

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

**Departamento de Medicina**

**Facultad de Medicina**

**Estudio clínico y de resonancia magnética  
orientado al conocimiento del  
sustrato patológico de la discapacidad  
en la esclerosis múltiple primariamente progresiva**

**Carmen Tur Gómez  
Tesis doctoral**



Programa de doctorado en Medicina

(RD 778/1998)

Memoria de la tesis presentada por

**Carmen Tur Gómez**

Para optar al grado de Doctor en Medicina

Director de tesis

**Xavier Montalban Gairín**

Director del Centro de Esclerosis Múltiple de Cataluña (CEM-Cat)

Unidad de Neuroinmunología Clínica

Servicio de Neurología

Hospital Universitari Vall d'Hebron

Tutor de tesis

**Vicenç Fonollosa Pla**

Catedrático de Medicina

Departamento de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

Barcelona, 18 de junio de 2012



## ÍNDICE

i. AGRADECIMIENTOS.....	7
ii. ABREVIATURAS.....	9
I. RESUMEN.....	13
<i>ABSTRACT</i> .....	15
II. INTRODUCCIÓN A LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE PRIMARIAMENTE PROGRESIVA (EMPP).....	17
1. Nosología de la enfermedad.....	19
2. Epidemiología.....	20
3. Presentación clínica.....	21
4. Diagnóstico diferencial.....	24
5. Historia natural y pronóstico.....	28
6. Genética de la EMPP.....	30
7. Inmunopatología.....	32
8. RM cerebral.....	43
9. RM medular.....	49
10. Otros datos paraclínicos.....	51
11. Criterios diagnósticos.....	52
12. Tratamientos y ensayos clínicos.....	56
13. Resumen.....	63
III. HIPÓTESIS.....	65
IV. OBJETIVOS.....	67
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	69
1. Participantes.....	69
1.1. Participantes del primer estudio.....	69
1.2. Participantes del segundo estudio.....	70
1.3. Participantes del tercer estudio.....	71
2. Evaluaciones clínicas.....	72
2.1. Evaluaciones clínicas del primer estudio.....	72
2.2. Evaluaciones clínicas del segundo estudio.....	72
2.3. Evaluaciones clínicas del tercer estudio.....	72
3. Evaluaciones neuropsicológicas.....	74
3.1. Evaluaciones neuropsicológicas del primer estudio..	74
3.2. Evaluaciones neuropsicológicas del tercer estudio...	76
4. Evaluaciones de RM.....	77
4.1. Generalidades.....	77
4.2. Imagen por transferencia de magnetización.....	80
4.3. Obtención del volumen de lesiones en T2 y de volúmenes de sustancia blanca de apariencia normal y de sustancia gris.....	84
4.4. Adquisición y post-procesado en el primer y el segundo estudios.....	87
4.5. Adquisición y post-procesado en tercer estudio....	88

5. Análisis estadístico.....	90
5.1. Análisis estadístico del primer estudio.....	90
5.2. Análisis estadístico del segundo estudio.....	94
5.3. Análisis estadístico del tercer estudio.....	98
VI. RESULTADOS.....	101
1. Primer estudio. Estudio transversal de una cohorte de EMPP establecida: afectación cognitiva y parámetros de RM cuantitativa.....	101
1.1. Resultados.....	101
1.2. Relevancia de los resultados del primer estudio.....	111
1.3. Limitaciones del primer estudio.....	112
<i>Grey matter damage and overall cognitive impairment in primary progressive multiple sclerosis.....</i>	113
2. Segundo estudio. Estudio longitudinal a cinco años de una cohorte de EMPP de poco tiempo de evolución (EMPP temprana).....	123
2.1. Resultados.....	123
2.2. Relevancia de los resultados del segundo estudio...	134
2.3. Limitaciones del segundo estudio.....	134
<i>Complementary roles of grey matter MTR and T2 lesions in predicting progression in early PPMS.....</i>	135
3. Tercer estudio. Estudio de seguimiento de una cohorte de EMPP cinco años después de su participación en un ensayo clínico con interferón beta -1b.....	141
3.1. Resultados.....	141
3.2. Relevancia de los resultados del tercer estudio.....	151
3.3. Limitaciones del tercer estudio .....	151
<i>Interferon beta -1b for the treatment of primary progressive multiple sclerosis.....</i>	153
VII. DISCUSIÓN DE LOS PRINCIPALES HALLAZGOS.....	161
1. La afectación de la sustancia gris.....	164
2. La afectación de la sustancia blanca.....	171
2.1. Las lesiones visibles.....	173
2.2. La afectación de la sustancia blanca de apariencia normal.....	175
3. La intervención inmune en la EMPP.....	176
4. Abordaje global.....	180
CONCLUSIONES.....	187
CONCLUSIONS.....	189
BIBLIOGRAFÍA.....	191

## I. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer al Profesor Xavier Montalban la confianza depositada en mí desde que me incorporé, en 2006, a la Unidad de Neuroinmunología Clínica del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona. Igualmente estoy agradecida a Jaume Sastre-Garriga, que ha supuesto para mí un apoyo importante. Asimismo, agradezco al Profesor Vicenç Fonollosa que haya aceptado ser el tutor de esta tesis, muestra de su confianza hacia nuestro equipo y hacia mí.

El Profesor Montalban me brindó la oportunidad de ir a Londres, al *Institute of Neurology (University College of London)*, donde pude desarrollar, a lo largo de dos años y medio, una serie de proyectos científicos sobre la esclerosis múltiple primariamente progresiva que son una parte muy significativa de la memoria que aquí se presenta. Quiero expresar mi reconocimiento a los Profesores Alan J. Thompson y Olga Ciccarelli, que me acogieron en su departamento, así como a los Profesores María Ron y Dan Altmann.

Mi agradecimiento a Mar Tintoré y Carmen Espejo, de la Unidad de Neuroinmunología Clínica del Hospital Vall d'Hebron que, con su maestría y dedicación, me han revisado inteligentemente este manuscrito.

Mi agradecimiento también a mis compañeros Joaquín Castelló, Ingrid Galán, Carlos Nos, Jordi Río, Manuel Comabella, Ángela Vidal, Georgina Arrambide, M<sup>a</sup> Jesús Arévalo, Elisenda Anglada, Marta Sallén, Sílvia Soler, Rosalía Horno, M<sup>a</sup> José Vicente e Isabel Martín. También quiero dar las gracias a Elisabeth Morilla, Mila Fraga, Josep Graells, Ilaria Laganà, Dunia Muñoz, Olga Montón, Eva Simon, Sergio Vergara, Joana Fitó y Marga Navarro. Quiero mencionar con cariño a Susana Otero, Nicolás Fissolo, Marta Fernández, Carme Costa, Herena Eixarch, Ester Cantó, Sunny Malhotra, Jenifer Pérez, Montse Moreno, Zoraida Castro, Mireia Castillo, Ana Gutiérrez y M<sup>a</sup> José Mansilla.

También deseo manifestar mi reconocimiento al equipo de Resonancia

Magnética: Àlex Rovira, Cristina Auger, Raquel Mitjana, Deborah Pareto, Juli Alonso, Xavier Aymerich, Juanfra Corral y Elena Huerga.

No quiero finalizar sin agradecer a Nieves Téllez, Segundo Buján, Carlos Pagola, Isabel Morales, María Centeno, María Aguirregomozcorta, Leticia Gutiérrez y Tony Momoh su apoyo y amistad incondicionales.

Por último, quiero mencionar al Profesor Miguel López Tortosa, de la cátedra de Física Médica de la Facultad de Medicina de la Universitat Rovira i Virgili, y al Profesor Cecilio Tiele Ferrer, catedrático de Piano en el Conservatorio Superior de Música del Liceo de Barcelona, de los que me siento deudora.

## ii. ABREVIATURAS

AG	Acetato de glatirámero
BDI	<i>Beck Depression Inventory</i>
BHE	Barrera hematoencefálica
BOC	Bandas oligoclonales
CADASIL	<i>Cerebral Autosomic Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy</i>
CCP	Coeficiente de correlación parcial
CI	Cociente intelectual
CI	Coeficiente de interacción
CR	Coeficiente de regresión
CT	<i>Clinical Trial</i>
DIR	Doble inversión recuperación o <i>Double Inversion Recovery</i>
DTI	<i>Diffusion-Tensor Imaging</i>
EAE	Encefalomiелitis autoinmune experimental
EC	Ensayo clínico
EDSS	<i>Expanded Disability Status Scale</i>
EM	Esclerosis múltiple
EMG	Electromiograma
EMPP	Esclerosis múltiple primariamente progresiva
EMRR	Esclerosis múltiple remitente recurrente
EMSP	Esclerosis múltiple secundariaente progresiva
EMTP	Esclerosis múltiple transicional progresiva
FA	<i>Fractional Anisotropy</i>
FPC	Fracción de parénquima cerebral
FSS	<i>Fatigue Severity Scale</i>
FTY720	Fingolimod
GM	<i>Grey Matter</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HTLV-1	Virus linfotrófico T-1
IA	Índice de ambulación
IC	Intervalo de confianza

IFNb	Interferón beta
IgG	Inmunoglobulina G
IGIV	Inmunoglobulinas intravenosas
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleuquina
IM	Intramuscular
IV	Intravenoso
LDAD	Leucodistrofia autosómica dominante
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MAGNIMS	<i>Magnetic Resonance in MS</i>
MD	<i>Mean Diffusivity</i>
MRI	<i>Magnetic Resonance Imaging</i>
MS	<i>Multiple Sclerosis</i>
MSFC	<i>Multiple Sclerosis Functional Composite</i>
MTI	<i>Magnetization Transfer Imaging</i>
MTR	<i>Magnetization Transfer Ratio</i>
NAA	N-acetil aspartato
NART	<i>National Adult Reading Test</i>
NAWM	<i>Normal Appearing White Matter</i>
NHPT	<i>Nine Hole Peg Test</i>
OCT	<i>Optical Coherence Tomography</i>
PASAT	<i>Paced Auditory Serial Addition Test</i>
PEV	Potenciales evocados visuales
PU	Unidad porcentual
PV	Volumen porcentual
RF	Rafiofrecuencia
RM	Resonancia magnética
RNFL	<i>Retinal Nerve Fibre Layer</i>
SB	Sustancia blanca
SBAN	Sustancia blanca de apariencia normal
SC	Subcutáneo
SDMT	<i>Symbol Digit Modalities Test</i>
SG	Sustancia gris

SIP	<i>Sickness Impact Profile</i>
SNC	Sistema nervioso central
Spatial-RT	10136 <i>Spatial Recall Test</i>
SRT	<i>Selective Reminding Test</i>
TE	Tiempo de eco
TR	Tiempo de repetición
TWT	<i>Timed 25-foot Walk Test</i>
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VLT1	Volumen de lesiones en T1
VLT2	Volumen de lesiones en T2
WLG	<i>Word List Generation</i>
WM	<i>White Matter</i>



## I. RESUMEN

Con el objetivo de contribuir al estudio de los mecanismos que subyacen al aumento de la discapacidad en la esclerosis múltiple primariamente progresiva (EMPP), fijamos tres objetivos principales. Asimismo, nos propusimos hacer una revisión de la literatura sobre EMPP publicada hasta el momento actual, utilizando la web [www.pubmed.com](http://www.pubmed.com) como herramienta de trabajo, que sirviera como introducción a los estudios de la tesis.

El primer objetivo consistió en investigar el grado de correlación entre el daño en los diferentes tejidos cerebrales y diversos aspectos de la discapacidad, especialmente de la discapacidad cognitiva, en una cohorte de 27 pacientes con EMPP y 31 controles sanos, utilizando secuencias convencionales de resonancia magnética (RM) y parámetros relativos al ratio de transferencia de magnetización (MTR, del inglés *Magnetization Transfer Ratio*). Nuestros resultados mostraron que los parámetros que reflejaban daño en la sustancia gris (SG), parámetros de MTR de la SG, fueron los que mejor se correlacionaron con un peor índice global de rendimiento cognitivo, un mayor deterioro estimado del coeficiente intelectual verbal desde el inicio de la enfermedad y una mayor disfunción ejecutiva. No obstante, parámetros que reflejaban daño en la sustancia blanca (SB) también mostraron tener relevancia clínica. Por ello, sugerimos que los modelos de predicción del deterioro cognitivo en esta forma de la enfermedad deben incluir evaluaciones amplias de RM, en los que se explore tanto la SG como la SB.

Nuestro segundo objetivo fue investigar qué parámetros de RM cerebral, medidos en fases muy tempranas de la enfermedad, eran capaces de predecir una peor evolución clínica, medida por el EDSS (*Expanded Disability Status Scale*) y por los subtest del MSFC (*Multiple Sclerosis Functional Composite*). Para este propósito estudiamos de forma prospectiva durante cinco años a 47 pacientes con EMPP temprana (menos de cinco años desde el inicio de los síntomas) y a 18 controles sanos. Así, vimos que parámetros lesionales y de MTR de la SG medidos a nivel basal fueron capaces de predecir de forma independiente el aumento de la discapacidad medida por el TWT (*25-foot*

*Timed Walk Test*) a los cinco años, poniendo de manifiesto el papel complementario de estas medidas de RM en la predicción del aumento de la discapacidad. Además, un empeoramiento más pronunciado en la carga lesional y en los parámetros de MTR de la SG a lo largo de los cinco años del estudio se asoció a una mayor progresión clínica durante el mismo periodo.

Finalmente, aprovechando que en nuestra unidad se llevó a cabo, entre 1998 y 2000, un ensayo clínico (EC) con interferón beta-1b (IFNb-1b) para formas primarias progresivas que mostró un discreto beneficio clínico (en cuanto al MSFC), nos propusimos, como tercer objetivo, investigar el impacto clínico-radiológico de la intervención con IFNb-1b en los pacientes con EMPP que participaron en el EC, cinco años después de haber finalizado el mismo. Se obtuvo información sobre el EDSS, el MSFC y parámetros neuropsicológicos en 63, 59 y 59 pacientes, respectivamente, de los 73 que participaron en el EC. En 50 de ellos se realizó una RM craneal. Después de cinco años sin tratamiento, los pacientes que habían recibido IFNb-1b durante el EC mostraron mejores puntuaciones en el NHPT (*Nine-Hole Peg Test*) y en un test relacionado con las funciones ejecutivas; además, presentaron una mayor indemnidad de los parámetros que reflejaban daño en el tejido de apariencia normal (MTR de la SB de apariencia normal y atrofia cerebral) que los pacientes del grupo placebo. Finalmente, considerando el grupo globalmente, un mayor aumento de lesiones durante el EC se correlacionó con un mayor empeoramiento en el EDSS durante los cinco años siguientes.

