figure 3.** Contour map, generated from numerical data on each cell measured using the  
 511 posterior pole protocol, showing mean retinal fiber layer and ganglion cell layer thickness  
 512 analysis in Mathworks for subgroups of years. The legend associates warm colors with higher  
 513 thickness values in microns and cool colors with lower thickness values. The upper images  
 514 show clinical symptom onset analysis and the lower images show clinically definite multiple  
 515 sclerosis. Abbreviations: CSO, clinical symptom onset; CDMS, clinically definite multiple  
 516 sclerosis; RNFL, retinal nerve fiber layer; GCL, ganglion cell layer.  
 517

518 **Figure 4.** Image of numerical data of mean Pearson correlation coefficient analysis for the  
 519 RNFL and Spearman correlation coefficient for the GCL in Mathworks. Each map represents  
 520 the grid of 64 pole cells, with color depending on the correlation value indicated in the legend in  
 521 steps from 0.1 associated with a color. Positive correlation values are associated with warm  
 522 colors and negative correlation values are associated with cool colors. Correlation between the  
 523 retinal nerve fiber layer and time since symptom onset, time since clinically definite multiple  
 524 sclerosis diagnosis, expanded disability status scale at optical coherence tomography  
 525 examination, and 1 year after; correlation between the ganglion cell fiber layer and time since  
 526 symptom onset, time since clinically definite multiple sclerosis, expanded disability status scale  
 527 at optical coherence tomography examination, and 1 year after. The asterisks show significant  
 528 levels that overcome Bonferroni correction for multiple comparisons. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.005$ .  
 529 Abbreviations: CSO, clinical symptom onset; CDMS, clinically definite multiple sclerosis;  
 530 EDSS-0, expanded disability status scale at optical coherence tomography examination; EDSS-  
 531 1, expanded disability status scale 1 year after optical coherence tomography examination.

Figure 2 [Click here to access/download;Figure;Figure 2.tif](#)

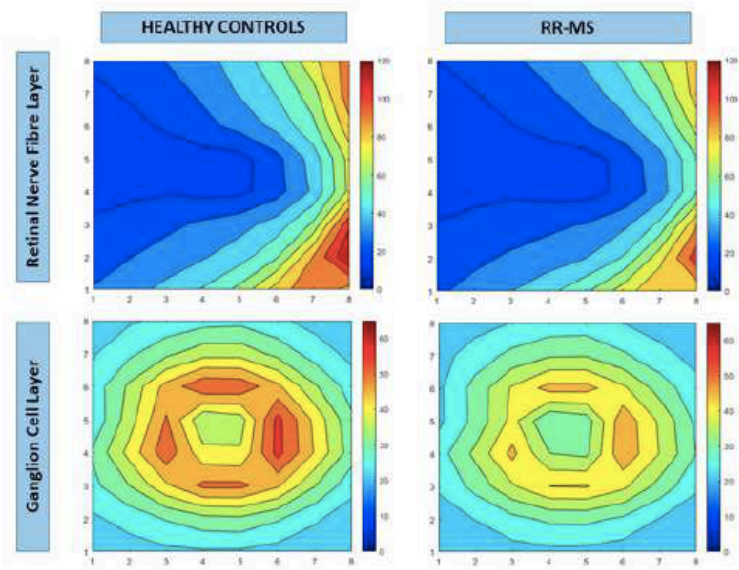


Figure 2.jpg

Figure 1 [Click here to access/download;Figure;Figure 1.tif](#)

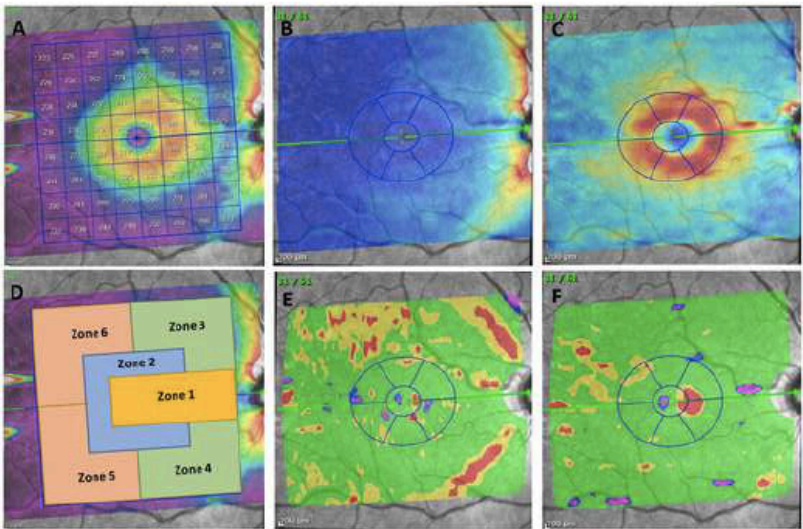


Figure 1.jpg



Figure 3 [Click here to access/download;Figure;Figure 3.tiff](#)

Figure 3.jpg

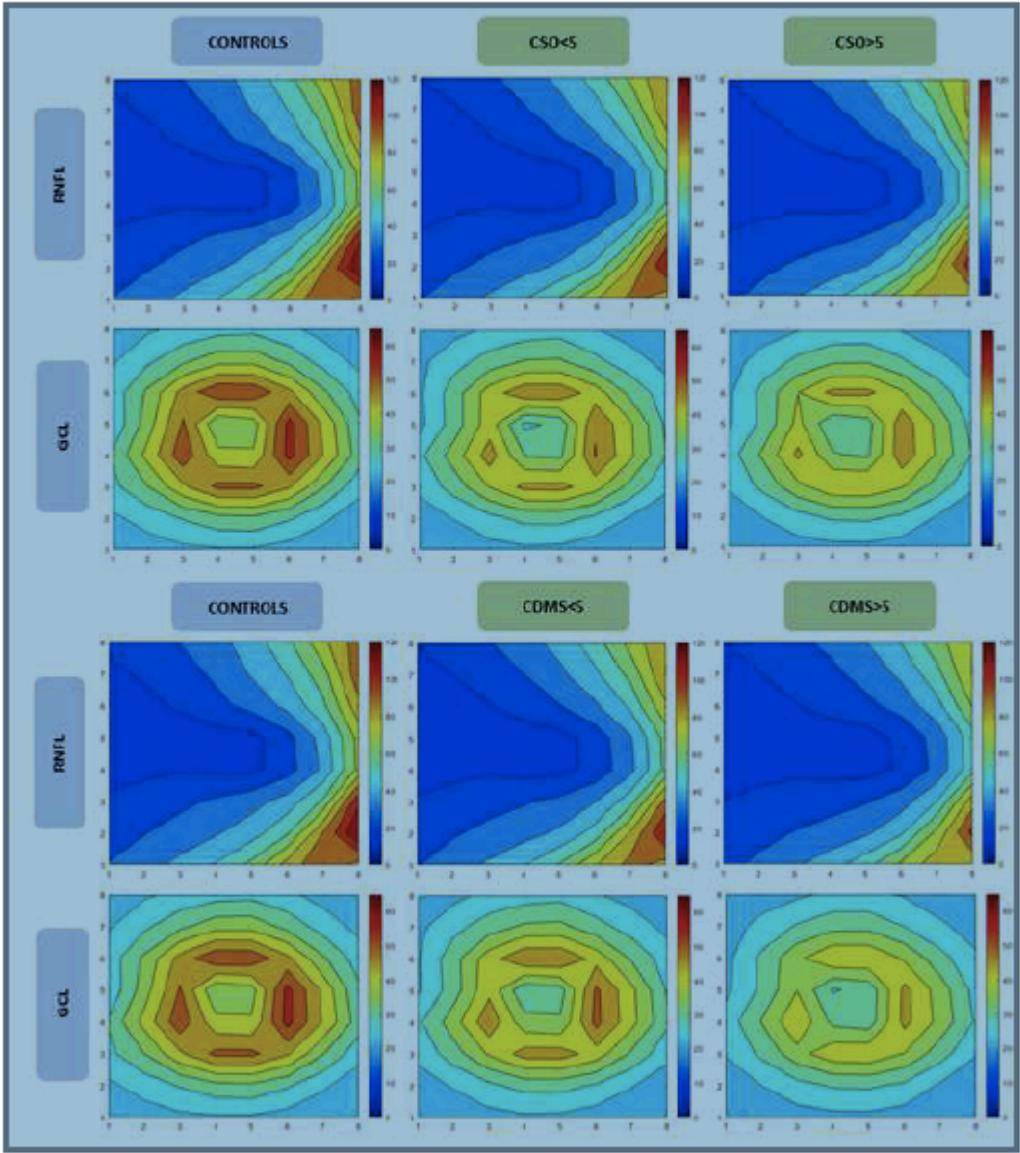


Figure 4 [Click here to access/download;Figure;Figure 4.tif](#)