Esta tesis pone de manifiesto que las dos grandes formas de afectación inmunopatológica en la EMPP, la afectación de la SB y la de la SG, son determinantes para la progresión de la discapacidad. Por ello, ambas deberían ser tenidas en cuenta a la hora de crear modelos de predicción de la discapacidad y de diseñar tratamientos que frenen la aparición de daño neurológico irreversible.

## ***ABSTRACT***

In order to contribute to the study of mechanisms that underlie clinical progression in primary progressive multiple sclerosis (PPMS), three objectives were established. Besides, as an introduction to the main studies of the thesis, we also decided to review the literature about PPMS.

Our first objective was to investigate the association between brain tissue damage and different aspects of disability, especially cognitive disability, in a cohort of 27 PPMS patients and 18 healthy controls, using conventional Magnetic Resonance Imaging (MRI) and Magnetization Transfer Ratio (MTR) parameters. We found that MRI parameters related to grey matter (GM) damage (GM MTR) were the main correlates of overall cognitive impairment, the estimated verbal intelligence quotient decline and executive dysfunction. Nonetheless, since MRI parameters related to white matter (WM) damage were also strongly associated with other aspects of cognitive impairment, we concluded that studies designed to evaluate cognitive dysfunction should include comprehensive MRI assessments.

Our second objective was to evaluate the role of brain MRI parameters, when measured very early in the disease, in predicting progression of disability in PPMS, as measured by the EDSS (Expanded Disability Status Scale) and the subtests of the MSFC (Multiple Sclerosis Functional Composite). For this purpose, we prospectively studied 47 patients with early PPMS (with less than five years from symptom onset) and 18 healthy controls. Thus, we found that lesion load and GM MTR at baseline independently predicted the accrual of disability at five years of follow-up, as measured by the TWT (25-foot Timed Walk Test), highlighting the complementary roles of GM damage and lesions in predicting clinical disability. Furthermore, steeper increases in lesion load and more pronounced worsening in GM damage over five years were associated with faster clinical deterioration over the same period of time.

Finally, since a clinical trial (CT) with interferon beta-1b (IFN $\beta$ -1b) for patients with PPMS was carried out in our unit between 1998 and 2000, showing some positive effect on MSFC, our third objective was to investigate

the impact of IFN $\beta$ -1b treatment on clinical and MRI measures, five years after the termination of the CT. We obtained information about EDSS, MSFC and neuropsychological parameters in 63, 59 and 59 patients, respectively, out of the 73 that had participated in the CT. After five years without treatment, patients who had received IFN $\beta$ -1b during the CT showed better scores on the NHPT (Nine-Hole Peg Test) and a test related to executive functions; moreover, they showed a greater indemnity of those MRI parameters associated with normal-appearing brain tissue damage (normal-appearing WM MTR and brain atrophy) than patients who had received placebo during the CT. Finally, considering the group as a whole, the in-trial increase of lesions correlated with the EDSS deterioration over the following five years.

This thesis highlights that the two main forms of immunopathological damage in PPMS, the damage in the WM and that observed in the GM, are both crucial to the accrual of disability. Therefore, both types of damage should be taken into account for the creation of predictive models of clinical progression and the design of drugs that aim at slowing down the appearance of irreversible disability.

## II. INTRODUCCIÓN A LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE PRIMARIA PROGRESIVA

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria y desmielinizante que afecta al sistema nervioso central (SNC). Es la causa más frecuente de discapacidad en el adulto joven, después de los accidentes de tráfico. Es de naturaleza autoinmune y, aunque su causa es desconocida, se cree que tanto factores genéticos como ambientales juegan un papel importante en su aparición (Compston AC, 2006).

La EM primariamente progresiva (EMPP) constituye el 10-15% de todos los casos de EM y se caracteriza por un aumento progresivo de la discapacidad, generalmente consistente en una paraparesia espástica, desde la aparición de los síntomas (Thompson et al., 1997).

A pesar de que la EMPP es la forma menos frecuente de EM, afecta a un número nada despreciable de personas. Esta forma de la enfermedad debuta generalmente alrededor de los 40 años de edad, es tan frecuente en hombres como en mujeres y se caracteriza, desde un punto de vista clínico, por una progresión desde el inicio (Thompson et al., 1997) y, desde un punto de vista patológico, por un grado menor de inflamación en el SNC que en las formas de EM de inicio en brotes (Revesz et al., 1994; Thompson et al., 1997). Además, en la EMPP la presencia de neurodegeneración y pérdida axonal es más evidente que en las otras formas de la enfermedad (Tallantyre et al., 2009).

La EMPP está considerada la forma clínica de la enfermedad con peor pronóstico, debido principalmente a la presencia de progresión desde el inicio (Confavreux et al., 2000; Kremenchutzky et al., 2006; Tremlett et al., 2005; Weinshenker et al., 1989a). Además, el hecho de que en la actualidad ningún tratamiento haya todavía demostrado ser capaz de retrasar la aparición de discapacidad irreversible ha contribuido también al mal pronóstico de esta entidad. Por el contrario, para la forma remitente recurrente de la enfermedad (EMRR), que es la forma de comienzo más frecuente y cursa con brotes desde un inicio, numerosos fármacos han sido ya aprobados, tras demostrarse su

capacidad de disminuir la frecuencia de dichos brotes, en algunos casos de forma muy notable (Cohen et al., 2010; Coles et al., 2008; Kappos et al., 2006; Kappos et al., 2010; Miller et al., 2003; Polman et al., 2006; Rudick et al., 2006). Sin embargo, la mayoría de pacientes con EMRR desarrollan, después de unos 15 años de media de haber iniciado la enfermedad, una EM secundariamente progresiva (EMSP), caracterizada por una progresión continua de la discapacidad parecida a la que tiene lugar en la EMPP y para la que tampoco hay ningún tratamiento que haya resultado ser claramente eficaz (Grupo de Estudio Europeo de IFN $\beta$ -1b en EMSP, 1998; Cohen et al., 2002).

Por ello, a pesar de las diferencias en la forma de inicio, cada vez resulta más plausible la hipótesis de que ambas formas de la enfermedad, la EM de inicio en brotes (EMRR y EMSP) y la EM de inicio progresivo (EMPP), son en realidad la misma entidad (Thompson, 2004) y comparten gran parte de la fisiopatología, siendo la principal diferencia entre ellas la existencia de un mayor componente inflamatorio en la EMRR y EMSP que en la EMPP, lo que probablemente provoca que en un caso se observen brotes agudos de la enfermedad, mientras que en el otro, no. En este sentido, en las formas de inicio en brotes también se puede observar progresión y neurodegeneración, aunque éstas son las características principales de las formas primariamente progresivas (Confavreux et al., 2000; Confavreux et al., 1980; Frischer et al., 2009).

Desde que este tema fuera revisado en *Lancet Neurology* en 2007 (Miller and Leary, 2007), ha habido numerosos estudios que han permitido mejorar los criterios diagnósticos de esta forma de EM, identificado factores de predicción de la discapacidad física y cognitiva, investigado los mecanismos de daño patológico mediante análisis post-mortem y nuevas técnicas de RM y evaluado nuevos tratamientos mediante ensayos clínicos. Por ello, para la revisión que realizaríamos sobre el tema tuvimos en cuenta los estudios más recientes e intentamos contestar algunas de las cuestiones que aún permanecen sin respuesta en esta forma de la enfermedad.

## 1. Nosología de la enfermedad

Hacia 1870, cuando la EM fue descrita por primera vez como *sclérose en plaques* por Jean-Martin Charcot, ya se habló de que había dos subtipos de la enfermedad, una caracterizada por brotes y la otra por progresión, como formas de inicio de la enfermedad (Compston AC, 2006). Sin embargo, fue en 1952 cuando se hizo por primera vez la distinción entre aquellas formas progresivas desde un inicio y las que tenían lugar tras una fase inicial de brotes (McAlpine and Compston, 1952).

En 1996, tras realizar una encuesta internacional a un gran número de expertos en EM, Lublin y Reingold propusieron que se cambiara el antiguo término de EM crónica progresiva, que incluía todas las formas de EM progresiva y que había sido utilizado desde 1983 (Poser et al., 1983), por el término de EMSP, si la progresión aparecía tras un periodo inicial de brotes, EMPP, si la progresión era la forma de inicio de la enfermedad y había una total ausencia de brotes, o EM progresiva recidivante (EMPR), si a la fase progresiva de inicio se le sumaban brotes agudos de la enfermedad (Lublin and Reingold, 1996).

Esta clasificación fue muy bien acogida por los profesionales dedicados a la investigación en EM y quizás algo menos por los clínicos que trataban pacientes con esta enfermedad en su día a día, puesto que sabían que muy probablemente no pocos pacientes se moverían de una categoría a otra a lo largo de su vida, ya que alrededor del 30% de los pacientes con un diagnóstico inicial de EMPP podía presentar brotes clínicos agudos en algún momento de la enfermedad. Concretamente, el 28% de los pacientes con una EM de inicio progresivo de la cohorte de London (Ontario, Canadá) (Cottrell et al., 1999; Kremenchutzky et al., 1999) y el 39% de los pacientes de la cohorte de Lyon (Francia) (Confavreux et al., 2000; Confavreux and Vukusic, 2006a) presentaron algún brote sobreañadido al aumento progresivo de discapacidad, tras 25 y 21 años de seguimiento, respectivamente. No obstante, cuando en el año 2000 salieron publicados los primeros criterios diagnósticos para la EM de inicio progresivo, no se permitió la existencia de ningún brote para poder hacer

el diagnóstico de EMPP (Thompson et al., 2000).

Finalmente, para aquellos pacientes con un curso progresivo de la enfermedad que habían presentado un único brote, ya fuera antes o durante la fase progresiva, se propuso el término EM transicional progresiva (EMTP) (Filippi et al., 1994; Stevenson et al., 1999; Stevenson et al., 2000). Sin embargo, la falta de consenso hizo que este término quedara desplazado y que aquellos pacientes con EMTP cuyo único brote había tenido lugar antes de la fase progresiva fueran reasignados al grupo de EMSP y aquellos cuyo único brote había tenido lugar una vez comenzada la fase progresiva, al grupo de EMPR (Compston AC, 2006).

## **2. Epidemiología**

La prevalencia de EM se sitúa entre los 20 y los 200 casos/100.000 habitantes en Europa, Estados Unidos, Australia y Nueva Zelanda, siendo la incidencia entre un y siete casos/100.000 habitantes/año (Compston AC, 2006; Confavreux and Vukusic, 2006a; Weinshenker et al., 1989a). Mientras la mayoría de pacientes con EM comienzan su enfermedad en forma de brotes clínicos (EMRR), alrededor del 10-15% de pacientes lo hacen en forma de progresión desde el inicio (Confavreux et al., 2000; Confavreux et al., 1980; Thompson et al., 1997).

Algunas series han mostrado porcentajes de EMPP del 30-35% (Minderhoud et al., 1988; Weinshenker et al., 1989b; Weinshenker et al., 1989a), mucho mayores que los porcentajes tradicionalmente descritos. No obstante, es posible que ello sea debido a que brotes ocurridos mucho tiempo antes de comenzar la fase progresiva pasaran desapercibidos en el momento de la primera visita con el neurólogo y que, por tanto, ese 30-35% incluyera también formas secundarias progresivas con una fase inicial de brotes muy poco expresiva (Compston AC, 2006; Thompson et al., 1997; Weinshenker et al., 1989a). De hecho, cuando estas series han sido posteriormente seguidas, el porcentaje de EMPP ha disminuido hasta valores del 18%, similares a los de

otras series (Cottrell et al., 1999).

La proporción de hombres y mujeres en la EMPP, a diferencia de la EM de inicio en brotes, está muy igualada o incluso hay una ligera predominancia de hombres (Leary et al., 2003; Stevenson et al., 1999; Thompson et al., 1997).

Entre los factores medioambientales asociados a un mayor riesgo de desarrollar una EMPP se encuentra el tabaco (Healy et al., 2009), que también se ha asociado a un riesgo mayor de progresión (Hernan et al., 2005; Miller and Leary, 2007). Sin embargo, esto no ha sido confirmado por otros autores (Koch et al., 2007).

### **3. Presentación clínica**

En más del 80% de los casos, la EMPP se presenta como una paraparesia espástica progresiva, reflejando una mielopatía progresiva (Stevenson et al., 1999; Stevenson et al., 2000; Thompson, 2004; Thompson et al., 1997). Acompañando a los síntomas motores pueden aparecer también síntomas sensitivos en las extremidades inferiores y una afectación urinaria en forma de urgencia miccional. La segunda forma más frecuente de presentación es la afectación cerebelosa progresiva, que ocurre en un 8-15% de los casos (Miller and Leary, 2007; Stevenson et al., 1999). Finalmente, en un pequeño porcentaje de pacientes, alrededor del 1%, la EMPP puede presentarse como una pérdida de agudeza visual progresiva (Ormerod and McDonald, 1984) o como un deterioro cognitivo progresivo (Dujmovic et al., 2004; Miller and Leary, 2007). No obstante, dado que es mucho más frecuente presentar un deterioro cognitivo por una causa diferente de la EMPP, se recomienda prudencia a la hora de realizar el diagnóstico de EMPP a una persona que consulta por un deterioro progresivo de las facultades cognitivas (Thompson et al., 2000; Thompson et al., 1997).

A lo largo de la enfermedad, la fatiga, como también ocurre en otros subtipos de EM, puede aparecer en la EMPP. De forma interesante, en las formas progresivas se ha asociado tanto a alteraciones en la perfusión

sanguínea de ganglios basales (Inglese et al., 2007), como a niveles bajos de dehidroepiandrosterona y su forma sulfatada (Tellez et al., 2006). Como dato característico, existe cierta tendencia a que el aumento de la discapacidad en la EMPP ocurra casi siempre de forma circunscrita a un determinado sistema funcional, en lugar de afectar de forma difusa a varios sistemas funcionales (Stevenson et al., 1999).

En relación con el contenido de esta tesis, se hará especial mención a la afectación cognitiva que puede aparecer en la EMPP, pudiendo ésta ocurrir hasta en un tercio de los pacientes con esta forma de la enfermedad (Camp et al., 1999; Camp et al., 2005; Penny et al., 2010). Además, los síntomas cognitivos pueden verse agravados por la presencia concomitante de síntomas depresivos, frecuentes en estos pacientes (Julian et al., 2007). En la EMPP pueden afectarse diversos dominios cognitivos, tales como la memoria, la atención y velocidad de procesamiento de la información y las funciones ejecutivas (Penny et al., 2010; Tur et al., 2011c; Ukkonen et al., 2009). No obstante, se ha sugerido que el estudio de la velocidad de procesamiento de la información es probablemente la forma más sensible de detectar empeoramientos cognitivos a lo largo del tiempo en estos pacientes (Denney et al., 2008).

De acuerdo con los estudios publicados, los pacientes con EMPP tendrían una menor afectación cognitiva que los pacientes con una forma secundariamente progresiva de la enfermedad, aunque tal afectación cognitiva sería mayor que entre los pacientes con formas en brotes, en fases más iniciales de la enfermedad (Huijbregts et al., 2004; Huijbregts et al., 2006). Curiosamente, en el estudio de Huijbregts et al. (2004), de diseño transversal, cuando se estudiaron las diferencias entre subtipos de EM controlando por el grado de discapacidad, los pacientes con EMPP no presentaron una mayor discapacidad que aquellos con EMRR, mientras que las diferencias entre los otros grupos (EMPP y EMSP, EMSP y EMRR) se mantuvieron, siendo en grupo con EMSP siempre el más discapacitado.

Sin embargo, cuando los pacientes del estudio de Huijbregts et al. (2004) fueron seguidos de forma prospectiva durante dos años (Huijbregts et

al., 2006), se vio que, mientras los pacientes con EMRR presentaban alguna mejoría a lo largo del tiempo en aquellas tareas que requerían la implicación de múltiples habilidades de forma simultánea, como ocurre en determinados test, como el test de símbolos de dígitos (SDMT, del inglés *Symbol Digit Modalities Test*) (Smith A., 1982) o el test PASAT (*Paced Auditory Serial Addition Test*) (Rao et al., 1989), que requieren habilidad visuoespacial y velocidad de procesamiento o memoria de trabajo y velocidad de procesamiento, respectivamente (Huijbregts et al., 2006), los pacientes con formas progresivas de la enfermedad no presentaban tal mejoría. Por todo ello, se propuso que el rendimiento cognitivo podría estar en relación al grado de pérdida axonal, que es mayor entre los pacientes con formas progresivas de la enfermedad (Huijbregts et al., 2006).

Por otra parte, los pacientes con EMPP presentarían un menor deterioro que los pacientes con EM de inicio en brotes (EMRR y EMSP) en cuanto a la realización de tareas que precisan de la intervención de las funciones ejecutivas, que a su vez necesitan de la participación de las grandes vías de información de la SB cerebral (Huijbregts et al., 2004), como las pruebas de evocación categorial lexico-semántica (test de generar listas de palabras o *Word List Generation test*) (Rao et al., 1991). Por ello, se ha propuesto que el mayor grado de actividad inflamatoria y la mayor permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) en estas formas de inicio en brotes podrían ser en parte los causantes de un mayor daño en las vías de la SB de estos pacientes, al permitirse así la entrada al SNC de agentes neurotóxicos con mayor facilidad (Huijbregts et al., 2004; Huijbregts et al., 2006). No obstante, estos hallazgos necesitan ser confirmados, sobre todo teniendo en cuenta que otros trabajos han encontrado un grado similar de afectación cognitiva entre pacientes con EMPP y pacientes con EMSP, estos últimos habiendo estado expuestos de una forma más importante que los pacientes con EMPP a los eventuales fenómenos nocivos derivados de la inflamación en el SNC (Ukkonen et al., 2009).

Lo que sí parece claro, en cuanto a la afectación cognitiva en la EMPP, es que ésta se explica solo parcialmente por la carga de lesiones visibles en la

SB (Penny et al., 2010; Tur et al., 2011c), siendo pues probable que tanto el daño en el tejido de apariencia normal como el daño en la sustancia gris (SG) (Penny et al., 2010; Tur et al., 2011c) jueguen un papel crucial en la aparición del deterioro cognitivo. Recientemente se ha sugerido que la forma de respuesta funcional al daño tisular puede determinar las diferencias observadas entre los diferentes subtipos de EM en cuanto al perfil de afectación cognitiva (Riccitelli et al., 2010; Rocca et al., 2005; Rocca et al., 2010b; Rocca et al., 2010a).

#### **4. Diagnóstico diferencial**

Ante un paciente que presenta un síndrome neurológico progresivo consistente en una paraparesia progresiva, es necesario descartar toda una serie de enfermedades antes de poder hacer el diagnóstico de EMPP. Datos demográficos tales como edad al inicio de la clínica y la presencia de síntomas infrecuentes en la EMPP nos pueden ayudar a distinguir entre una EMPP y otra entidad. Sin embargo, la realización de una RM cerebral y medular es necesaria para poder llegar al diagnóstico de EMPP (Thompson et al., 1997).

Una mielopatía compresiva, debida a un tumor, a espondiloartrosis o a la presencia de malformaciones vasculares, especialmente de aquellas localizadas en la piamadre de la parte anterior de la médula espinal, es una de las causas más importantes de paraparesia progresiva y debe ser siempre excluida, entre otras cosas porque tiene un tratamiento potencialmente curativo. No obstante, las malformaciones vasculares pueden ocasionar, más que una mielopatía compresiva, una afectación isquémica de la médula debida generalmente a la presencia de una hipertensión venosa crónica (Victor and Ropper, 2001). Mientras muchas de estas entidades pueden ser fácilmente descartadas mediante la realización de una RM convencional de médula espinal, para descartar la presencia de malformaciones vasculares es generalmente también necesaria la realización de una RM con secuencia angiográfica, o incluso de una arteriografía espinal, que sigue siendo la prueba diagnóstica de referencia en estos casos (Patsalides et al., 2011). En la

degeneración combinada de la médula, generalmente debida a un déficit de vitamina B12 -aunque también puede ocurrir en situaciones de déficit de cobre (Jaiser and Winston, 2010; Kumar et al., 2006)- pueden observarse lesiones hiperintensas en las secuencias potenciadas en T2, que de forma ocasional pueden remedar a las de la EM (Karantanas et al., 2000). No obstante, las lesiones observadas en la degeneración combinada subaguda suelen afectar, de forma muy característica, a los cordones medulares posteriores y laterales de la médula (Vide et al., 2011), ayudando así al diagnóstico diferencial. Finalmente, entre las causas de mielopatía no compresiva cuyas imágenes en la RM pueden ofrecer dudas a la hora del diagnóstico diferencial, encontramos la mielopatía paraneoplásica. En ella se pueden observar, en por lo menos dos tercios de los pacientes, lesiones hiperintensas en T2. Éstas pueden llegar a ser longitudinalmente extensas y generalmente son de aspecto simétrico, según una revisión reciente de 31 pacientes que desarrollaron una mielopatía como proceso paraneoplásico. Además, puede observarse una afectación de la SG medular en un porcentaje no despreciable de pacientes. Según esta revisión, la mielopatía puede preceder a la aparición de la neoplasia y puede ser muy rápidamente progresiva, siendo la mediana de tiempo entre el inicio de los síntomas y la necesidad de silla de ruedas de unos nueve meses (Flanagan et al., 2011).

En ocasiones nos podemos encontrar con RM cerebrales no normales pero tampoco completamente sugestivas de EM. En esos casos debemos pensar en entidades tales como las leucodistrofias, que forman parte de un gran grupo de entidades caracterizadas por una destrucción progresiva de la mielina dentro del SNC y que se desarrollan como consecuencia de una alteración genética (Victor and Ropper, 2001). La adrenomieloneuropatía ligada al cromosoma X aparece generalmente en adultos jóvenes y provoca una paraparesia progresiva, afectación de la sensibilidad vibratoria y un trastorno de esfínteres. La realización de análisis sanguíneos en los que se investiguen ácidos grasos de cadena muy larga y hormonas suprarrenales, dada la alta asociación con insuficiencia suprarrenal, puede ayudar al diagnóstico. La leucodistrofia autosómica dominante (LDAD) de inicio en el adulto, una entidad diferente por completo del resto de leucodistrofias y descrita por primera vez en

1984 (Eldridge et al., 1984), puede cursar con paraparesia y ataxia, además de con un trastorno del esfínter urinario, estreñimiento y disfunción eréctil. Además, en la RM se observan lesiones en SB y atrofia, tanto en el encéfalo como en la médula espinal, de forma muy similar a como ocurre en la EM. Por ello, es frecuentemente confundida con la EM y sobre todo con la EMPP, por su curso clínico (Coffeen et al., 2000; Schuster et al., 2011). No obstante, en la LDAD de inicio en el adulto, la paraparesia y la ataxia vienen generalmente precedidos por una disfunción autonómica, probablemente causante de los trastornos de los esfínteres y sexuales, pudiendo causar también hipotensión ortostática, que deben alertar al neurólogo que hace la historia clínica. Finalmente, cabe mencionar la enfermedad de Krabbe, de herencia autosómica recesiva, aunque su inicio en la edad adulta es muy raro.

Enfermedades inflamatorias del SNC tales como la neurosarcoidosis, donde las lesiones en el cerebro y en la médula espinal pueden ser indistinguibles de aquellas observadas en la EM -aunque generalmente en las neurosarcoidosis hay realce meníngeo- y las vasculitis del SNC, tanto en el contexto de vasculitis sistémicas, que potencialmente pueden afectar a cualquier órgano o aquellas vasculitis que asientan solamente en el SNC, pueden potencialmente causar síntomas muy parecidos a los de la EMPP, con paraparesia progresiva, síntomas sensitivos y alteraciones de los esfínteres (Victor and Ropper, 2001). Sin embargo, la afectación de la médula espinal es generalmente rara en las vasculitis del SNC (Salvarani et al., 2008).

Determinados procesos vasculares, en particular el CADASIL (arteriopatía cerebral autosómica dominante con infartos subcorticales y leucoencefalopatía), donde las lesiones están típicamente localizadas en las regiones temporales y frontales inferiores del cerebro, y donde varios miembros de la familia, incluyendo uno de los progenitores, están también afectados, son enfermedades que se deben tener siempre en cuenta en el diagnóstico diferencial (Miller et al., 2008; Miller and Leary, 2007).

Finalmente, es importante mencionar que en ocasiones la RM cerebral y de la médula espinal pueden ser totalmente normales o tener mínimas alteraciones, cuando estamos explorando el diagnóstico diferencial de un

paciente que acude por una paraparesia espástica progresiva. En estos casos se deben tener en cuenta trastornos hereditarios tales como la paraparesia espástica hereditaria y la ataxia de Friedrich; infecciones por gérmenes como el HTLV-1 (virus linfotrófico T), esquistosomiasis, sífilis, VIH y brucelosis; enfermedades de motoneurona, como la esclerosis lateral amiotrófica y la esclerosis lateral primaria; trastornos por intoxicación como el latirismo y la intoxicación por óxido nítrico; mielopatía asociada a hepatopatía crónica -una rara complicación de la enfermedad hepática crónica que se asocia a *shunt* porto-cava- que generalmente cursa con afectación motora (Conn et al., 2006; Mendoza et al., 1994); y procesos paraneoplásicos, donde la RM medular puede no mostrar alteraciones significativas (Flanagan et al., 2011). Para descartar todas estas entidades se requiere una anamnesis muy cuidadosa, la realización de analíticas sanguíneas específicas y, en ocasiones, un electromiograma.

Cuando el diagnóstico diferencial se hace con las posibles causas de un síndrome atáxico progresivo, la posibilidad de una degeneración subaguda cerebelosa paraneoplásica siempre debe tenerse en cuenta, siendo los tumores más frecuentemente asociados a esta entidad el cáncer microcítico de pulmón, el cáncer de mama, el cáncer de ovario y el linfoma de Hodgkin (Dalmau and Rosenfeld, 2008). Es importante tener en cuenta que, en la gran mayoría de síndromes cerebelosos paraneoplásicos, la RM cerebral suele ser normal, sobre todo al inicio (Rees, 2006). Los casos reportados de alteraciones en la RM en etapas iniciales de la degeneración cerebelosa paraneoplásica, sobre todo consistentes en atrofia (Scheid et al., 2006) y edema (de et al., 2006), son excepcionales. En cambio, a los meses de haber comenzado los síntomas, sí aparece una atrofia cerebelosa evidente en la mayoría de los casos. Aunque el ritmo de empeoramiento clínico es claramente diferente entre el síndrome cerebeloso progresivo debido a una EMPP y aquel observado en el contexto de un proceso paraneoplásico, siendo en éste último mucho más rápido, lo que puede condicionar que los pacientes necesiten una silla de ruedas para desplazarse a los pocos meses del inicio de los síntomas (Rees, 2006), es posible que en ocasiones haya dudas a la hora de hacer el diagnóstico diferencial, sobre todo teniendo en cuenta la disociación clínico-

radiológica característica de la EM y especialmente de la EMPP, donde la carga de lesiones puede ser muy escasa. Así pues, en aquellos casos en los que persistan dudas diagnósticas, los anticuerpos anti-neuronales deberán ser investigados. En el caso de resultar negativos y seguir siendo alta la sospecha clínica de proceso paraneoplásico, se deberá pensar sobre todo en el diagnóstico de carcinoma pulmonar no de célula pequeña (Dalmau and Rosenfeld, 2008).

En pacientes que presentan un curso consistente en una neuropatía óptica progresiva, se debe plantear la posibilidad de una neuropatía óptica hereditaria de Leber, en la que ocasionalmente pueden aparecer lesiones parecidas a las observadas en la EM (Kovacs et al., 2005; Perez et al., 2009).