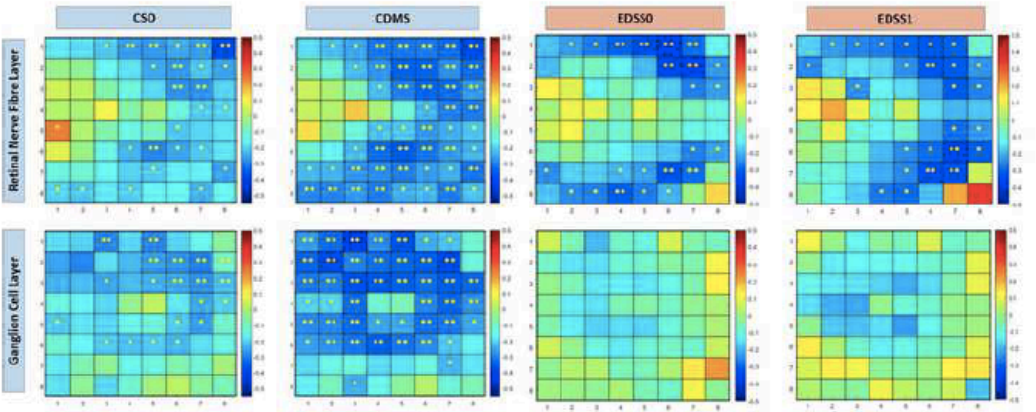


Figure 4.jpg





## DISCUSIÓN UNIFICADA

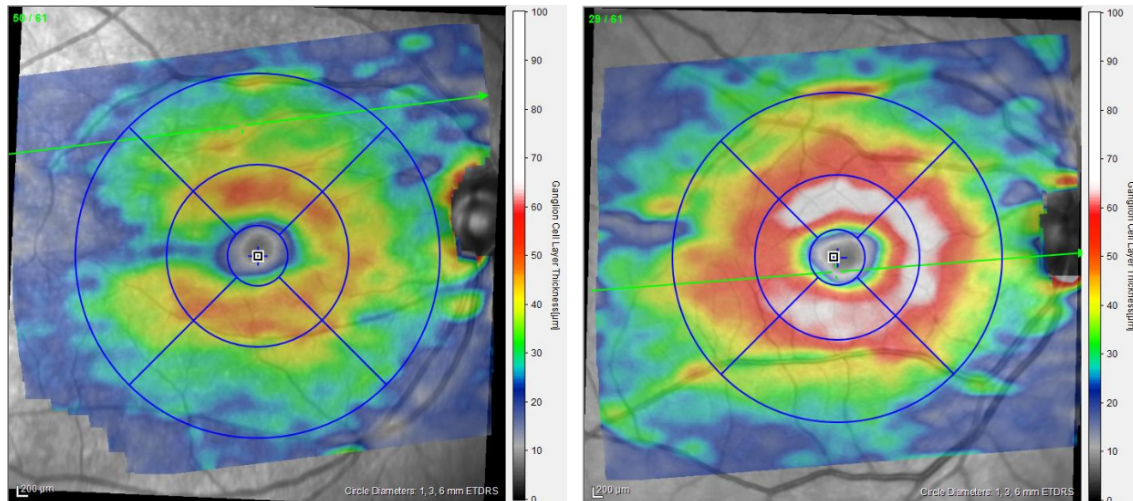
Nuestra investigación ha sido planteada con el propósito de estudiar nuevos métodos y pruebas para mejorar el diagnóstico y seguimiento de pacientes con EM. Para ello, el trabajo se compone de cuatro artículos relacionados con la estructura y función de la retina en pacientes con EM. En dos de ellos, el estudio de la enfermedad se lleva a cabo con la prueba de ERG-mf, uno de ellos con la prueba de OCT-A y el último publicado con un protocolo premium polo posterior de OCT.

Antes de discutir los resultados obtenidos, debemos dejar claro que han de tomarse con cautela ya que el número de la muestra, sobre todo en algunos de ellos, es reducida y se trata de una muestra recogida en un mismo hospital, y por tanto no es totalmente representativa de todas las poblaciones. En esta línea de investigación tratamos de aumentar cada día los datos, los participantes y a su vez incluir las nuevas pruebas que el desarrollo y avance del procesamiento de las imágenes nos permitan.

El análisis de nuestros resultados nos lleva a confirmar que, la estructura de la retina de pacientes con EM-RR se ve alterada frente a sujetos sanos. No solo con un adelgazamiento de las capas superficiales de la retina (CFNR y CCG), sino también con una disminución de flujo vascular en el plexo superficial de la retina. Primeramente, tener en cuenta que el área de análisis en el protocolo Ppole medido con OCT es de 6,8 mm x 6,8mm; y el área de análisis medido con el OCTA es un diámetro de 3 mm y por tanto menor. Hay que considerar también que la valoración de estos resultados es de medidas realizadas con distintos aparatos de distintas casas comerciales, lo que supone una evaluación no extrapolable.

Prestando atención a esto, se ha determinado que, en pacientes con EM, el adelgazamiento de la capa de CCG parece ser más marcado en etapas iniciales de la enfermedad en la zona del haz papilomacular, área central y área temporal de la retina. Siendo afectada más adelante la zona nasal superior e inferior. Esto podría suponer un punto de referencia a la hora de determinar un diagnóstico precoz de la enfermedad. El patrón o disposición concéntrica de la capa de células

ganglionares, comienza a verse afectado en la zona temporal con un patrón en herradura. Podemos ver como ejemplo la diferencia de adelgazamiento en un sujeto con EM y control sano de esta capa de células. (Fig. 21)



*Figura 19. Mapa de espesores de la capa de células ganglionares de la retina medido con protocolo Posterior Pole de OCT en paciente con esclerosis múltiple a la izquierda y en control sano a la derecha. Se representa con colores cálidos las zonas de mayor espesor, y con colores fríos las zonas con menor espesor.*

En el caso de la CFNR las áreas adelgazadas de forma más precoz son el haz papilomacular, y las zonas central y nasal inferior; afectándose con el tiempo la zona superior nasal e inferior temporal.

En el análisis realizado de la densidad vascular mediante OCTA encontramos que el plexo superficial, que abarca aproximadamente en cuanto a la estructura de la retina la CFNR y CCG, tiene una disminución de flujo vascular en las zonas nasal, superior e inferior de la retina en los pacientes con duración de la enfermedad superior a años. Por tanto, esto sugiere que, en las primeras etapas de la enfermedad, no se observaron alteraciones a nivel de flujo vascular retiniano, y que estos cambios aparecen tras varios años padeciendo la EM.