## **5. Historia natural y pronóstico**

En todas las publicaciones de series de pacientes con EM, en las que se incluyen individuos con todos los subtipos de la enfermedad, la presencia de progresión ha sido identificada como un factor de mal pronóstico (Confavreux et al., 2000; Kremenchutzky et al., 2006; Tremlett et al., 2005; Weinshenker et al., 1989a). En ocasiones, dado que la edad de inicio de la progresión se sitúa alrededor de los 40 años tanto para la EMPP como para la EM de inicio en brotes (Cottrell et al., 1999; Miller and Leary, 2007; Thompson et al., 1986; Thompson et al., 1997), se ha sugerido que el aumento de discapacidad podría estar más relacionado con la edad que propiamente con el tipo de EM (Confavreux et al., 1980; Confavreux and Vukusic, 2006b). Sin embargo, la alta variabilidad en el ratio de progresión dentro de un mismo grupo de pacientes con EM progresiva en general, y con EMPP en particular, sugiere que otros factores aparte de la edad están probablemente implicados.

En cuanto al tiempo hasta alcanzar una determinada puntuación en la escala del EDSS (Kurtzke, 1983), dos importantes estudios de historia natural en EM, llevados a cabo con las cohortes de London (Ontario, Canadá) y Lyon (Francia) y publicados en 1999 y 2000, respectivamente, encontraron que el tiempo hasta alcanzar un EDSS de seis, siete u ocho era significativamente

más corto en aquellos pacientes con un inicio progresivo que en los que habían tenido un inicio en brotes de la enfermedad (Confavreux et al., 2000; Cottrell et al., 1999). Sin embargo, una vez comenzada la fase progresiva, no está claro que los pacientes con un inicio progresivo difieran de aquellos que comenzaron con una forma en brotes. En la cohorte de Lyon, el tiempo desde un EDSS de cuatro hasta uno de seis fue similar para ambos grupos (inicio en brotes, mediana en años [intervalo de confianza al 95%]: 5,7 [4,9–6,4]; inicio progresivo: 5,4 [4,3–6,6]) (Confavreux et al., 2000). En cambio, en la cohorte de London (Ontario), los pacientes con un inicio en brotes alcanzaron un EDSS de seis y de ocho, una vez instaurada la fase progresiva, antes de lo que lo hicieron los pacientes con EMPP. No obstante, en el mismo estudio de London (Ontario), el tiempo desde el inicio de la progresión hasta la muerte debida a EM (EDSS de 10) fue similar para ambos grupos (Cottrell et al., 1999), apoyando así también la existencia de un comportamiento similar entre las dos formas progresivas de la enfermedad.

Todo lo anterior, pues, refleja la importante variabilidad que existe, en cuanto al ritmo de progresión, entre las diferentes cohortes de EM progresiva y, concretamente, de EMPP, como se ha podido observar también en otros estudios. Por ejemplo, mientras los trabajos del grupo de British Columbia (Canadá) describían una media (95% intervalo de confianza, IC) de tiempo hasta alcanzar un EDSS de 6 de 14,0 (11,3-16,7) años (Koch et al., 2009), los pacientes de la cohorte de London (Ontario, Canadá) lo hacían con una media de 9,5 (8,5-10,6) años (Scalfari et al., 2011).

De forma similar, se ha descrito una gran variabilidad entre los individuos de una misma cohorte, pudiendo observarse un curso benigno en hasta un 10% de los pacientes con EMPP (Koch et al., 2009).

Entre los factores asociados a un mayor ritmo de progresión se encuentran la existencia de una progresión más rápida en etapas precoces de la enfermedad (Cottrell et al., 1999; Tremlett et al., 2005) y la afectación, en un momento inicial, de tres o más sistemas funcionales (Cottrell et al., 1999). Por el contrario, la afectación exclusivamente sensitiva se ha asociado a un mejor pronóstico (Koch et al., 2009). En relación a la edad de presentación, se ha

sugerido que cuanto más joven es el paciente, más tiempo tarda en alcanzar un EDSS determinado pero, a su vez, alcanza dicho EDSS a una edad más temprana (Koch et al., 2009), lo que pone de manifiesto la complejidad de los mecanismos responsables de la progresión de la discapacidad. El efecto del género sobre la progresión no ha sido confirmado. Mientras un estudio publicado en 1999 mostró una progresión más rápida en hombres que en mujeres, alcanzando, respectivamente, un EDSS de 10 a los 30 y a los 40 años del inicio de la enfermedad ( $p=0,02$ ) (Cottrell et al., 1999), un estudio publicado en 2009 sobre otra cohorte no pudo confirmar estos hallazgos (Koch et al., 2009).

Lo que sí parece estar claro es que la presencia de brotes añadidos a la progresión no tiene ninguna influencia en la gravedad de la misma, tanto para EMPP como para EMSP (Confavreux et al., 2000; Cottrell et al., 1999).

Finalmente, el hecho de que ningún tratamiento haya resultado ser eficaz en esta forma de la enfermedad sin duda contribuye a su mal pronóstico (Miller and Leary, 2007).

## **6. Genética de la EMPP**

Desde siempre se ha sospechado la influencia de factores genéticos en la EM (McDonnell et al., 1999). Recientemente, un estudio ha mostrado que en la EMPP familiar la edad de inicio de los síntomas era significativamente inferior a la observada en la EMPP esporádica, apoyando así el rol de los genes también en este subtipo de EM (Koch et al., 2010).

Genes relacionados con complejo de antígenos leucocitarios humanos (HLA, del inglés, *Human Leukocyte Antigen*)

Numerosos genes relacionados con la región del HLA se han asociado a un mayor riesgo de desarrollar EM (Jersild et al., 1972). Sin embargo, todavía no se ha hallado ningún gen a la vez suficiente y necesario para el desarrollo de la

enfermedad. Asimismo, aunque algunas variaciones genéticas se han asociado más a una forma de la enfermedad que a otra (por ejemplo, los haplotipos DR4-DQ8 y DR1-DQ5 se han asociado a la EMPP) (Compston et al., 1976; Terasaki et al., 1976; Vasconcelos et al., 2009; Weinshenker et al., 1998), tampoco se han hallado genes o combinaciones genéticas capaces de determinar de forma fehaciente la aparición de un subtipo específico de EM, tal como muestra uno de los estudios más importantes hasta la fecha sobre asociación genética en EM (Sawcer et al., 2011).

### Genes fuera del complejo HLA

En un reciente estudio se han asociado polimorfismos en una determinada región del cromosoma 10 (C10orf27, del inglés *chromosome 10 open reading frame*) con el riesgo de desarrollar EMRR o EMPP (Goertsches et al., 2008). Curiosamente, el polimorfismo asociado al desarrollo de EMPP también se ha relacionado con una forma más severa de la enfermedad.

En otros estudios en los que se examinaba la asociación de polimorfismos localizados en otras regiones del ADN, en genes ya propuestos como relevantes por su relación con la patogenia de la EM, aunque se ha mostrado la relación entre los mismos y la presencia de una mayor severidad clínica, no se ha podido hallar una relación con la aparición de uno u otro fenotipo (subtipo) de la enfermedad. Tal sería el caso, por ejemplo, para los polimorfismos del gen de la interleuquina (IL)-2 (Sombekke et al., 2010) o los polimorfismos del gen del receptor de la IL-7 (Sombekke et al., 2011).

En lo que se refiere a la expresión génica, mientras unos autores encontraron diferencias en la expresión génica del gen IL-7R entre pacientes con EMPP y pacientes con EMSP (Booth et al., 2005), otro estudio más reciente no pudo hallar diferencias en cuanto a la expresión de este receptor entre los diferentes subtipos de la enfermedad (Sombekke et al., 2011).

Así pues, podríamos decir que, a día de hoy, no existen datos que de forma convincente indiquen que la EMPP tiene una base genética diferente del

resto de subtipos de la enfermedad (Sawcer et al., 2011).

## **7. Inmunopatología**

### Inflamación

En 1994, Revesz et al. encontraron que las lesiones en la EMPP tenían menor grado de celularidad perivascular que las lesiones en la EMSP, sugiriendo la presencia de una menor inflamación en la primera (Revesz et al., 1994). Aunque en este estudio no se clarificó si las diferencias en cuanto a inflamación eran cuantitativas solamente o también cualitativas, estudios posteriores han sugerido que éstas son predominantemente cuantitativas (Bramow et al., 2010; Lucchinetti et al., 1999; Lucchinetti and Bruck, 2004). Además, afectarían no solo al número sino también al tamaño de las lesiones, especialmente a aquellas que tienen un alto grado de inflamación y una desmielinización activa. En cambio, el número de lesiones con un bajo grado de inflamación parece ser similar en todos los subtipos de EM (Bramow et al., 2010).

Por otra parte, si bien es cierto que la inflamación es menor en la EMPP, se ha sugerido que ésta podría durar más tiempo que en las formas en brotes (Zettl et al., 1998). En relación con este dato, otros autores han encontrado alteraciones persistentes en la BHE de pacientes con EM progresiva localizadas no solo en las lesiones activas sino también en lesiones crónicas inactivas y en el tejido cerebral de apariencia normal, tanto en la SB como en la SG (Leech et al., 2007).

Recientemente, se ha hablado de que la inflamación que tiene lugar en la EM progresiva en general es una inflamación crónica, que se halla esencialmente compartimentada. Concretamente, tal inflamación crónica se halla dividida en dos compartimentos, uno perivascular y otro subaracnoideo. Ambos compartimentos tienen en común que se encuentran relativamente aislados de la circulación periférica, puesto que la BHE se encuentra prácticamente intacta (Reynolds et al., 2011).

El compartimento perivascular se caracteriza por la presencia de

infiltrados linfocitarios perivasculares, con una predominancia de linfocitos T CD8+, así como por la presencia característica de una microglía activada. Por microglía activada entendemos aquella presencia de células propias del sistema inmunitario innato residentes en el SNC que, de forma crónica, sufren una activación mantenida. Ésta comporta, por una parte, un daño directo sobre el tejido cerebral, a través de la producción de citoquinas y radicales libres, y por otra, la persistencia del proceso inflamatorio dentro del SNC característico de la EM, puesto que las células microgliales activadas actúan como células presentadoras de antígenos para los linfocitos (Ransohoff and Perry, 2009). En relación con esta presencia de la microglía activada en la EM crónica y progresiva, cabe decir que, incluso antes de que se entendiera la inflamación crónica como un proceso compartimentado, ya se hablaba de la importancia de la activación de este tipo de células en el SNC como un importante mecanismo inmunopatológico subyacente al daño axonal difuso de los pacientes con EM progresiva (Kutzelnigg et al., 2005).

En relación aún con la inflamación crónica del compartimento perivascular, ambos elementos, tanto los infiltrados linfocitarios como la microglía activada, se han asociado a la aparición de desmielinización de la SB, tanto en forma de lesiones visibles como en forma de desmielinización difusa de aquella SB que tendría una apariencia normal si se examinara con las técnicas más convencionales de RM (SBAN). Al parecer, la desmielinización ocurriría como consecuencia de una fagocitosis de la mielina por parte de los macrófagos (Reynolds et al., 2011). No obstante, si bien los dos elementos mencionados arriba parecen estar implicados en el daño tisular, es la presencia de la microglía activada lo que parece conllevar un daño mayor. Así, la activación de la microglía en el compartimento perivascular se ha asociado recientemente al daño que tiene lugar en la SBAN. De hecho, un reciente estudio post-mortem ha descrito una relación cuantitativa positiva entre la activación microglial, representada por células HLA-DR+ y células iNOS+, y alteraciones estructurales en los componentes axogliales de regiones paranodales de la SB, representadas por una elongación de la neurofascina de 155-kd glial, una proteína que tiene la función de asegurar la conducción saltatoria normal a nivel de los nódulos de Ranvier. Tales alteraciones

estructurales a nivel nodal y paranodal están consideradas como marcadores muy sensibles del daño axonal que ocurre tras la degeneración de la mielina. Por ello, se cree que la presencia de microglía activada es crucial para el desarrollo del daño axonal que tiene lugar en la SBAN de los pacientes con EM progresiva (Howell et al., 2010).

En cuanto a la inflamación crónica que tiene lugar en el compartimento subaracnoideo, cabe decir que se trata de infiltrados predominantemente de linfocitos B que asientan en el espacio subaracnoideo, detrás de una BHE relativamente intacta, y que forman estructuras muy similares a los folículos linfoides que pueden encontrarse en los órganos linfoides primarios y secundarios. Por ello, se han denominado, en inglés, *ectopic B cell follicle-like structures*. Además de células B, no obstante, también pueden hallarse otros tipos de células, como linfocitos T o células de la microglía, que también está activada, como sucedía en la inflamación del compartimento perivascular (Howell et al., 2011).

Estos folículos linfoides subaracnoideos se han hallado hasta en un 40% de los pacientes con EMSP y, en estos pacientes, se han asociado a una desmielinización cortical más extensa (Howell et al., 2011). Esta desmielinización cortical da así lugar a las lesiones que asientan en la SG y que prácticamente son solo visibles gracias a secuencias de RM denominadas de doble inversión recuperación (secuencias DIR, del inglés, *Double Inversion Recovery*). En cuanto a las lesiones inflamatorio-desmielinizantes corticales, es importante tener en cuenta que su naturaleza es diferente de la naturaleza de las lesiones visibles de la SB, que clásicamente afectan a las formas de EM en brotes, sobre todo en fases precoces. Las lesiones corticales se caracterizan por un infiltrado inflamatorio mucho menor que las lesiones de la SB típicas de las fases más precoces y por una rotura de la BHE también mucho menor, pudiendo incluso observarse una ausencia de rotura de BHE (van et al., 2007). Así pues, el hecho de que las lesiones corticales, que tienen una clara relación con la discapacidad y se han asociado a la EM progresiva (Calabrese et al., 2009b), tengan esta naturaleza tan diferente de las lesiones de la SB, podría ser una explicación de por qué los pacientes con formas progresivas no han

presentado ninguna respuesta satisfactoria a los tratamientos probados hasta el día de hoy.