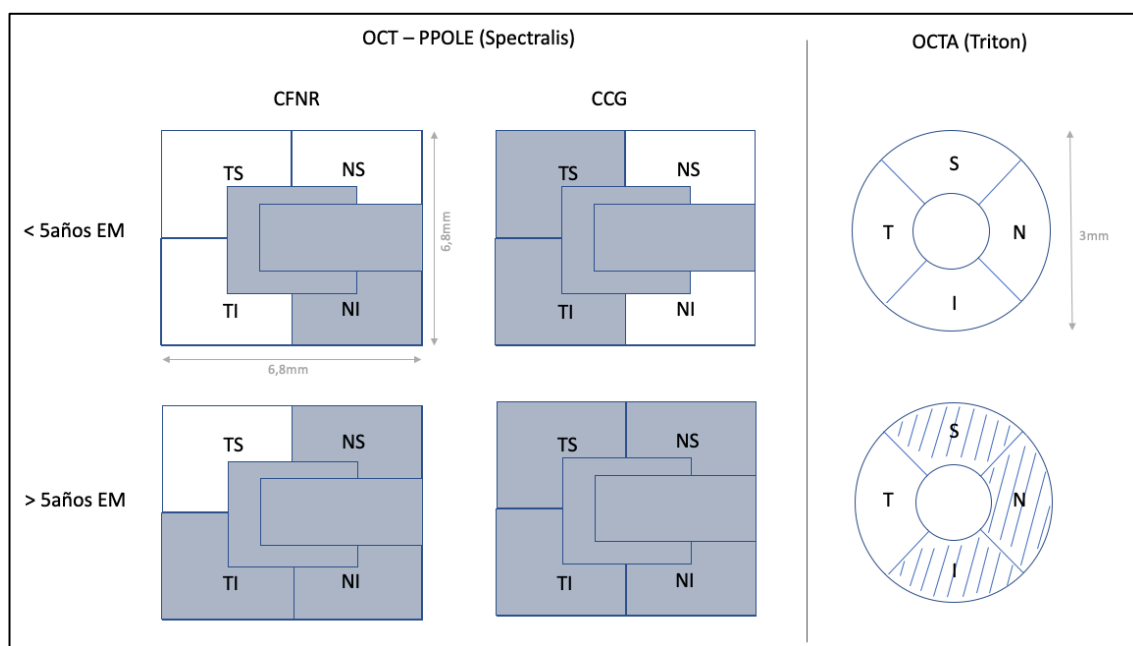


Figura 20. Dibujo resumen original de resultados obtenidos en artículos 3 y 4. Marcados en color oscuro las áreas de tomografía de coherencia óptica analizadas mediante protocolo posterior pole) con adelgazamiento en la capa de fibras nerviosas de la retina y en la capa de células ganglionares); y con fondo rayado las áreas de angiografía mediada por tomografía de coherencia óptica con menor densidad de flujo vascular.

Con estos resultados podemos indicar que, el adelgazamiento estructural es uno de los primeros cambios que han sido percibidos por dispositivos de imagen como el OCT en nuestros pacientes, abarcando mayor área de alteración la CCG. A partir de 5 años de diagnóstico, se pudo apreciar una disminución de densidad de flujo vascular en la zona nasal, superior e inferior de la mácula medido por OCTA, que coincidió con la zona de adelgazamiento de los núcleos y axones en ambas capas también a partir de los 5 años de diagnóstico.

Esto nos lleva a pensar que, el primer reflejo de la enfermedad a nivel estructural se observó como un adelgazamiento en la zona central y del haz papilomacular tanto en CCG como en CFNR. Además, destaca la zona temporal de la macula con el adelgazamiento único de CCG. Sin embargo, el adelgazamiento vascular no se registra en los primeros estadios de la enfermedad, apareciendo más tarde con una disminución del flujo vascular en la parte nasal superior e inferior de la mácula.

En los resultados obtenidos de los artículos basados en los datos de electroretinografía multifocal, se encontró una alta capacidad de distinción entre EM y sanos teniendo en cuenta el método de agrupación de celdas desarrollado en el estudio. Siendo conscientes de la limitación del número de muestra, obtuvimos un valor mayor de curva ROC para la latencia de la onda P1

en las agrupaciones de celdas ubicadas en la parte nasal-inferior de la retina y teniendo en cuenta la amplitud de la onda, un valor mayor de curva ROC, aunque no tan alto como con la latencia, en la zona parafoveal temporal. Esto confirma que la enfermedad de EM altera significativamente la latencia de la onda P1 y que una agrupación (siguiendo el método propuesto) nos da una capacidad de diferenciación entre sujeto sano y paciente EM-RR mayor que los patrones de agrupación estándar.

En el análisis de descomposición utilizado en el segundo artículo, se trabaja con el valor filtrado de la señal en cuatro componentes con el objetivo de obtener una señal más limpia. En este caso, siguiendo las agrupaciones clásicas, el cuadrante nasal inferior indicó también una diferencia significativa de reducción de onda frente a los sujetos sanos. (Fig. 21)

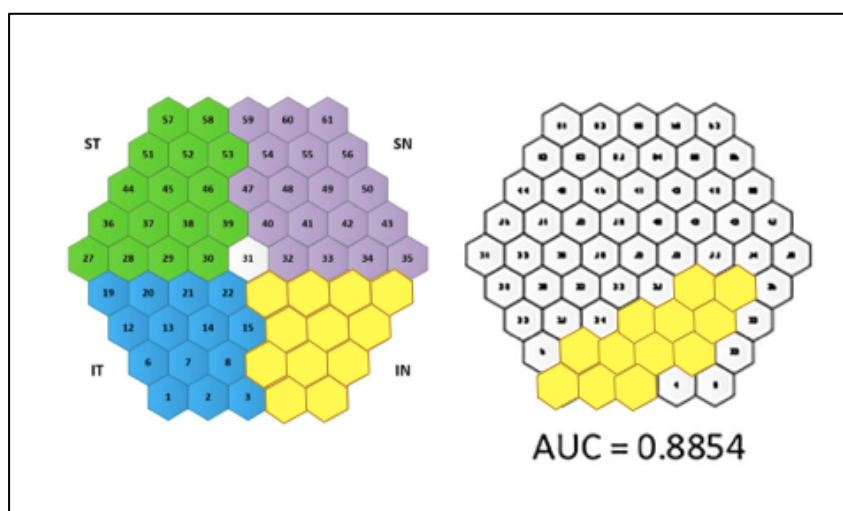


Figura 21. Representación de celdas de electroretinograma multifocal con resultados significativos en amarillo de los artículos presentados. Izquierda: Zona nasal inferior con diferencia significativa de disminución de onda en esclerosis múltiple frente a sujetos sanos. Derecha: Una de las agrupaciones con mayor área bajo la curva con el método analizado en la latencia de la onda P1. Fuente de la figura original.

Nuestros resultados sugieren que existe una afectación en la retina de los pacientes con EM que apoya estudios previamente publicados. El ERG es una prueba que puede darnos una especificidad muy alta a la hora de distinguir entre pacientes y sujetos sanos, además de darnos resultados acordes al análisis estructural de la retina: Existe una disminución de la onda eléctrica de la retina en áreas que a su vez muestra adelgazamiento estructural de la CCG y de la CFNR mediante OCT.



## CONCLUSIONES

- I. Los resultados obtenidos del análisis estructural y funcional de la retina en pacientes con esclerosis múltiple con fenotipo remitente recurrente resultan útiles para poder proporcionar un patrón significativo de afectación de la retina, incluso en estadios iniciales de la enfermedad.
- II. El método utilizado de agrupación de sectores de señales de electrorretinograma multifocal es capaz de establecer una discriminación entre pacientes con esclerosis múltiple con fenotipo remitente recurrente y sujetos sanos, mejor que las agrupaciones clásicas de anillos y cuadrantes, confirmados con valores de área bajo la curva mayores.
- III. La máxima capacidad discriminante en cuanto a la amplitud de la onda P1 se da en el agrupamiento que corresponde con el área parafoveal temporal (área bajo la curva:  $AUC=0.7042$ ). Teniendo en cuenta la latencia de la onda, la AUC máxima ( $AUC=0,8854$ ) se da en el área nasal-inferior. La latencia de la onda P1 se altera más por la enfermedad con el método diseñado de agrupamiento.
- IV. Combinando el filtrado de señales de electrorretinograma multifocal con descomposición en modo empírico (EMD) y utilizando como parámetro de análisis la correlación con señales de una base de datos normativa, se ha obtenido un marcador claro (valor medio de área bajo la curva:  $AUC = 0,90$ ), con mayor capacidad discriminante entre pacientes con esclerosis múltiple y sujetos sanos en el anillo 4 ( $AUC = 0,96$ ) y en el cuadrante nasal inferior ( $AUC = 0,94$ ).
- V. La combinación de filtrado de grabaciones de electrorretinograma multifocal usando descomposición en modo empírico (EMD) y el cálculo de la correlación con una base de datos normativa hacen que el análisis de forma de onda de electrorretinograma multifocal sea aplicable a la evaluación de esclerosis múltiple en pacientes en etapas tempranas de la enfermedad.
- VI. Los valores de flujo vascular medidos con angiografía mediada por tomografía de coherencia óptica (OCT-A) aparecen significativamente disminuidos en el área superior, nasal e inferior de la mácula en pacientes que padecen esclerosis múltiple. La OCT-A es

una prueba rápida, simple, no invasiva y fácil de manejar que es útil en el diagnóstico de esta patología.

- VII. Se observó una disminución significativa de flujo vascular en el área nasal, área inferior y área superior macular en pacientes con esclerosis múltiple de más de 5 años de duración, en comparación con los sujetos sanos, lo que indica que el avance de la esclerosis múltiple se refleja a nivel del plexo superficial de la retina.
- VIII. La microvascularización retiniana no está alterada en pacientes afectados de esclerosis múltiple que han sufrido episodios de neuritis óptica en comparación con pacientes que no han sufrido neuritis.
- IX. No se observa una correlación significativa entre el flujo vascular y los valores de discapacidad funcional (medida con puntuación Expanded Disability Status Scale, EDSS) y de puntuación en el cuestionario de calidad de vida. Como es lógico, existe una fuerte correlación negativa entre los valores de calidad de vida y la puntuación EDSS, de forma que la calidad de vida disminuye cuando la discapacidad aumenta. El grupo de esclerosis múltiple con puntuaciones de EDSS inferiores a 3 presenta menor flujo en las zonas superior y nasal que los sujetos sanos. Estos resultados sugieren que la angiografía mediada por tomografía de coherencia óptica (OCT-A) es capaz de detectar una reducción en el flujo retiniano en pacientes con una discapacidad leve.
- X. Las capas de fibras nerviosas de la retina (CFNR) y de células ganglionares (CCG) muestran un adelgazamiento de espesor en pacientes con esclerosis múltiple frente a sujetos sanos. La esclerosis múltiple tiene un gran impacto en la capa de células ganglionares (CCG) incluso en etapas tempranas de la enfermedad, observando una disminución en un mayor número de áreas de la retina en la capa de células ganglionares (CCG) frente a las áreas de la capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR).
- XI. El espesor de la capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR) medido con protocolo posterior pole (PPole) de tomografía de coherencia óptica (OCT) muestra una alta correlación con la discapacidad de la esclerosis múltiple un año más tarde y, por tanto, se postula como un factor pronóstico útil en el seguimiento de esta enfermedad.





# BIBLIOGRAFÍA

- Abraham Kierszenbaum, L.T., 2019. Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology.
- Al-Nosairy, K.O., Hoffmann, M.B., Bach, M., 2021. Non-invasive electrophysiology in glaucoma, structure and function-a review. *Eye (Lond)*. 35, 2374-2385. <https://doi.org/10.1038/s41433-021-01603-0>
- Almarcegui, C., Dolz, I., Pueyo, V., Garcia, E., Fernandez, F.J., Martin, J., Ara, J.R., Honrubia, F., 2010. Correlation between functional and structural assessments of the optic nerve and retina in multiple sclerosis patients. *Neurophysiol. Clin. Neurophysiol.* 40, 129-135. <https://doi.org/10.1016/j.neucli.2009.12.001>
- Álvarez-Cermeño, J.C., Gasalla, T., María Villar, L., 2008. Value of oligoclonal band study in clinically isolated syndromes and multiple sclerosis. *Expert Rev. Neurother.* 8, 1279-1280. <https://doi.org/10.1586/14737175.8.9.1279>
- Anderson, D.R., 1973. Fine structure and function of ocular tissues. The optic nerve. *Int. Ophthalmol. Clin.* 13, 229-42.
- Anderson, D.R., 1970. Ultrastructure of the Optic Nerve Head. *Arch. Ophthalmol.* 83, 63-73. <https://doi.org/10.1001/archopht.1970.00990030065013>
- Anderson, D.R., Hoyt, W.F., 1969. Ultrastructure of Intraorbital Portion of Human and Monkey Optic Nerve. *Arch. Ophthalmol.* 82, 506-530. <https://doi.org/10.1001/archopht.1969.00990020508017>
- Andrade, A.O., Nasuto, S., Kyberd, P., Sweeney-Reed, C.M., Van Kanijn, F.R., 2006. EMG signal filtering based on Empirical Mode Decomposition. *Biomed. Signal Process. Control* 1, 44-55. <https://doi.org/10.1016/j.bspc.2006.03.003>
- Andréasson, S., 2006. Developments in molecular genetics and electrophysiology in inherited retinal disorders. *Acta Ophthalmol. Scand.* 84, 161-168. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0420.2006.00657.x>
- Ángela Vidal-Jordana, Jaume Sastre-Garriga, X.M., 2012. Tomografía de coherencia óptica en esclerosis múltiple. *Rev Neurol* 54, 556-63.
- B. Anand-Apte, J.G.H., 2010. Developmental Anatomy of the Retinal and Choroidal Vasculature.

- In Encyclopedia of the Eye. Academic Press.
- Barton, J.L., Garber, J.Y., Klistorner, A., Barnett, M.H., 2019. The electrophysiological assessment of visual function in Multiple Sclerosis. *Clin. Neurophysiol. Pract.* 4, 90-96. <https://doi.org/10.1016/j.cnp.2019.03.002>
- Castro, S.M.C., Damasceno, A., Damasceno, B.P., Vasconcellos, J.P. de, Reis, F., Iyeyasu, J.N., Carvalho, K.M. de, 2013. Visual pathway abnormalities were found in most multiple sclerosis patients despite history of previous optic neuritis. *Arq. Neuropsiquiatr.* 71, 437-441. <https://doi.org/10.1590/0004-282X20130058>
- Cavaliere, C., Vilades, E., Alonso-Rodríguez, M., Rodrigo, M., Pablo, L., Miguel, J., López-Guillén, E., Morla, E., Boquete, L., Garcia-Martin, E., 2019. Computer-Aided Diagnosis of Multiple Sclerosis Using a Support Vector Machine and Optical Coherence Tomography Features. *Sensors* 19, 5323. <https://doi.org/10.3390/s19235323>
- Charcot, J., 1892. Oeuvres complètes de JM Charcot. Tome 1. Leçons sur les maladies du système nerveux recueillies et publiées par Bourneville.
- Compston, A., Coles, A., 2008. Multiple sclerosis. *Lancet* 372, 1502-1517. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61620-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61620-7)
- Confavreux, C., AIMARD, G., DEVIC, M., 1980. COURSE AND PROGNOSIS OF MULTIPLE SCLEROSIS ASSESSED BY THE COMPUTERIZED DATA PROCESSING OF 349 PATIENTS. *Brain* 103, 281-300. <https://doi.org/10.1093/brain/103.2.281>
- Cook, S.D., Rohowsky-Kochan, C., Bansil, S., Dowling, P.C., 1995. Evidence for multiple sclerosis as an infectious disease. *Acta Neurol. Scand.* 91, 34-42. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1995.tb05854.x>
- Corallo, G., Cicinelli, S., Papadia, M., Bandini, F., Uccelli, A., Calabria, G., 2005. Conventional Perimetry, Short-Wavelength Automated Perimetry, Frequency-Doubling Technology, and Visual Evoked Potentials in the Assessment of Patients with Multiple Sclerosis. *Eur. J. Ophthalmol.* 15, 730-738. <https://doi.org/10.1177/112067210501500612>
- Curcio, C.A., Allen, K.A., 1990. Topography of ganglion cells in human retina. *J. Comp. Neurol.* 300, 5-25. <https://doi.org/10.1002/cne.903000103>
- del Palomar, A.P., Cegoñino, J., Montolío, A., Orduna, E., Vilades, E., Sebastián, B., Pablo, L.E., Garcia-Martin, E., 2019. Swept source optical coherence tomography to early detect multiple sclerosis disease. The use of machine learning techniques. *PLoS One.* <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0216410>
- Donze, C., Malapel, L., 2010. Prise en charge des troubles neurovisuels de la sclérose en plaques. *La Lett. médecine Phys. réadaptation* 26, 175-179. <https://doi.org/10.1007/s11659-010->