Si bien es cierto que en un estudio post-mortem publicado unos años atrás no se observaron folículos de células B en las meninges de pacientes con EMPP y en cambio sí se observaron tales folículos en pacientes afectados de EMSP (Magliozzi et al., 2007), otro estudio algo posterior mostró la presencia de folículos en ambos tipos de formas progresivas, la EMSP y la EMPP (Frischer et al., 2009). Además, el hecho de que en el estudio de Magliozzi (2007) tan solo siete pacientes con EMPP fueran estudiados (mientras que los pacientes con EMSP fueron 29) hace difícil extraer conclusiones respecto a la presencia o ausencia de tales folículos de células B en los pacientes con EMPP. Asimismo, un estudio llevado a cabo en 2005 mostró ya la presencia de una importante desmielinización de la SG cortical en aquellos pacientes con formas progresivas de EM, tanto EMPP como EMSP, antes de que tal desmielinización cortical pudiese atribuirse a la presencia de folículos B meníngeos, no describiéndose, en principio, ninguna diferencia entre los dos tipos de EM progresiva (Kutzelnigg et al., 2005).

Lo que sí estaría más claro es que la presencia de estos folículos se asocia no solo a una desmielinización cortical más extensa, lo que reflejaría una mayor gravedad histopatológica (Howell et al., 2011), sino también a una peor evolución clínica, ya que al parecer los folículos estarían sobre todo presentes en aquellos pacientes con una progresión activa de la discapacidad (Frischer et al., 2009).

### Desmielinización y remielinización

Algunos años atrás se propuso que los mecanismos de desmielinización podrían ser diferentes entre los diferentes subtipos de EM, de acuerdo con un estudio que halló que en la EMPP, aparte de encontrarse patrones de desmielinización comunes a todos los subtipos, aparecía una forma de desmielinización específica caracterizada por la degeneración primaria de los oligodendrocitos (Bruck et al., 2002; Lucchinetti et al., 2000; Lucchinetti and

Bruck, 2004). De acuerdo con estos hallazgos, otro estudio llevado a cabo con ejemplares de mono tití (en inglés, *marmoset*) vio que la presencia de anticuerpos frente a la glicoproteína mielínica de los oligodendrocitos era indispensable para que se iniciara la progresión clínica (Jagessar et al., 2008).

Más recientemente, en un estudio post-mortem en el que se analizaron las áreas de desmielinización y remielinización de los cerebros y médulas de 13 pacientes con EMPP y 34 con EMSP, se vio que los pacientes con EMSP presentaban una densidad de placas de inflamación de alto grado y desmielinización activa superior a los pacientes con EMPP. En cambio, en lo que atañía a las áreas de inflamación de bajo grado y desmielinización crónica, lentamente expansiva, no había diferencias entre los pacientes con formas EMSP y formas EMPP (Bramow et al., 2010). Así pues, este estudio nuevamente pondría de manifiesto lo explicado en el apartado anterior, es decir, que los mecanismos subyacentes a la inflamación crónica, es decir, aquella inflamación que tiene lugar en el SNC detrás de una BHE relativamente intacta, es muy similar para todas las formas progresivas, independientemente de si hay o no una fase de brotes previa. No obstante, tal como muestra el estudio de Bramow (2010), es posible que las formas secundariamente progresivas de EM presenten aún un cierto vestigio de inflamación de alto grado y desmielinización activa, elementos propios de las fases más precoces, remitentes-recurrentes, de la enfermedad.

Los patrones de remielinización podrían ser también diferentes entre los diferentes subtipos de EM (Lucchinetti et al., 1999). En un estudio anatomopatológico en el que se estudiaron muestras procedentes de biopsias y autopsias de 113 pacientes con EM, se hallaron principalmente dos patrones de remielinización dentro de las placas desmielinizadas, un patrón observado en las formas de inicio en brotes caracterizado por la presencia de pocos macrófagos, un reclutamiento eficaz de oligodendrocitos y reparación de la vaina de mielina y otro patrón caracterizado por la presencia de abundantes macrófagos, un reclutamiento de oligodendrocitos limitado y una remielinización insuficiente, sobre todo presente en las lesiones de los pacientes con EMPP (Lucchinetti et al., 1999). No obstante, dado que el

estudio de patrones de reclutamiento de oligodendrocitos en las placas desmielinizadas se hizo solamente en 56 de los 113 pacientes totales y dado que en esta subpoblación de pacientes estudiados la gran mayoría de ellos presentaba una forma aguda de la enfermedad o una forma de inicio en brotes, con un tiempo de evolución relativamente corto, resulta difícil extraer conclusiones fiables en cuanto a correlaciones entre el reclutamiento oligodendrocitario y el fenotipo clínico de la enfermedad. En cambio, lo que sí puso de manifiesto este estudio fue el papel crucial de la microglía en el daño de los oligodendrocitos y, por consiguiente, en la ausencia de una remielinización efectiva. Concretamente, en este estudio se vio una relación inversamente proporcional entre la cantidad de oligodendrocitos y la de macrófagos en la lesión desmielinizante (o placa desmielinizada) (Lucchinetti et al., 1999). De esta manera, estos hallazgos irían en la misma línea que los hallazgos de publicaciones más recientes, donde la microglía parece jugar un papel más que decisivo en el daño tisular, sobre todo en aquel daño sobre el tejido de apariencia normal (Howell et al., 2010), como se menciona en apartados previos.

Sin embargo, un poco en contra de lo previamente descrito por Lucchinetti et al. (1999), recientemente se ha sugerido que en los pacientes con formas primariamente progresivas de la enfermedad podría existir una mayor capacidad de remielinización a nivel cerebral, así como un mayor número de placas de remielinización, en comparación con la EMSP (Bramow et al., 2010). Según los autores de este estudio, el hecho de que las áreas inicialmente remielinizadas fueran más vulnerables a una segunda desmielinización (hecho constatado en su estudio), podría ser una explicación de esta menor capacidad global de remielinización observada en los pacientes con EMSP, ya que en estos pacientes las áreas de desmielinización eran mayores que en los pacientes con EMPP. Sin embargo, este mismo estudio mostró una capacidad similar de remielinización en las lesiones asentadas en la médula espinal, entre los diferentes subtipos de EM, o incluso una tendencia hacia una peor remielinización entre los pacientes con EMPP (Bramow et al., 2010).

## Daño axonal

El daño axonal está considerado como el principal sustrato patológico de la discapacidad irreversible (Bjartmar et al., 2000; Tallantyre et al., 2010) y es común a todas las formas progresivas de EM (Bruck et al., 2002; Charcot JM, 1868; Charcot JM, 1877). Puede aparecer en relación a la inflamación, en el contexto de procesos tanto agudos (Dziedzic et al., 2010; Frischer et al., 2009) como crónicos (Kutzelnigg et al., 2005; Schirmer et al., 2010) y puede darse también de forma independiente de la inflamación (DeLuca et al., 2006; Evangelou et al., 2005; Lovas et al., 2000).

Respecto a la relación entre la degeneración axonal y la inflamación, un estudio mostró que los marcadores de lesión axonal aguda estaban sobre todo presentes en las lesiones activas, especialmente frecuentes en las formas muy agudas de EM y en la EMRR, mientras que los marcadores de daño axonal crónico se observaban en las lesiones inactivas de todos los tipos de EM. Sin embargo, cuando lesiones en el mismo estadio evolutivo fueron comparadas entre los diferentes tipos de EM, no se observaron diferencias significativas en cuanto a los marcadores de daño axonal (Frischer et al., 2009). En contraste con estos datos, los autores de otro estudio encontraron que en los pacientes con EMPP la densidad axonal en las placas desmielinizadas comparada con la densidad axonal de la SBAN estaba doblemente reducida en comparación con los pacientes con EMSP (reducción de la densidad axonal en las placas desmielinizadas en comparación con la SBAN [EMPP vs. EMSP]: 33% vs. 16%) (Tallantyre et al., 2009).

Por otra parte, tal como se menciona en apartados anteriores, la presencia de una microglía activada en el tejido cerebral de los pacientes con EM progresiva puede contribuir de forma directa al daño axonal característico de esta enfermedad. Así, se ha visto que la cantidad de microglía activada y el grado de degeneración de determinadas estructuras paranodales están fuertemente asociadas (Howell et al., 2010).

No obstante, si bien podemos conocer cada vez mejor los procesos que provocan que el daño tisular y concretamente el daño axonal, en la EM, tenga

lugar, cuando analizamos las causas últimas de tal daño, vemos que todavía quedan demasiadas incógnitas por resolver. En este sentido, se han propuesto diferentes mecanismos para explicar el daño axonal, como la presencia del alelo épsilon 4 ( $\epsilon 4$ ) de la apolipoproteína E (APOE), que se ha asociado, en pacientes con EM, a niveles más bajos de N-acetil aspartato, un marcador de la integridad neuronal que se mide mediante técnicas de espectroscopía por RM (Enzinger et al., 2003), así como a una mayor progresión de la atrofia cerebral y una mayor destrucción tisular dentro de las lesiones (i.e. a una mayor aparición de *black holes* [ver más adelante]) (Enzinger et al., 2004). Asimismo, el acúmulo de proteína tau anormalmente fosforilada e insoluble en los axones, que puede comportar la formación de agregados neurotóxicos, también se ha propuesto como un posible mecanismo a través del cual podría producirse el daño axonal en la EM (Anderson et al., 2010; Schneider et al., 2004).

De todas maneras, aunque la presencia de daño axonal estaría más presente en la EMPP, o en las formas progresivas en general, que en otras formas de EM, no está claro, según los trabajos hasta ahora publicados, que los mecanismos últimos de daño axonal sean diferentes para los distintos subtipos de EM.

### Daño cortical

La afectación de la SG en la EM incluye desmielinización y, en un menor grado, degeneración axonal (Geurts and Barkhof, 2008). Esta desmielinización ocurre en forma de lesiones que, a diferencia de las lesiones de la SB, tienen un carácter mucho menos inflamatorio, dado que no parecen contener infiltrados linfocitarios (Bo et al., 2003), depósito del complemento (Brink et al., 2005) o rotura de la BHE (van et al., 2007), siendo predominante la desmielinización (Hulst and Geurts, 2011). En consonancia con ello, la presencia de lesiones corticales ha sido reportada en numerosos estudios de RM, gracias sobre todo a las secuencias de doble inversión recuperación (DIR), como se describe más adelante (Calabrese et al., 2009b; Calabrese et al., 2010a; Geurts et al., 2007; Kutzelnigg and Lassmann, 2006).

Si bien recientemente se ha reportado la existencia de lesiones corticales en pacientes con EM de inicio en brotes en estadíos muy precoces de la enfermedad (Lucchinetti et al., 2011) o incluso en personas con síndromes radiológicos aislados, es decir, en personas con estados pre-sintomáticos de EM, cuyas lesiones en la RM se han detectado de forma casual (Giorgio et al., 2011), es cada vez más aceptada la idea de que la afectación de la SG, y concretamente la de la SG cortical, ocurre sobre todo en los pacientes con una EM de largo tiempo de evolución y con formas progresivas, es decir, en la EMPP y la EMSP (Hulst and Geurts, 2011; Kutzelnigg et al., 2005; Vercellino et al., 2005). De hecho, en el estudio de Giorgio y colaboradores (2011), aquellas personas con síndromes radiológicos aislados que además presentaban lesiones corticales mostraban signos radiológicos de una mayor diseminación -temporal y espacial- de la enfermedad.

No está claro que la desmielinización cortical en la EMPP difiera de la existente en la EMSP. Sin embargo, hay datos en la literatura que sugieren que dicha desmielinización podría deberse a diferentes mecanismos (Magliozzi et al., 2010). Por ejemplo, en la EMSP se han hallado folículos menínges de células B, asociados a desmielinización cortical y pérdida neuronal (Magliozzi et al., 2010), que no se han descrito en la EMPP (Magliozzi et al., 2007). No obstante, tal como se sugiere en apartados previos, antes de poder afirmar que los mecanismos subyacentes al daño cortical son diferentes entre los distintos subtipos de EM progresiva (EMPP y EMSP), deben llevarse a cabo más estudios en este sentido.

### Citoquinas, quimiocinas y moléculas de adhesión

Entre las diversas moléculas que han sido estudiadas por estar relacionadas con la activación o la migración linfocitaria, destaca la citoquina CXCL13, cuya función principal es la de atraer a los linfocitos B al SNC, que se unen a ella a través del receptor CXCR5. Así pues, en un estudio en el que se determinaron los niveles de CXCL13 en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con

diferentes subtipos de la enfermedad, entre los que se contaban nueve pacientes con EMPP y 28 pacientes con EMSP, se encontraron niveles más altos de esta quimiocina (CXCL13) en los pacientes con EM (en conjunto) que el grupo de controles (con enfermedades neurológicas no inflamatorias). Es más, se hallaron correlaciones significativas entre los niveles de CXCL13 y otros marcadores de actividad de la enfermedad, como el número de lesiones realizadas con gadolinio en la RM cerebral, número de linfocitos B en el LCR o la concentración de metaloproteinasa-9 (MMP-9), entre otros. Si bien en este estudio no se hicieron comparaciones directas entre diferentes subtipos de EM en cuanto a las concentraciones de CXCL13, aquellos pacientes con formas más precoces de la enfermedad (primeros brotes y EMRR) presentaron niveles similares (o no más bajos, por lo menos) que los pacientes con formas progresivas (EMSP y EMPP) (Sellebjerg et al., 2009).

Los resultados del trabajo de Sellebjerg et al. (2009), pues, serían congruentes con la mayor actividad inflamatoria aguda que se sabe que existe en las formas en brotes y más precoces de la enfermedad (Reynolds et al., 2011). Sin embargo, dado que recientemente se ha descrito que en pacientes con formas progresivas puede existir, en un porcentaje de pacientes no despreciable (hasta en un 40% de las formas EMSP), un fenómeno inflamatorio crónico a nivel meníngeo consistente en estructuras similares a los folículos de células B (Howell et al., 2011), que probablemente no se da en las formas de EM de menos tiempo de evolución (Kutzelnigg et al., 2005), quizás esperaríamos haber encontrado una mayor concentración de CXCL13 en LCR en las formas progresivas que en las formas más agudas de la enfermedad. De hecho, en estudios realizados en el modelo animal de EM, la encefalomielitis autoinmune experimental (EAE), la presencia de CXCL13 se ha asociado con la aparición de estructuras similares a los folículos de células B (Magliozzi et al., 2004).