0247-7

- Federación Internacional de Esclerosis, (MSIF), M., 2012. Atlas de EM. PRIMERA PARTE: Mapa mundial de esclerosis múltiple: las conclusiones epidemiológicas más importantes, 3.a edició. ed.
- Filgueiras, T.G., Oyamada, M.K., Preti, R.C., Apóstolos-Pereira, S.L., Callegaro, D., Monteiro, M.L.R., 2019. Outer Retinal Dysfunction on Multifocal Electroretinography May Help Differentiating Multiple Sclerosis From Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. *Front. Neurol.* 10, 928. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00928>
- Filippi, M., Rocca, M.A., Ciccarelli, O., De Stefano, N., Evangelou, N., Kappos, L., Rovira, A., Sastre-Garriga, J., Tintorè, M., Frederiksen, J.L., Gasperini, C., Palace, J., Reich, D.S., Banwell, B., Montalban, X., Barkhof, F., MAGNIMS Study Group, 2016. MRI criteria for the diagnosis of multiple sclerosis: MAGNIMS consensus guidelines. *Lancet. Neurol.* 15, 292-303. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00393-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00393-2)
- Fisher, J., JACOBS, D., MARKOWITZ, C., GALETTA, S., VOLPE, N., NANOSCHIAVI, M., BAIER, M., FROHMAN, E., WINSLOW, H., FROHMAN, T., 2006. Relation of Visual Function to Retinal Nerve Fiber Layer Thickness in Multiple Sclerosis. *Ophthalmology* 113, 324-332. <https://doi.org/10.1016/j.opthta.2005.10.040>
- Garg, N., Smith, T.W., 2015. An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis. *Brain Behav.* 5. <https://doi.org/10.1002/brb3.362>
- Ghasemi, N., Razavi, S., Nikzad, E., 2016. Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy. *Cell J.* 19, 1-10. <https://doi.org/10.22074/cellj.2016.4867>
- Gordon-Lipkin, E., Chodkowski, B., Reich, D.S., Smith, S.A., Pulicken, M., Balcer, L.J., Frohman, E.M., Cutter, G., Calabresi, P.A., 2007. Retinal nerve fiber layer is associated with brain atrophy in multiple sclerosis. *Neurology.* <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000295995.46586.ae>
- Hainline, C., Rizzo, J.-R., Hudson, T.E., Dai, W., Birkemeier, J., Raynowska, J., Nolan, R.C., Hasanaj, L., Selesnick, I., Frohman, T.C., Frohman, E.M., Galetta, S.L., Balcer, L.J., Rucker, J.C., 2017. Capturing saccades in multiple sclerosis with a digitized test of rapid number naming. *J. Neurol.* 264, 989-998. <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8484-1>
- Hays, R.D., Sherbourne, C.D., Mazel, R.M., 1993. The rand 36-item health survey 1.0. *Health Econ.* 2, 217-227. <https://doi.org/10.1002/hec.4730020305>
- Herndon, R.M., 2002. Resources for Clinical Measurement in Multiple Sclerosis. *Int. J. MS Care* 4, 162-169. <https://doi.org/10.7224/1537-2073-4.4.162>
- Herrero-Garibi, J., Cruz-González, I., Parejo-Díaz, P., Jang, I.-K., 2010. Tomografía de coherencia

- óptica: situación actual en el diagnóstico intravascular. *Rev. Española Cardiol.* 63, 951-962. [https://doi.org/10.1016/S0300-8932\(10\)70207-4](https://doi.org/10.1016/S0300-8932(10)70207-4)
- 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., Fujimoto, J.G., 1991. Optical Coherence Tomography. *Science* (80-. ). 254, 1178-1181. <https://doi.org/10.1126/science.1957169>
- Huang, N.E., Shen, Z., Long, S.R., Wu, M.C., Shih, H.H., Zheng, Q., Yen, N.-C., Tung, C.C., Liu, H.H., 1998. The empirical mode decomposition and the Hilbert spectrum for nonlinear and non-stationary time series analysis. *Proc. R. Soc. London. Ser. A Math. Phys. Eng. Sci.* 454, 903-995. <https://doi.org/10.1098/rspa.1998.0193>
- Kraus, M.F., Potsaid, B., Mayer, M.A., Bock, R., Baumann, B., Liu, J.J., Hornegger, J., Fujimoto, J.G., 2012. Motion correction in optical coherence tomography volumes on a per A-scan basis using orthogonal scan patterns. *Biomed. Opt. Express* 3, 1182. <https://doi.org/10.1364/BOE.3.001182>
- Kritzinger, E.E., 1987. *A Colour Atlas of Optic Disc Abnormalities*. Mosby.
- Kurtzke, J.F., 2009. A REASSESSMENT OF THE DISTRIBUTION OF MULTIPLE SCLEROSIS. *Acta Neurol. Scand.* 51, 137-157. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1975.tb01365.x>
- Kurtzke, J.F., 1995. MS epidemiology world wide. One view of current status. *Acta Neurol. Scand.* 91, 23-33. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1995.tb05853.x>
- Kurtzke, J.F., 1983. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: An expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33, 1444-1444. <https://doi.org/10.1212/WNL.33.11.1444>
- Landete Pascual, L., Casanova Estruch, B., Burguera Hernández, J.A., 1998. Esclerosis múltiple familiar: estudio de seis familias. *Rev. Neurol.* 27, 43. <https://doi.org/10.33588/rn.27155.98055>
- Lassmann, H., van Horssen, J., 2011. The molecular basis of neurodegeneration in multiple sclerosis. *FEBS Lett.* 585, 3715-3723. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.08.004>
- Lassmann, H., van Horssen, J., Mahad, D., 2012. Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nat. Rev. Neurol.* 8, 647-656. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.168>
- Leray, E., Moreau, T., Fromont, A., Edan, G., 2016. Epidemiology of multiple sclerosis. *Rev. Neurol. (Paris)*. 172, 3-13. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2015.10.006>
- Lorscheider, J., Buzzard, K., Jokubaitis, V., Spelman, T., Havrdova, E., Horakova, D., Trojano, M., Izquierdo, G., Girard, M., Duquette, P., Prat, A., Lugaresi, A., Grand'Maison, F., Grammond, P., Hupperts, R., Alroughani, R., Sola, P., Boz, C., Pucci, E., Lechner-Scott, J., Bergamaschi, R., Oreja-Guevara, C., Iuliano, G., Van Pesch, V., Granella, F., Ramo-Tello, C., Spitaleri, D., Petersen, T., Slee, M., Verheul, F., Ampapa, R., Amato, M.P., McCombe, P., Vucic, S., Sánchez

- Menoyo, J.L., Cristiano, E., Barnett, M.H., Hodgkinson, S., Olascoaga, J., Saladino, M.L., Gray, O., Shaw, C., Moore, F., Butzkueven, H., Kalincik, T., 2016. Defining secondary progressive multiple sclerosis. *Brain* 139, 2395-2405. <https://doi.org/10.1093/brain/aww173>
- Lublin, F.D., Reingold, S.C., Cohen, J.A., Cutter, G.R., Sorensen, P.S., Thompson, A.J., Wolinsky, J.S., Balcer, L.J., Banwell, B., Barkhof, F., Bebo, B., Calabresi, P.A., Clanet, M., Comi, G., Fox, R.J., Freedman, M.S., Goodman, A.D., Inglese, M., Kappos, L., Kieseier, B.C., Lincoln, J.A., Lubetzki, C., Miller, A.E., Montalban, X., O'Connor, P.W., Petkau, J., Pozzilli, C., Rudick, R.A., Sormani, M.P., Stuve, O., Waubant, E., Polman, C.H., 2014. Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. *Neurology* 83, 278-286. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000560>
- Makita, S., Kurokawa, K., Hong, Y.-J., Miura, M., Yasuno, Y., 2016. Noise-immune complex correlation for optical coherence angiography based on standard and Jones matrix optical coherence tomography. *Biomed. Opt. Express* 7, 1525. <https://doi.org/10.1364/BOE.7.001525>
- Masjuan, J., Alvarez-Cermeno, J.C., Garcia-Barragan, N., Diaz-Sanchez, M., Espino, M., Sadaba, M.C., Gonzalez-Porque, P., San Millan, J.M., Villar, L.M., 2006. Clinically isolated syndromes: A new oligoclonal band test accurately predicts conversion to MS. *Neurology* 66, 576-578. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000198253.35119.83>
- McDonald, W.I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H.-P., Lublin, F.D., McFarland, H.F., Paty, D.W., Polman, C.H., Reingold, S.C., Sandberg-Wollheim, M., Sibley, W., Thompson, A., Van Den Noort, S., Weinshenker, B.Y., Wolinsky, J.S., 2001. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 50, 121-127. <https://doi.org/10.1002/ana.1032>
- McDonald, W.I., MILLER, D.H., Barnes, D., 1992. The pathological evolution of multiple sclerosis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 18, 319-334. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.1992.tb00794.x>
- Miller, D., Barkhof, F., Montalban, X., Thompson, A., Filippi, M., 2005. Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis. *Lancet Neurol.* 4, 281-288. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(05\)70071-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(05)70071-5)
- Miller, D.H., Leary, S.M., 2007. Primary-progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 6, 903-912. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(07\)70243-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70243-0)
- Moreira, M.A., Tilbery, C.P., Lana-Peixoto, M.A., Mendes, M.F., Kaimen-Maciél, D.R., Callegaro, D., 2002. [Historical aspects of multiple sclerosis]. *Rev. Neurol.* 34, 379-83.

- Munger, K.L., Levin, L.I., Hollis, B.W., Howard, N.S., Ascherio, A., 2006. Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels and Risk of Multiple Sclerosis. *JAMA* 296, 2832. <https://doi.org/10.1001/jama.296.23.2832>
- Nilsson, P., Larsson, E.-M., Maly-Sundgren, P., Perfekt, R., Sandberg-Wollheim, M., 2005. Predicting the Outcome of Optic Neuritis. *J. Neurol.* 252, 396-402. <https://doi.org/10.1007/s00415-005-0655-9>
- Odom JV, Leys M, W.G., 2007. Clinical Visual Electrophysiology. In: Tasman W, Jaeger E, editors. Duane's Ophthalmology. CD-ROM User Guide. Philadelphia.
- Ogden, T.E., 1983. Nerve fiber layer of the primate retina: Thickness and glial content. *Vision Res.* 23, 581-587. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(83\)90063-9](https://doi.org/10.1016/0042-6989(83)90063-9)
- Olver, J.M., 1990. Functional anatomy of the choroidal circulation: Methyl methacrylate casting of human choroid. *Eye* 4, 262-272. <https://doi.org/10.1038/eye.1990.38>
- Ortiz del Castillo, M., 2019. ANÁLISIS AVANZADO DE REGISTROS DE ELECTORRETINOGRFÍA MULTIFOCAL APLICADO AL DIAGNÓSTICO DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE. Universidad de Alcalá.
- Orton, S.-M., Herrera, B.M., Yee, I.M., Valdar, W., Ramagopalan, S. V, Sadovnick, A.D., Ebers, G.C., 2006. Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *Lancet Neurol.* 5, 932-936. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70581-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70581-6)
- Paty, D.W., Li, D.K.B., 1993. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis: II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* 43, 662-662. <https://doi.org/10.1212/WNL.43.4.662>
- Pérez García, E., Hernández Echevarría, O., Rodríguez Martín, Y., Gómez González, J., 2016. Obtención, interpretación y usos del electrorretinograma multifocal / Obtaining, interpreting and using the multifocal electroretinogram. *Rev. Cuba. oftalmol* 29, 0.
- Polman, C.H., Reingold, S.C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J.A., Filippi, M., Fujihara, K., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Lublin, F.D., Montalban, X., O'Connor, P., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A.J., Waubant, E., Weinshenker, B., Wolinsky, J.S., 2011. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann. Neurol.* 69, 292-302. <https://doi.org/10.1002/ana.22366>
- Raffel, O.C., Akasaka, T., Jang, I.-K., 2008. Cardiac optical coherence tomography. *Heart* 94, 1200-1210. <https://doi.org/10.1136/hrt.2007.130765>
- Raphael, I., Webb, J., Stuve, O., Haskins, W., Forsthuber, T., 2015. Body fluid biomarkers in multiple sclerosis: how far we have come and how they could affect the clinic now and in the future. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 11, 69-91. <https://doi.org/10.1586/1744666X.2015.991315>

- Reich, D.S., Smith, S.A., Gordon-Lipkin, E.M., Ozturk, A., Caffo, B.S., Balcer, L.J., Calabresi, P.A., 2009. Damage to the optic radiation in multiple sclerosis is associated with retinal injury and visual disability. *Arch. Neurol.* 66, 998-1006. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2009.107>
- Reis, A., Mateus, C., Macário, M.C., Abreu, J.R.F., Castelo-Branco, M., 2011. Independent patterns of damage to retinocortical pathways in multiple sclerosis without a previous episode of optic neuritis. *J. Neurol.* 258, 1695-1704. <https://doi.org/10.1007/s00415-011-6008-y>
- Riordan-Eva P, Cunningham ET, Pérez AD, Espinosa RLL, R.V., 2012. Vaughan y Asbury: oftalmología general. McGraw-Hill.
- Rolak, L.A., 2003. MS: The Basic Facts. *Clin. Med. Res.* 1, 61-62. <https://doi.org/10.3121/cmr.1.1.61>
- Roland Consult Stasche & Finger GmbH, s. f. <https://www.roland-consult.de/> [WWW Document]. Ger. Eng.
- Saidha, S., Sotirchos, E.S., Oh, J., Syc, S.B., Seigo, M.A., Shiee, N., Eckstein, C., Durbin, M.K., Oakley, J.D., Meyer, S.A., Frohman, T.C., Newsome, S., Ratchford, J.N., Balcer, L.J., Pham, D.L., Crainiceanu, C.M., Frohman, E.M., Reich, D.S., Calabresi, P.A., 2013. Relationships Between Retinal Axonal and Neuronal Measures and Global Central Nervous System Pathology in Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol.* 70, 34. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.573>
- Sergott, R.C., 2005. Optical coherence tomography: measuring in-vivo axonal survival and neuroprotection in multiple sclerosis and optic neuritis. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 16, 346-350. <https://doi.org/10.1097/01.icu.0000188705.67815.0e>
- Sutter, E.E., Tran, D., 1992. The field topography of ERG components in man—I. The photopic luminance response. *Vision Res.* 32, 433-446. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(92\)90235-B](https://doi.org/10.1016/0042-6989(92)90235-B)
- Swanton, J., Fernando, K., Dalton, C., Miszkil, K., Altmann, D., Plant, G., Thompson, A., Miller, D., 2010. Early MRI in optic neuritis: the risk for clinically definite multiple sclerosis. *Mult. Scler. J.* 16, 156-165. <https://doi.org/10.1177/1352458509353650>
- Tarlinton, R.E., Martynova, E., Rizvanov, A.A., Khaiboullina, S., Verma, S., 2020. Role of Viruses in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Viruses* 12, 643. <https://doi.org/10.3390/v12060643>
- Tartaglia, M.C., Narayanan, S., Francis, S.J., Santos, A.C., De Stefano, N., Lapierre, Y., Arnold, D.L., 2004. The Relationship Between Diffuse Axonal Damage and Fatigue in Multiple Sclerosis. *Arch. Neurol.* 61, 201. <https://doi.org/10.1001/archneur.61.2.201>
- Thompson, A.J., Banwell, B.L., Barkhof, F., Carroll, W.M., Coetzee, T., Comi, G., Correale, J., Fazekas, F., Filippi, M., Freedman, M.S., Fujihara, K., Galetta, S.L., Hartung, H.P., Kappos, L., Lublin, F.D., Marrie, R.A., Miller, A.E., Miller, D.H., Montalban, X., Mowry, E.M., Sorensen,