Por otra parte, si tenemos en cuenta que la inflamación crónica propia de las formas progresivas suele tener lugar en el contexto de una BHE relativamente intacta (Reynolds et al., 2011), no sería extraño que determinados marcadores de inflamación, sobre todo si provienen de la

circulación sistémica, se observaran, en LCR, en concentraciones mucho menores entre los pacientes con EM progresiva que entre los pacientes con EM en estadios más precoces, que presentan, con mayor frecuencia, rotura de la BHE (Reynolds et al., 2011). El hecho de que en el estudio de Sellebjerg et al. (2009) las concentraciones de CXCL13 disminuyeran drásticamente en aquellos pacientes con EMRR que recibieron corticoides pero sobre todo natalizumab, cuyo principal mecanismo de acción es impedir la entrada de linfocitos T al SNC, células productoras de CXCL13 (Ley et al., 2007), abre la posibilidad de que tal expresión de CXCL13 tuviese, efectivamente, un origen esencialmente extratecal.

En cuanto a otros marcadores, un estudio encontró, en pacientes con EMPP, niveles séricos significativamente reducidos de MMP-9, proteína implicada en la migración de células inflamatorias al SNC (Lukes et al., 1999) en comparación con pacientes con EMRR (Sastre-Garriga et al., 2004a). Este hallazgo iría a favor de la existencia de una BHE menos permeable en formas progresivas que en formas remitentes recurrentes de EM, como ha sido descrito ya previamente (Reynolds et al., 2011). En cuanto a otras moléculas también relacionadas con la adhesión celular, como el ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular 1), aunque se han hallado diferencias entre la EMPP y otros subtipos de la enfermedad (Ukkonen et al., 2007), se necesitan más estudios que confirmen los datos descritos.

Así pues, a día de hoy, sobre todo, lo que se ha visto es que las formas progresivas podrían tener un perfil de citoquinas y moléculas de adhesión diferente de las formas remitentes recurrentes, especialmente por su condición de ser menos inflamatorias y de poseer, de forma característica, un tipo de inflamación crónica que tiene lugar en el SNC tras una BHE prácticamente intacta. No obstante, no se conoce un perfil de citoquinas, quimiocinas y moléculas de adhesión que sea específico para la EMPP (Martinez-Caceres et al., 2002; Miller and Leary, 2007; Ukkonen et al., 2007).

## 8. RM cerebral

### Parámetros relacionados con las lesiones visibles

Numerosos estudios han mostrado un menor número de lesiones visibles en secuencias T2 en pacientes con EMPP, cuyas lesiones además son más pequeñas, que en los pacientes con otros subtipos de la enfermedad (Thompson et al., 1989; Thompson et al., 1990). El número de lesiones activas, es decir, lesiones nuevas, agrandadas o realizadas tras la administración de contraste, es también menor en la EMPP (Thompson et al., 1991; Thompson et al., 1997; Thompson et al., 1989), sugiriendo que las diferencias entre subtipos de EM son, por lo menos, cuantitativas (Filippi et al., 1995). Sin embargo, a pesar del bajo grado de inflamación en la EMPP, ésta es importante a la hora de determinar el aumento de la discapacidad tanto motora como cognitiva, especialmente si se da en etapas precoces de la enfermedad (Ingle et al., 2005; Ingle et al., 2002; Penny et al., 2010; Sastre-Garriga et al., 2005c; Tur et al., 2011a). Con el tiempo, tanto la actividad inflamatoria en la EMPP (Khaleeli et al., 2010), como su capacidad para predecir el aumento de la discapacidad (Khaleeli et al., 2008b), disminuyen. Entonces, dicho aumento de la discapacidad pasa a ser explicado por el daño en el tejido de apariencia normal, que incluiría el daño en el tejido cortical, no detectable mediante secuencias convencionales de RM (Khaleeli et al., 2007b; Khaleeli et al., 2008a; Tur et al., 2011a). Más recientemente, se ha sugerido que la localización de las lesiones en etapas iniciales de la enfermedad puede ser determinante a la hora de definir la evolución clínica posterior, incluso de forma más importante que el volumen de lesiones (Bodini et al., 2010). En este sentido, las lesiones localizadas en el tracto cortico-espinal serían aquellas que comportan un peor pronóstico a nivel motor (Bodini et al., 2010).

Las lesiones hipointensas en T1, llamadas agujeros negros, reflejan pérdida axonal (Barkhof et al., 1998; van, I et al., 2010). Aunque parecen ser menos frecuentes en la EMPP que en la EM de inicio en brotes (McDonnell et al., 2003), se ha sugerido que la proporción de lesiones visibles en T2 que se convierten en agujeros negros podría ser mayor en la EMPP que en otros

subtipos (McDonnell et al., 2003).

A pesar de que las técnicas más convencionales de RM nos han ayudado a entender los mecanismos patológicos que ocurren en la EMPP, ninguna de ellas ha sido capaz de predecir y reflejar de forma satisfactoria la progresión de la discapacidad a largo plazo (Khaleeli et al., 2007b; Khaleeli et al., 2008a; Sastre-Garriga et al., 2005c; Tur et al., 2011a). Por este motivo, las técnicas no convencionales de RM o técnicas cuantitativas de RM, se han ido utilizando cada vez con más frecuencia, permitiéndonos aumentar nuestro conocimiento de la fisiopatología de la EMPP.

### Medida de la atrofia

Entre las técnicas no convencionales de RM, aquellas relacionadas con la medida de la atrofia han sido las que más se han usado. La atrofia cerebral está presente en todos los subtipos de EM y en todos los estadios de la enfermedad y se cree que puede ocurrir, por lo menos parcialmente, independientemente de la presencia de lesiones visibles (Khaleeli et al., 2007a; Miller et al., 2002). Tanto el volumen de SB como el de SG se ha visto que están reducidos en fases iniciales de la EMPP cuando se ha comparado con controles (Sastre-Garriga et al., 2004b). Sin embargo, mientras la presencia de un volumen bajo de SB (Sastre-Garriga et al., 2004b) y la pérdida de volumen cerebral global (Sastre-Garriga et al., 2005a) a lo largo del tiempo están íntimamente relacionados con la actividad inflamatoria en momentos iniciales de la enfermedad, la pérdida de SG a lo largo del tiempo ocurre -por lo menos parcialmente- independientemente de dicha actividad inflamatoria (Riccitelli et al., 2010; Sastre-Garriga et al., 2005a). Adicionalmente, se ha encontrado que esta pérdida de SG, que tiene lugar en la EMPP a lo largo del tiempo, es más acentuada que la de la SB (Sastre-Garriga et al., 2005a) y ocurre predominantemente en la SG profunda (Ingle et al., 2003; Sepulcre et al., 2006). Asimismo se ha sugerido que la pérdida de volumen de SB podría seguir también un patrón específico en la EMPP (Sampat et al., 2009).

### Imagen por transferencia de magnetización

Los parámetros derivados del ratio de transferencia de magnetización (MTR, del inglés *Magnetization Transfer Ratio*), obtenidos mediante la técnica de imagen por transferencia de magnetización (MTI, del inglés *Magnetization Transfer Imaging*), reflejan de forma indirecta la densidad macromolecular y su reducción se considera que corresponde a la desmielinización y la pérdida axonal (Schmierer et al., 2004; van Waesberghe et al., 1999). Estudios transversales han mostrado diferencias significativas en cuanto al MTR de SBAN y SG entre controles y pacientes con EMPP establecida (Dehmeshki et al., 2003; Rovaris et al., 2008) y temprana (i.e. menos de cinco años desde el inicio de los síntomas) (Ramio-Torrenta et al., 2006). Además, un estudio transversal reciente en una cohorte de EMPP establecida, mostró que niveles bajos de MTR en SG estaban relacionados con un peor rendimiento cognitivo, tanto a nivel global como en lo referente a las funciones ejecutivas (Tur et al., 2011c), señalando la importancia de la integridad de la SG para mantener las facultades cognitivas en estos pacientes.

Estudios longitudinales han puesto también de manifiesto la utilidad de la imagen por MTR a la hora de predecir y reflejar la progresión de la discapacidad en la EMPP, especialmente en momentos iniciales de la enfermedad. En una serie de trabajos realizados con una cohorte de EMPP temprana se vio que niveles bajos de MTR en la SBAN en fases iniciales de la enfermedad predecían un mayor aumento de la discapacidad al año de seguimiento (Khaleeli et al., 2007b) mientras que niveles bajos de MTR en la SG predecían un mayor aumento de la discapacidad a los tres (Khaleeli et al., 2008a) y cinco (Tur et al., 2011a) años después de iniciarse el estudio. Sin embargo, fue la combinación de volumen de lesiones en T2 y bajos valores de MTR en SG, ambos en el momento basal, lo que mejor predijo el aumento de la discapacidad a los cinco años (Tur et al., 2011a).

## Imagen por tensor de difusión

La imagen por tensor de difusión (DTI, del inglés *Diffusion-Tensor Imaging*) permite el estudio de las alteraciones tisulares cerebrales mediante la medida del movimiento aleatorio (difusión) de las moléculas de agua a través de dos parámetros, la difusión media (MD, del inglés *Mean Diffusivity*), un valor promedio de la capacidad de difusión de las moléculas de agua en todas las direcciones del espacio y cuyo incremento refleja destrucción tisular, y la anisotropía fraccional (FA, del inglés *Fractional Anisotropy*), que nos informa de la direccionalidad de la difusión de las moléculas de agua, reflejando indirectamente la integridad de los axones (Basser and Pierpaoli, 1996). La DTI ha sido ampliamente utilizada en la EMPP, donde ha sido capaz de detectar cambios estructurales en el tejido de apariencia normal cuando se ha comparado con el de los controles (Ceccarelli et al., 2009; Rocca et al., 2003; Rovaris et al., 2002). La DTI también ha sido útil a la hora de reflejar los cambios ocurridos en la SG a lo largo del tiempo, que son independientes del aumento del volumen de lesiones y de la pérdida de volumen tisular (Rovaris et al., 2005b). Además, en un estudio longitudinal se vio que aquellos pacientes con una mayor MD de la SG a nivel basal experimentaban un mayor incremento de la discapacidad en los siguientes cinco años (Rovaris et al., 2006).

De forma adicional, la DTI se ha utilizado para obtener información de la conectividad anatómica en el cerebro a través de la técnica llamada tractografía, que utiliza la difusión anisotrópica del agua en los tractos de SB para delinearlos (Smith et al., 2006). En la EMPP, no solo se han hallado alteraciones en los principales tractos de la SB (Bodini et al., 2009; Ceccarelli et al., 2010; Ceccarelli et al., 2009), sino que además éstas se han asociado con la presencia de atrofia en la SG adyacente a los tractos dañados, sugiriendo que estos dos procesos están ligados (Bodini et al., 2009). Lo que es más importante aquí es que el daño producido en los principales tractos de la SB ha resultado ser clínicamente elocuente (Bodini et al., 2009; Rocca et al., 2010c). En esta línea, recientemente se ha sabido que la afectación de los principales tractos de la SB en etapas muy precoces de la EMPP, concretamente la

afectación del cuerpo caloso, predice una peor evolución clínica durante los siguientes cinco años de seguimiento. En este estudio, realizado en una cohorte de 31 pacientes con EMPP temprana, aquellos individuos con niveles más bajos de FA en el esplenio del cuerpo caloso en el momento basal presentaron un mayor incremento del EDSS durante los cinco años posteriores. Asimismo, aquellos pacientes con una media más baja de FA a lo largo de todo el cuerpo caloso en el momento basal, presentaron un mayor deterioro en los cinco años siguientes en cuanto a memoria verbal, atención y velocidad de procesamiento de la información y funciones ejecutivas (Bodini et al., 2012).

### Espectroscopía por resonancia magnética

Esta es probablemente la técnica de RM que ofrece una mayor especificidad patológica ya que permite la cuantificación *in vivo* de los metabolitos más abundantes del cerebro (Chard et al., 2002; Rovaris et al., 2005a; Sastre-Garriga et al., 2005b). En la EMPP se han observado reducciones en el N-acetil aspartato (NAA) de la SBAN y de la SG (Rovaris et al., 2005a; Sastre-Garriga et al., 2005b; Sijens et al., 2006), reflejando bien una pérdida axonal o una disfunción neuronal, probablemente secundaria a un metabolismo mitocondrial alterado (Ciccarelli et al., 2010a; Moffett et al., 2007). Estas alteraciones en el NAA, que parecen ocurrir parcialmente independientes de la carga de lesiones y de la pérdida de volumen tisular (Rovaris et al., 2005a), son clínicamente relevantes, tal como sugirió un estudio hecho con EMPP de reciente diagnóstico en el que las reducciones del NAA de la SG cortical se asociaron a una mayor discapacidad (Sastre-Garriga et al., 2005b).

La alteración de otros metabolitos también se ha visto que puede ser clínicamente relevante en la EMPP. Por ejemplo, concentraciones elevadas de mioinositol en la SBAN, indicativas de astrogliosis, se han asociado a una mayor discapacidad (Sastre-Garriga et al., 2005b). Más recientemente, en un estudio que analizaba las concentraciones de metabolitos en el tracto cortico-espinal cerebral se vio que aquellos pacientes con menores concentraciones de colina y creatina presentaban un grado más alto de discapacidad (Tur et al.,

2011d).

En cuanto a los estudios longitudinales con esta técnica de RM, a día de hoy, ninguno de ellos ha sido concluyente (Sajja et al., 2008).

### Resonancia magnética funcional

Esta técnica de RM nos brinda la oportunidad de estudiar la neuroplasticidad cerebral (Ceccarelli et al., 2010; Ciccarelli et al., 2006; Rocca et al., 2010b). El fenómeno de reorganización cortical, que refleja plasticidad cortical y que ha sido detectada incluso en los estadios más precoces de la EM de inicio en brotes (Rocca et al., 2005), parece jugar un importante papel en el retraso de la aparición de síntomas tanto motores (Ciccarelli et al., 2006) como cognitivos (Rocca et al., 2010b). De la misma manera, el fallo de estos mecanismos de reorganización cortical parece estar relacionado con la aparición de discapacidad permanente (Ciccarelli et al., 2006; Rocca et al., 2010b; Rocca et al., 2010c).

### Lesiones corticales

Hasta la introducción de las secuencias DIR (Turetschek et al., 1998) las lesiones corticales habían pasado totalmente inadvertidas. Estas lesiones son frecuentes en la EMPP y se correlacionan con el grado de discapacidad (Calabrese et al., 2009b). No obstante, dado que la cantidad de lesiones que pueden ser detectadas con esta técnica es muy inferior todavía a la cantidad de lesiones detectadas mediante estudios post-mortem (Calabrese et al., 2010b; Schmierer et al., 2010; Seewann et al., 2012), son necesarias más investigaciones para conocer su verdadero significado clínico.