- P.S., Tintoré, M., Traboulsee, A.L., Trojano, M., Uitdehaag, B.M.J., Vukusic, S., Waubant, E., Weinshenker, B.G., Reingold, S.C., Cohen, J.A., 2018a. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 17, 162-173. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30470-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30470-2)
- Thompson, A.J., Banwell, B.L., Barkhof, F., Carroll, W.M., Coetzee, T., Comi, G., Correale, J., Fazekas, F., Filippi, M., Freedman, M.S., Fujihara, K., Galetta, S.L., Hartung, H.P., Kappos, L., Lublin, F.D., Marrie, R.A., Miller, A.E., Miller, D.H., Montalban, X., Mowry, E.M., Sorensen, P.S., Tintoré, M., Traboulsee, A.L., Trojano, M., Uitdehaag, B.M.J., Vukusic, S., Waubant, E., Weinshenker, B.G., Reingold, S.C., Cohen, J.A., 2018b. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet. Neurol.* 17, 162-173. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30470-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30470-2)
- Toledo, J., Sepulcre, J., Salinas-Alaman, A., García-Layana, A., Murie-Fernandez, M., Bejarano, B., Villoslada, P., 2008. Retinal nerve fiber layer atrophy is associated with physical and cognitive disability in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* <https://doi.org/10.1177/1352458508090221>
- Tremblay, M.-È., Lecours, C., Samson, L., Sánchez-Zafra, V., Sierra, A., 2015. From the Cajal alumni Achúcarro and Río-Hortega to the rediscovery of never-resting microglia. *Front. Neuroanat.* 9. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00045>
- Vickrey, B.G., Hays, R.D., Harooni, R., Myers, L.W., Ellison, G.W., 1995. A health-related quality of life measure for multiple sclerosis. *Qual. Life Res.* 4, 187-206. <https://doi.org/10.1007/BF02260859>
- Viswanathan, S., Frishman, L.J., Robson, J.G., Harwerth, R.S., Smith, E.L., 1999. The photopic negative response of the macaque electroretinogram: reduction by experimental glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 1124-36.
- Viswanathan, S., Frishman, L.J., Robson, J.G., Walters, J.W., 2001. The photopic negative response of the flash electroretinogram in primary open angle glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 514-22.
- Voss, E., Raab, P., Trebst, C., Stangel, M., 2011. Clinical approach to optic neuritis: pitfalls, red flags and differential diagnosis. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* 4, 123-134. <https://doi.org/10.1177/1756285611398702>
- Walton, C., King, R., Rechtman, L., Kaye, W., Leray, E., Marrie, R.A., Robertson, N., La Rocca, N., Uitdehaag, B., van der Mei, I., Wallin, M., Helme, A., Angood Napier, C., Rijke, N., Baneke, P., 2020. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult. Scler. J.* 26, 1816-1821. <https://doi.org/10.1177/1352458520970841>

- Weinshenker, B.G., 1995. Epidemiologic strategies to detect an exogenous cause of MS. *Acta Neurol. Scand.* 91, 93-99. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1995.tb05863.x>
- Weinstock-Guttman, B., Baier, M., Stockton, R., Weinstock, A., Justinger, T., Munschauer, F., Brownschidle, C., Williams, J., Fisher, E., Miller, D., Rudick, R., 2003. Pattern reversal visual evoked potentials as a measure of visual pathway pathology in multiple sclerosis. *Mult. Scler. J.* 9, 529-534. <https://doi.org/10.1191/1352458503ms935rr>
- Zeiler, A., Faltermeier, R., Keck, I.R., Tome, A.M., Puntonet, C.G., Lang, E.W., 2010. Empirical Mode Decomposition - an introduction, en: *The 2010 International Joint Conference on Neural Networks (IJCNN)*. IEEE, pp. 1-8. <https://doi.org/10.1109/IJCNN.2010.5596829>
- Zysk, A.M., Nguyen, F.T., Oldenburg, A.L., Marks, D.L., Boppart, S.A., 2007. Optical coherence tomography: a review of clinical development from bench to bedside. *J. Biomed. Opt.* 12, 051403. <https://doi.org/10.1117/1.2793736>



# APÉNDICES

**APÉNDICE I.** *Factor de impacto de las revistas y áreas temáticas.*

**APÉNDICE II.** *Renuncia de los coautores de los trabajos presentados como parte de una tesis doctoral en la modalidad de compendio de publicaciones.*

**APÉNDICE III.** *Documentación del Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón. (CEICA).*

**APÉNDICE IV.** *Consentimiento informado para sujetos participantes en la base de datos.*

**APÉNDICE V.** *Expanded Disability Status Scale (EDSS) de Kurtzke.*

**APÉNDICE I.** *Factor de impacto de las revistas y áreas temáticas.*

Del Castillo MO, Cordon B, Sánchez Morla EM, Viladés E, Rodrigo MJ, Cavaliere C, Boquete L, García-Martin E. **Identification of clusters in multifocal electrophysiology recordings to maximize discriminant capacity (patients vs. control subjects).** Doc Ophthalmol. 2020;140(1):43-53. doi: 10.1007/s10633-019-09720-8. Epub 2019 Sep 19. PMID: 31538293.

**Revista:** Documenta Ophthalmologica.

**ISSN:** 15732622

**Índice de Impacto JCR (2021):** 0.780 (Q2)

**Área temática de la revista:** Oftalmología

De Santiago L, Ortiz del Castillo M, García-Martin E, Rodrigo MJ, Sánchez Morla EM, Cavaliere C, Cordon B, Miguel JM, López A, Boquete L. **Empirical Mode Decomposition-Based Filter Applied to Multifocal Electroretinograms in Multiple Sclerosis Diagnosis.** Sensors. 2020; 20(1):7. <https://doi.org/10.3390/s20010007>

**Revista:** Sensors 2020

**ISSN:** 1424-8220

**Índice de Impacto JCR (2021):** 0.803 (Q1)

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

Cordon B, Viladés E, Orduna E, Satue M, Perez-Velilla J, Sebastian B, Polo V, Larrosa JM, Pablo LE, García-Martin E. **Angiography with optical coherence tomography as a biomarker in multiple sclerosis.** PLoS One. 2020;15(12): e0243236. doi: 10.1371/journal.pone.0243236. PMID: 33290417; PMCID: PMC7723290.

**Revista:** PLOSone

**ISSN:** 19326203

**Índice de Impacto JCR (2021):** 0.852 (Q1)

**Área temática de la revista:** Multidisciplinar

Viladés E, Cordon B, Perez-Velilla J, Orduna E, Satué M, Polo V, Sebastian B, Larrosa JM, Júlvez LP, Garcia-Martin E. **Evaluation of multiple sclerosis severity using new oct tool.** PLoS One. 2023. (Accepted 03/07/2023. Pending publication)

**Revista:** PLOS one

**ISSN:** 19326203

**Índice de Impacto JCR (2021):** 0.852 (Q1)

**Área temática de la revista:** Multidisciplinar

**APÉNDICE II.** *Renuncia de los coautores de los trabajos presentados como parte de una tesis doctoral en la modalidad de compendio de publicaciones.*



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: PEREZVELILLA	Nombre: JAVIER	
DNI/Pasaporte/NIE: 78973922Y	Teléfono: 636364591	Correo electrónico: jpv.javier@gmail.com

2.- Tesis Doctoral	
Título: Biomarcadores de esclerosis múltiple basados en tomografía de coherencia óptica, angiografía y electrofisiología	
Autor: BEATRIZ CORDÓN CIORDIA	
Programa de doctorado: Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y Biotecnológicas	

3.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que el firmante es coautor
<p>Oordon B, Vilades E, Orduna E, Satue M, Perez-Vellilla J, Sebastian B, Polo V, Larrosa JM, Pablo LE, Garcia-Martin E. Angiography with optical coherence tomography as a biomarker in multiple sclerosis. PLoS One. 2020;15(12):e0243236. doi: 10.1371/journal.pone.0243236. PMID: 33290417</p> <p>Vilades E, Oordon B, Perez-Vellilla J, Orduna E, Satue M, Polo V, Sebastian B, Larrosa JM, Julvez LP, Garcia-Martin E. Evaluation of severity and time disease of multiple sclerosis using new oct tool. PENDIENTE PUBLICACIÓN</p>

RENUNCIA:
<p>Renuncio a que las publicaciones anteriores puedan ser presentadas como parte de otra tesis doctoral en la modalidad de compendio de publicaciones.</p> <p>&lt;lugar&gt;, &lt;fecha&gt; Zaragoza, 20/06/2021</p> <p>Firma: </p>

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 III. 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 Hínjos, Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

**CERTIFICA**

1º. Que el CEIC Aragón (CEICA) en su reunión del día 15/02/2012, Acta N° 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 Emilio Pablo Júlvez

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

Fdo:

Dña. María González Hínjos  
Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)



COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN  
CLÍNICA DE ARAGÓN (CEICA)  
Avda. Gómez Laguna, 25 planta 11  
50009 Zaragoza

#### 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 Albar Remón; Médico. Servicio de Medicina Preventiva y Salud Pública. Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa. Profesional Sanitario experto en epidemiología clínica.
- **Secretaría:** 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 Idolpe 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 Pujo 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



*[Firma]*  
María González Hinjos





**APÉNDICE IV.** Consentimiento informado para sujetos participantes en la base de datos.

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 sí), 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.** *Expanded Disability Status Scale (EDSS) de Kurtzke.*

## **Expanded Disability Status Scale (EDSS) de Kurtzke**

---

Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology (Cleveland)* 1983; 33: 1444-1452.

Escala EDSS de Kurtzke: criterios de puntuación

Escala Funcional (FS)

### Piramidal

- 1. normal.
- 2. signos anormales sin incapacidad.
- 3. incapacidad mínima.
- 4. paraparesia o hemiparesia leve o moderada. Monoparesia grave.
- 5. paraparesia o hemiparesia grave. Monoplejía o cuadriparesia moderada.
- 6. paraplejía o hemiplejía. Cuadriparesia intensa.
- 7. cuadriplejía.

### Cerebelo

- 1. Normal.
- 2. Signos anormales sin incapacidad.
- 3. Ligera ataxia.
- 4. Moderada ataxia de los miembros o del tronco.
- 5. Ataxia intensa de todas las extremidades.
- 6. Incapaz de realizar movimientos coordinados por ataxia.

+ . añadir tras cada puntuación en caso de debilidad grado 3 que dificulte la prueba.

### Tronco del encéfalo

- 1. Normal.
- 2. Sólomente signos.
- 3. Nistagmus moderado o cualquier otro tipo de incapacidad.
- 4. Nistagmus intenso, parálisis extraocular intensa o moderada incapacidad por otros pares.
- 5. Disartria intensa o cualquier otro tipo de incapacidad.
- 6. Incapacidad para tragar o hablar.

### Sensibilidad

- 1. Normal.
- 2. Alteración de la vibratoria o grafestesia en una o dos extremidades.

- 3. Disminución ligera de la sensibilidad táctil o dolorosa, o de la posicional y/o disminución ligera de la vibratoria en uno o dos miembros o vibratoria (o grafestesia) en 3 o 4 miembros.
- 4. Id. moderada, incluida alteración propioceptiva en 3 ó 4 miembros.
- 5. Id. intensa, o bien grave alteración propioceptiva en más de 2 miembros.
- 6. Pérdida de la sensibilidad en una o dos extremidades o bien disminución del tacto o dolor y/o pérdida del sentido posicional en más de dos miembros.
- 7. Pérdida de sensibilidad prácticamente total por debajo de la cabeza.

Vejiga e intestino (Redefinición de Goodkin et al. Neurology 1992; 42: 859-863).

Instrucciones: Añada un punto más en la puntuación de 1-4 vesical si se usa autocateterismo vesical. Puntúe la situación peor del modo siguiente:

- Vejiga
  - 1. función normal.
  - 2. ligero titubeo, urgencia o retención.
  - 3. moderado titubeo, urgencia o retención tanto del intestino como de la vejiga, o incontinencia urinaria poco frecuente.
  - 4. incontinencia < semanal.
  - 5. incontinencia > semanal.
  - 6. incontinencia diaria.
  - 7. catéter vesical.
- Intestino
  - 1. función normal.
  - 2. estreñimiento de < diario, sin incontinencia.
  - 3. estreñimiento de menos de a diario pero no incontinencia.
  - 4. incontinencia < semanal.
  - 5. incontinencia > semanal pero no a diario.
  - 6. ningún control intestinal.
  - 7. grado 5 intestinal más grado 5 de disfunción vesical.

Visión

- 1. normal.
- 2. escotoma con agudeza visual (corregida) superior a 20/30.
- 3. el ojo que está peor con un escotoma tiene de agudeza entre 30/30 y 20/59.
- 4. El ojo peor (por escotoma o alteración de campo) con agudeza máxima entre 20/60 y 20/99.
- 5. id. entre 20/100 y 20/200; igual un grado 3 más máxima agudeza en el mejor ojo de 20/60 o inferior.
- 6. id. en el ojo peor con agudeza inferior a 20/200; o bien grado 4 más máxima agudeza en el ojo mejor de 20/60 o menos.
- 7. +. añadir tras la puntuación en los grados 0-5 si existe palidez temporal.

es de un solo grado 5, otros de 0 a 1, o bien una combinación de grados inferiores por encima del nivel 4.

- 6.0= requiere ayuda constante, bien unilateral o de forma intermitente (bastón, muleta o abrazadera) para caminar en torno a 100 metros, sin o con descanso. Los equivalentes FS representan combinaciones con más de dos FS de grado 3.
- 6.5= ayuda bilateral constante (bastones, muletas o abrazaderas) para caminar unos 20 metros sin descanso. El FS habitual equivale a combinaciones con más de dos FS de grado 3+.
- 7.0= incapaz de caminar más de unos pasos, incluso con ayuda, básicamente confinado a silla de ruedas y posibilidad de trasladarse de ésta a otro lugar, o puede manejarse para ir al lavabo durante 12 horas al día. El equivalente FS habitual son combinaciones de dos o más de un FS de grado 4+. Muy raramente síndrome piramidal grado 5 sólomente.
- 7.5= incapaz de caminar más de unos pasos. Limitado a silla de ruedas. Puede necesitar ayuda para salir de ella. No puede impulsarse en una silla normal pudiendo requerir un vehículo motorizado. El equivalente FS habitual son combinaciones con más de un FS de grado 4+.
- 8.0= básicamente limitado a la cama o a una silla, aunque puede dar alguna vuelta en la silla de ruedas, puede mantenerse fuera de la cama gran parte del día y es capaz de realizar gran parte de las actividades de la vida diaria. Generalmente usa con eficacia los brazos. El equivalente FS habitual es una combinación de varios sistemas en grado 4.
- 8.5= básicamente confinado en cama la mayor parte del día, tiene un cierto uso útil de uno o ambos brazos, capaz de realizar algunas actividades propias. El FS habitual equivale a combinaciones diversas generalmente de una grado 4+.
- 9.0= paciente inválido en cama, puede comunicarse y comer. El equivalente FS habitual son combinaciones de un grado 4+ para la mayor parte de los apartados.
- 9.5= totalmente inválido en cama, incapaz de comunicarse o bien comer o tragar. El equivalente FS habitualmente son combinaciones de casi todas las funciones en grado 4+.
- 10= muerte por esclerosis múltiple.

### Funciones mentales

- 1. normal.
- 2. alteración del estado de ánimo únicamente (no afecta a la puntuación EDSS).
- 3. ligera alteración cognitiva.
- 4. moderada alteración cognitiva.
- 5. marcada alteración cognitiva.
- 6. demencia o síndrome cerebral crónico.

### **Expanded Disability Status Scale (EDSS)**

- 0= examen neurológico normal (todos los ítems de FS son de cero).
- 1.0= ninguna incapacidad pero signos mínimos solamente en un apartado de la FS.
- 1.5= ninguna incapacidad pero signos mínimos en más de un apartado de la FS.
- 2.0= incapacidad mínima en un apartado de la FS (al menos uno con puntuación de 2).
- 2.5= incapacidad mínima (dos apartados de la FS puntuando 2).
- 3.0= incapacidad moderada en un FS (un FS puntúa 3 pero los otros entre 0 y 1). El paciente deambula sin dificultad.
- 3.5= deambula sin limitaciones pero tiene moderada incapacidad en una FS (una tiene un grado 3) o bien tiene una o dos FS que puntúan un grado 2 o bien dos FS puntúan un grado 3 o bien 5 FS tienen un grado 2 aunque el resto estén entre 0 y 1.
- 4.0= deambula sin limitaciones, es autosuficiente, y se mueve de un lado para otro alrededor de 12 horas por día pese a una incapacidad relativamente importante de acuerdo con un grado 4 en una FS (las restantes entre 0 y 1). Capaz de caminar sin ayuda o descanso unos 500 metros.
- 4.5= deambula plenamente sin ayuda, va de un lado para otro gran parte del día, capaz de trabajar un día completo, pero tiene ciertas limitaciones para una actividad plena, o bien requiere un mínimo de ayuda. El paciente tiene una incapacidad relativamente importante, por lo general con un apartado de FS de grado 4 (los restantes entre 0 y 1) o bien una combinación alta de los demás apartados. Es capaz de caminar sin ayuda ni descanso alrededor de 300 metros.
- 5.0= camina sin ayuda o descanso en torno a unos 200 metros; su incapacidad es suficiente para afectarle en funciones de la vida diaria, v.g. trabajar todo el día sin medidas especiales. Los equivalentes FS habituales son uno de grado 5 solamente, los otros entre 0 y 1 o bien combinaciones de grados inferiores por lo general superiores a un grado 4.
- 5.5= camina sin ayuda o descanso por espacio de unos 100 metros; la incapacidad es lo suficientemente grave como para impedirle plenamente las actividades de la vida diaria. El equivalente FS habitual









**Universidad Zaragoza**