## 9. RM medular

### Parámetros relacionados con las lesiones visibles

A diferencia de las lesiones visibles en secuencias T2 cerebrales, algunos autores han descrito un número similar de lesiones medulares en todos los subtipos de EM (Kidd et al., 1996; Nijeholt et al., 1998), así como una similar distribución de las mismas (Thompson et al., 1990). No obstante, esto no ha sido corroborado en otros estudios, que han reportado un número inferior de lesiones en la EMPP que en la EMSP (Filippi et al., 2000; Rovaris et al., 2001). Por ejemplo, un trabajo llevado a cabo con 99 pacientes afectados de EMPP y 36 afectados de EMSP mostró que los pacientes con formas primarias progresivas tenían una carga de lesiones significativamente más baja que los pacientes con formas secundarias progresivas (Rovaris et al., 2001).

Lo que parece más claro es que en la EMPP, otros parámetros diferentes de estas lesiones visibles parecen reflejar de forma más precisa la progresión clínica (Kidd et al., 1998; Rocca et al., 2011; Stevenson et al., 1999). De hecho, en el estudio de Rovaris y colaboradores (2001), mientras las cargas lesionales de los pacientes con EMPP fueron significativamente menores que las de los pacientes con EMSP, el daño difuso en el tejido no lesional fue equiparable entre ambos grupos.

Así pues, cuando nos ceñimos únicamente a las lesiones visibles, podemos hablar de que en la EMPP se da una clara disociación clínico-radiológica. En este sentido, recientemente se ha publicado un trabajo que podría representar quizás la forma más extrema de esta disociación. En él los autores describen una serie de 7 pacientes que, tras desarrollar un curso clínico de EMPP, en sus RM medulares tan solo se observó, a lo largo de todo el seguimiento (de una mediana de 3 años [rango 2-27]), una única lesión inflamatoria-desmielinizante medular o troncoencefálica, habiéndose descartado otras causas de afectación neurológica o mielopatía progresiva diferentes de la EMPP (Schmalstieg et al., 2012).

En cuanto a la presencia de agujeros negros (lesiones hipointensas en secuencias T1) en la médula espinal, los resultados de los trabajos publicados

son más controvertidos (Nijeholt et al., 1998; Stevenson et al., 2000). No obstante, sí parece haber un aumento, a lo largo del tiempo, de las lesiones hipointensas en T1 en la médula espinal de los pacientes con EMPP, pudiendo ser, su ritmo de aumento, incluso mayor que el aumento de las lesiones hiperintensas en T2 (Stevenson et al., 2000).

### Medida de la atrofia

En 1996 se publicó un método de RM reproducible para cuantificar la atrofia de la médula espinal (Losseff et al., 1996). De forma más reciente, otras secuencias, éstas volumétricas, se han utilizado también con este propósito (Laule et al., 2010).

En la EMPP, a diferencia de la EM de inicio en brotes, se ha detectado atrofia medular incluso en estadios muy tempranos de la enfermedad (Bieniek et al., 2006). Además, si bien la atrofia medular se ha asociado con la aparición de discapacidad irreversible en todos los subtipos de EM (Furby et al., 2008; Stevenson et al., 1998), esta asociación parece mucho más evidente en la EMPP (Kidd et al., 1996; Laule et al., 2010; Rovaris et al., 2008).

En cuanto a la comparación entre la EMPP y otros subtipos de EM un estudio encontró que los pacientes con EMPP tenían reducciones más acusadas del área medular cervical a lo largo del tiempo que las de otros subtipos de EM (Stevenson et al., 1998), mientras que otro estudio realizado con diferentes subtipos no encontró diferencias en cuanto a los ritmos de reducción del área medular cervical (Agosta et al., 2007).

Finalmente, estudios longitudinales en diferentes cohortes de pacientes con EMPP han revelado que los cambios acontecidos en el área medular cervical reflejan el aumento concurrente de la discapacidad (Ingle et al., 2003; Ingle et al., 2002; Stevenson et al., 2000), incluso cuando se han analizado períodos largos de estudio (Ingle et al., 2003).

## Otras técnicas de RM cuantitativa

Un estudio transversal con MTI mostró que los pacientes con EMPP tenían alteraciones mayores que los pacientes con otros subtipos de la enfermedad y que esas alteraciones predecían el aumento de la discapacidad en el futuro (Filippi et al., 2000). No obstante, esto no ha sido corroborado en trabajos posteriores (Rovaris et al., 2000; Rovaris et al., 2001). Otro estudio llevado a cabo con la técnica de DTI puso de manifiesto alteraciones medulares más severas en la EMPP que en otros subtipos de la enfermedad (Agosta et al., 2007), aunque son necesarios más estudios para conocer la repercusión clínica de estas alteraciones (Agosta et al., 2005). Finalmente, estudios de RM funcional en la médula espinal han propuesto que la sobre-activación neuronal puede también contribuir a la aparición de discapacidad irreversible en la EMPP (Agosta et al., 2009).

## **10. Otros datos paraclínicos**

La mayoría de pacientes con EMPP presenta bandas oligoclonales (BOC) de inmunoglobulina G (IgG) en el LCR de forma exclusiva (ausentes en suero) o bien presenta una cantidad de BOC de IgG mayor en el LCR que en el suero. Así, con dos bandas extra en el LCR ya se considera que hay presencia de BOC en LCR (decimos que hay 'BOC positivas en LCR' o simplemente 'LCR positivo'). Asimismo, puede también hallarse, en el LCR de estos pacientes, una elevación del índice IgG/albúmina. Estas alteraciones, que reflejan una síntesis intratecal de Ig, son relativamente específicas de la EM y constituyen uno de los pilares básicos de los criterios diagnósticos de la EMPP (McDonald et al., 2001; Montalban et al., 2009a; Polman et al., 2011; Polman et al., 2005; Thompson et al., 2000). En cuanto a otras inmunoglobulinas, mientras en la EM de inicio en brotes la presencia de BOC de IgM se ha asociado a un peor pronóstico, esto no se ha observado en la EMPP (Sola et al., 2011).

En relación a los potenciales evocados visuales (PEV), se ha sugerido que los pacientes con EMPP tienen menos alteraciones y que estas son más simétricas que en las otras formas de la enfermedad. Las alteraciones

consisten en un retraso de la respuesta (latencias alargadas) (Miller and Leary, 2007).

La tomografía de coherencia óptica (OCT, del inglés *Optical Coherence Tomography*) es una nueva técnica reproducible (Cettomai et al., 2008) que sirve para analizar la capa de fibras nerviosas de la retina (RNFL, del inglés *Retinal Nerve Fibre Layer*) y el volumen macular, considerados como marcadores de lesión axonal de acceso fácil en pacientes con EM (Fisher et al., 2006). En la EM progresiva, y particularmente en la EMPP, donde los componentes degenerativos tales como la pérdida axonal son dominantes (Thompson et al., 1997), la OCT se nos muestra como una herramienta potencialmente muy válida para monitorizar el curso de la enfermedad (Pulicken et al., 2007). Sin embargo, los datos publicados hasta ahora nos muestran que las alteraciones en los parámetros de OCT están sobre todo presentes en la EMSP, especialmente si hay una historia previa de neuritis óptica, más que en la EMPP (Costello et al., 2010; Henderson et al., 2008; Saidha et al., 2011).

## **11. Criterios diagnósticos**

En 1983, Poser propuso por primera vez el término EM crónica progresiva, para la cual era necesario demostrar progresión clínica durante por lo menos seis meses, aunque no propuso ningunos criterios diagnósticos específicos para esta forma de la enfermedad (Poser et al., 1983). En 1996, Lublin y Reingold definieron por primera vez el término EMPP (Lublin and Reingold, 1996), aunque no fue hasta 1997 que los criterios se discutieron por primera vez por una Comisión Internacional, siendo finalmente publicados en el año 2000 (Thompson et al., 2000). En estos criterios diagnósticos los autores definieron tres categorías de certeza del diagnóstico, es decir, diagnóstico definitivo de EMPP, probable EMPP y posible EMPP, dependiendo del grado de evidencia paraclínica de la enfermedad que acompañara a un síndrome neurológico progresivo de por lo menos un año de duración, sin brotes ni remisiones, después de haber sido excluidas todas aquellas patologías que

también tienen un curso progresivo. La evidencia paraclínica de EM consistía en la presencia de lesiones en la RM ('RM positiva'), la presencia de alteraciones en los PEV y la presencia de BOC de IgG en el LCR ('LCR positivo') (**TABLA III-1**). La presencia de BOC de IgG en el LCR era obligatoria para el diagnóstico definitivo de EMPP y para el diagnóstico de probable EMPP (Thompson et al., 2000).

En el año 2000, la Comisión Internacional para el Diagnóstico de EM decidió integrar la RM en el esquema diagnóstico de la enfermedad, dando lugar de esta manera a una nueva versión de los criterios diagnósticos (de la EM en general), que finalmente fueron publicados en el año 2001 (conocidos como Criterios de McDonald) (McDonald et al., 2001). En lo que respecta al diagnóstico de EMPP solo se hicieron unos pocos cambios, relacionados todos con los requerimientos para poder hablar de diseminación en el espacio de la enfermedad. La principal diferencia entre los criterios del año 2000 y los del 2001 radica en que en estos últimos desaparecía la categoría de probable EMPP quedando solamente dos categorías de certeza, es decir, diagnóstico definitivo de EMPP y posible EMPP. Ambas categorías requerían la presencia de un mínimo daño visible en la RM. Para la categoría de diagnóstico definitivo de EMPP se requería, además, la presencia de BOC de IgG en el LCR y/o el aumento del índice de IgG/albúmina (o índice de IgG) (McDonald et al., 2001) (**TABLA III-1**).

En el año 2005 la Comisión Internacional para el Diagnóstico de EM presentó las revisiones de los criterios de 2001, siendo estas revisiones publicadas ese mismo año (Polman et al., 2005). El diagnóstico de EMPP se hizo en base a la demostración de diseminación en tiempo, consistente en la presencia de por lo menos un año de progresión, y en base a la demostración de diseminación en espacio, consistente en la presencia de dos de los siguientes criterios: 1) RM cerebral positiva; 2) RM medular positiva; 3) LCR positivo (**TABLA III-1**). Respecto a los criterios de 2001, esta nueva versión introdujo dos cambios principales: la categoría de posible EMPP desapareció y la presencia de BOC en el LCR (o el aumento del índice de IgG) dejó de considerarse necesario para el diagnóstico, lo que tuvo grandes implicaciones

desde el punto de vista práctico (Polman et al., 2005).

A lo largo de los años se ha hecho un gran esfuerzo para simplificar los criterios diagnósticos de la EM (Swanton et al., 2007), haciéndose esto extensivo a todas las formas de la enfermedad. En este sentido, en 2009, se publicó una nueva propuesta para el diagnóstico de la EMPP, con un claro carácter práctico (Montalban et al., 2009a). Esta propuesta se basó en la comparación de todos los criterios disponibles en aquel momento para definir la presencia de diseminación en espacio en la EM, incluyendo los criterios para las formas en brotes y las formas EMPP. Los autores concluyeron que no había ninguna evidencia para considerar de forma diferente a los pacientes con EMPP y a los pacientes con otras formas de la enfermedad, en cuanto a los criterios de diseminación en espacio (Montalban et al., 2009a). En base a esta nueva propuesta, en los criterios diagnósticos recientemente publicados (*'2010 Revisions to the McDonald Criteria'*), la Comisión Internacional para el Diagnóstico de la EM intentó mantener unos criterios de diseminación en espacio muy similares para todas las formas de la enfermedad (Polman et al., 2011) (**TABLA III-1**).

**TABLA III-1. Evolución de los criterios diagnósticos de EMPP a lo largo del tiempo**

Thompson et al. Ann Neurol 2000	McDonald et al. Ann Neurol 2001	Polman et al. Ann Neurol 2005	Polman et al. Ann Neurol 2011
<b>EMPP (diagnóstico definitivo)</b>	<b>EMPP</b>	<b>EMPP</b>	<b>EMPP</b>
RM positiva <sup>a</sup> o RM equívoca <sup>b</sup> con PEV alargados  +  Progresión clínica durante un año mínimo  +  <b>LCR positivo<sup>c</sup></b>	<b>DISEMINACIÓN EN ESPACIO</b> demostrada por: 1) ≥ 9 lesiones cerebrales o 2) ≥ 2 lesiones medular o 3) 4-8 lesiones cerebrales + una lesión medular o PEV alargados + 4-8 lesiones cerebrales o PEV alargados + <4 lesiones cerebrales + una lesión medular  + <b>DISEMINACIÓN EN TIEMPO</b> demostrada por: nuevas lesiones o Progresión clínica durante un año mínimo  + <b>LCR positivo<sup>e</sup></b>	<b>SE CUMPLEN 2 DE LOS SIGUIENTES CRITERIOS:</b>  1) RM cerebral positiva (≥ 9 lesiones o 4-8 lesiones + PEV alargados)  2) RM medular positiva (≥ 2 lesiones)  3) <b>LCR positivo<sup>e</sup></b>  +  Progresión clínica durante un año mínimo (evaluada retrospectiva o prospectivamente)	<b>SE CUMPLEN 2 DE LOS SIGUIENTES CRITERIOS:</b>  1) Diseminación en espacio en cerebro: ≥ 1 lesiones en T2 en ≥ 1 regiones típicas de EM <sup>f</sup>  2) Diseminación en espacio en médula: ≥ 2 lesiones en T2  3) <b>LCR positivo<sup>e</sup></b>  +  Progresión clínica durante un año mínimo (evaluada retrospectiva o prospectivamente)
<b>Probable EMPP</b>			
<b>ESCENARIO 1:</b> RM equívoca <sup>b</sup> o PEV alargados  +  Progresión clínica durante un año mínimo  +  <b>LCR positivo<sup>c</sup></b>			
<b>ESCENARIO 2:</b> RM positiva <sup>a</sup> o RM equívoca <sup>b</sup> con PEV alargados pero sin evidencia de LCR positivo o con LCR negativo <sup>d</sup>  +  Progresión clínica durante un año mínimo			
<b>Posible EMPP</b>	<b>Posible EMPP</b>		
RM equívoca <sup>b</sup> o PEV alargados  +  Progresión clínica durante un año mínimo	Cuando los criterios de arriba no se cumplen todos		

a: ≥9 lesiones cerebrales o ≥2 lesiones medulares o 4-8 lesiones cerebrales +lesión medular; b: 4-8 lesiones cerebrales sin lesiones medulares o una lesión medular sola (o con menos de 4 lesiones cerebrales); c: presencia de BOC de IgG en LCR; d: ausencia de BOC de IgG en LCR; e: presencia de BOC de IgG en LCR y/o aumento del índice de IgG/albúmina; f: región periventricular, yuxtacortical o infratentorial. *Abreviaturas:* BOC: bandas oligoclonales; LCR: líquido cefalorraquídeo; PEV: potenciales evocados visuales; RM: resonancia magnética.

## 12. Tratamientos y ensayos clínicos

A día de hoy, desgraciadamente, ningún tratamiento ha demostrado ser eficaz en retrasar el aumento de la discapacidad irreversible (**TABLA III-2** y **TABLA III-3**). En el año 2002 se publicaron los resultados de un ensayo clínico con riluzole oral, un fármaco que bloquea los canales de sodio dependientes de voltaje e inhibe la liberación de glutamato, en pacientes con EMPP. Se incluyeron 16 pacientes, ninguno de ellos recibió tratamiento durante el primer año y todos ellos recibieron 50 mg de riluzole dos veces al día durante el segundo año. No se observaron efectos a nivel clínico pero sí se observó, dentro de los parámetros de RM, una estabilización del área medular cervical (Kalkers et al., 2002).

Un año más tarde se publicaron los resultados de un ensayo clínico unicéntrico con IFN $\beta$ -1a intramuscular (30  $\mu$ g y 60  $\mu$ g), también en pacientes con EMPP (Leary et al., 2003). El tratamiento fue bien tolerado pero no se obtuvieron beneficios en lo referente al objetivo primario del estudio, el tiempo hasta una progresión mantenida de la discapacidad, aunque se observó un cierto indicio de eficacia clínica, reflejado en el test llamado *Nine Hole Peg Test* (NHPT). Además, se observó un aumento en el tamaño ventricular en aquellos pacientes que recibieron la dosis más alta de fármaco (60 $\mu$ g) en comparación al resto de grupos de tratamiento, probablemente debido a una mayor pseudoatrofia asociada a un efecto antiinflamatorio más importante en el grupo que recibió la dosis más alta (Leary et al., 2003).

Algo más recientemente, en el año 2004, se publicó el diseño de otro ensayo clínico, en este caso multicéntrico, en el que se pretendía evaluar la eficacia de la mitoxantrona intravenosa en la EMPP (Stuve et al., 2004). Los resultados de este ensayo, en el que participaron 61 pacientes, todavía no se han publicado. No obstante, en un estudio posterior se sugirió que el tratamiento con mitoxantrona parecía ser incapaz de provocar cambios relevantes en el sistema inmunitario de pacientes con EMPP (Pelfrey et al., 2006).

**TABLA III-2. Principales ensayos clínicos en la EMPP: objetivos primarios**

Autores	Grupos de tratamiento y duración del EC	Centros implicados Número pacientes (N)	Objetivo primario	Resultados en cuanto al objetivo primario
<b>Kalkers et al. MSJ 2002</b>	Riluzole oral 2 x 50 mg cada día, durante el 2º año del EC (1 solo brazo), durante 2 años	UNICÉNTRICO Amsterdam N=16, 7H/9M	Cambio en el área transversal de médula	Estabilización en diámetro medular durante el 2º año (con riluzole)
<b>Leary et al. Neurology 2003</b>	IFNb-1ª IM semanal 30 µg, 60 µg, o placebo, durante 2 años	UNICÉNTRICO London <i>Queen Square</i> (RU) N=50, 32H/18M	Tiempo hasta progresión mantenida de la discapacidad <sup>a</sup>	Negativos
<b>Stüve et al. MSJ 2004</b>	Mitoxantrona IV 12 mg/m <sup>2</sup> cada 3 meses (dosis máxima acumulada: 140 mg/m <sup>2</sup> ) o placebo, durante 2 años	MULTICÉNTRICO San Francisco, Seattle, y Cleveland (EEUU) N=61, 29H/32M	Tiempo hasta demostrar un fallo terapéutico mantenido, usando una medida clínica compuesta para evaluar la discapacidad <sup>b</sup>	Resultados no publicados
<b>Pöhlau et al. MSJ 2007</b>	IGIV 0,4 g/Kg/mes o placebo, durante 2 años	MULTICÉNTRICO Centros de Alemania y Suiza N=231 (34 EMPP, 197 EMSP), 95H/136M	Tiempo hasta progresión mantenida de la discapacidad <sup>c</sup> Mejoría de la discapacidad <sup>d</sup>	El análisis de grupos separados (EMPP y EMSP) no mostró efectos beneficiosos
<b>Wolinsky et al. Ann Neurol 2007</b>	Acetato de glatirámero SC (AG) 20 mg/día o placebo, durante 3 años	MULTICÉNTRICO Centros de Canadá, Francia, RU y EEUU N=943, 460H/483M	Tiempo hasta progresión mantenida de la discapacidad <sup>a</sup>	Negativos
<b>Hawker et al. Ann Neurol 2009</b>	Rituximab IV 1000 mg cada 24 semanas o placebo, durante 96 semanas (el estudio de seguridad incluyó 122 semanas)	MULTICÉNTRICO Centros de Canadá y EEUU N=439, 218H/221M	Tiempo hasta progresión mantenida de la discapacidad <sup>e</sup>	Negativos
<b>Montalban et al. MSJ 2009</b>	IFNb-1b SC 8 MIU a días alternos, durante 2 años	UNICÉNTRICO <i>Unitat de Neuroimmunologia Clínica</i> (UNiC, ahora CEM-Cat), Barcelona (Spain) N=73, 37H/36M	Tiempo hasta progresión mantenida de la discapacidad <sup>a</sup>	Negativos
<b>Ensayo clínico INFORMS®</b>	FTY720 oral 0,5 mg diarios o placebo	MULTICÉNTRICO N prevista=654	Tiempo hasta progresión mantenida de la discapacidad <sup>f</sup>	En curso
<b>Ensayo clínico ORATORIO®</b>	Ocrelizumab IV 600 mg cada 24 semanas o placebo	MULTICÉNTRICO N prevista=630	Tiempo hasta progresión mantenida de la discapacidad <sup>e</sup>	En curso

**a:** Se describe tal como está definido en las publicaciones; **a:** Progresión definida como incremento de  $\geq 1,0$  puntos del EDSS si EDSS basal  $\leq 5,0$ , o  $\geq 0,5$  puntos si EDSS basal  $\geq 5,5$ . Para considerar progresión mantenida, esta debía ser confirmada a los 3 meses; **b:** Medida compuesta de la discapacidad: a) incremento de  $\geq 1$  punto del EDSS si EDSS basal: 3,5-5,5, o  $\geq 0,5$  puntos si EDSS basal: 6,0-6,5; o b) empeoramiento del NHPT en  $\geq 20\%$  respecto a puntuación basal para cualquiera de las manos. El empeoramiento debía ser confirmado a los 3 meses; **c:** Progresión definida como: incremento de  $\geq 1,0$  puntos del EDSS si EDSS basal  $\leq 5,0$ , o  $\geq 0,5$  puntos si EDSS basal  $\geq 5,5$ . Para considerar progresión mantenida, esta debía ser confirmada a las 16 semanas; **d:** Para definir mejoría se comparaba el EDSS inicial con cualquier puntuación del EDSS más allá de las 16 semanas desde el inicio del ensayo ( $\geq 5$  infusiones de tratamiento). Si en algún momento se identificaba un EDSS por debajo del EDSS inicial se consideraba mejoría; **e:** Progresión definida como: incremento de  $\geq 1,0$  puntos del EDSS si EDSS basal:  $\leq 5,5$ , o  $\geq 0,5$  puntos si EDSS basal  $> 5,5$ . Progresión mantenida: confirmada a los 3 meses; **f:** Progresión definida como: a) empeoramiento del TWT (en segundos) de  $\geq 20\%$  desde el momento basal; o b) incremento de  $\geq 1,0$  puntos del EDSS si EDSS basal: 3,5-5,0, o incremento de  $\geq 0,5$  puntos si EDSS basal 5,5-6,0; o c) empeoramiento del NHPT (en segundos) de  $\geq 20\%$  desde el momento basal. Para considerar progresión mantenida, esta debía ser confirmada a los 3 meses. *Abreviaturas:* EC: ensayo clínico; EDSS: *Expanded Disability Status Scale*; EEUU: Estados Unidos; EMPP: esclerosis múltiple primaria progresiva; EMSP: esclerosis múltiple secundaria progresiva; H: hombres; IFNb: interferón beta; IM: intramuscular; IV: intravenoso; M: mujeres; N: número de pacientes; NHPT: *Nine Hole Peg Test*; RU: Reino Unido; SC: subcutáneo; TWT: *Timed 25-Foot Walk Test*;

En base a los indicios observados, en un ensayo clínico a nivel europeo, de que las inmunoglobulinas intravenosas (IGIV), tratamiento de segunda línea en las formas EMRR, podían llegar a tener un efecto beneficioso sobre la atrofia cerebral en formas progresivas de la EM (Hommes et al., 2004), se decidió llevar a cabo otro nuevo ensayo clínico con IGIV (0,4g/Kg/mes), pero esta vez incluyendo también pacientes con EMPP (Pohlau et al., 2007). Los resultados de este ensayo multicéntrico mostraron un discreto efecto beneficioso en cuanto a la progresión de la discapacidad pero solo en el subgrupo de EMPP (Pohlau et al., 2007). El bajo número de participantes, el abandono del tratamiento de forma prematura por más de la mitad de los pacientes y la ausencia de beneficios en el grupo de EMSP fueron hechos que obligaron a tomar con precaución los discretos indicios de eficacia de las IGIV observados en la EMPP (Pohlau et al., 2007).

También en 2007 se publicaron los resultados del estudio PROMiSe, un estudio multicéntrico en el que se evaluaban los efectos del acetato de glatirámico (AG) subcutáneo (20 mg) sobre la progresión clínica en un grupo de 943 pacientes con EMPP. El estudio PROMiSe representa el ensayo en pacientes con EMPP con el mayor número de participantes hasta la fecha. Desafortunadamente, no se observaron diferencias entre los grupos de tratamiento en lo referente al objetivo primario del ensayo (Wolinsky et al., 2007). Aunque en un primer análisis de los datos se apuntó que los pacientes varones que habían recibido AG parecían haber presentado una evolución clínica significativamente más favorable que aquellos pacientes varones que habían recibido placebo, esto no pudo ser confirmado en un análisis posterior (Wolinsky et al., 2009). Los resultados negativos del estudio PROMiSe se atribuyeron, por lo menos parcialmente, a un ritmo de progresión de la discapacidad inesperadamente lento en ambos grupos de tratamiento. Se sugirió entonces que para poder observar efectos derivados del tratamiento en los ensayos clínicos con EMPP eran necesarios estudios que contemplaran períodos más largos de tiempo (Wolinsky et al., 2007).

**TABLA III-3. Ensayos clínicos en EMPP: objetivos secundarios**

Autores <sup>a</sup>	Objetivos secundarios	Resultados en cuanto a los objetivos secundarios <sup>b</sup>	Comentarios y limitaciones
<b>Kalkers et al. MSJ 2002</b>	Cambios en VLT1 y VLT2	Durante el año de tratamiento continuó el aumento de VLT2	No había grupo placebo; no se hizo análisis estadístico formal
<b>Leary et al. Neurology 2003</b>	Cambios en TWT, NHPT; VLT1 y VLT2, atrofia cerebral y espinal	IFNb-1a 30µg: efectos beneficiosos en VLT2 (p=0.025); IFNb-1a 60µg: ratio mayor de agrandamiento ventricular (p=0.025)	Pseudoatrofia observada en el grupo IFNb-1 <sup>a</sup> 60µg
<b>Stüve et al. MSJ 2004</b>	Cambios en VLT1 y VLT2, atrofia cerebral, parámetros de MTR de todo el cerebro y parámetros de <sup>1</sup> H-MRS	Resultados no publicados todavía	En general, la mitoxantrona no parece capaz de provocar cambios relevantes a nivel inmunológico en la EMPP (Pelfrey J et al., Neuroimmunol 2006)
<b>Pöhlau et al. MSJ 2007</b>	% pacientes con progresión mantenida, tasa de brotes, evaluación de habilidades motoras finas, puntuaciones en escalas de depresión y calidad de vida; PEV;	Estudio combinado (EMSP+EMPP): % pacientes con progresión mantenida fue menor en el grupo IGIV (p=0.028); Análisis de grupos separados: IGIV solo fue eficaz en la EMPP (p=0.016)	51% de los participantes abandonaron prematuramente el estudio El objetivo primario solo fue significativo en el análisis combinado (EMSP+EMPP)
<b>Wolinsky et al. Ann Neurol 2007</b>	% pacientes libres de progresión, cambios en la puntuación del EDSS; cambios en el volumen de lesiones y en el número de lesiones Gd+	Resultados en cuanto a objetivos clínicos secundarios: negativos; cambios en número de lesiones Gd+ (durante 1er año): p=0,0022; cambios en VLT2 (durante 2º año): p=0,0026	EC parado tras un primer análisis de los datos disponibles en el que no se observaban beneficios de tratamiento; ratio de progresión inesperadamente bajo; posible efecto beneficioso en varones <sup>c</sup>
<b>Hawker et al. Ann Neurol 2009</b>	Cambios en VLT2 y en volumen cerebral total	Efecto beneficioso en VLT2 (p<0,001); no diferencias entre grupos en cuanto a cambios de volumen cerebral	Análisis de subgrupos: efecto clínico beneficioso en pacientes <51 años (p=0,010), pacientes con lesiones Gd+ (p=0,007) y pacientes <51 años con lesiones Gd+ (p=0,009).
<b>Montalban et al. MSJ 2009</b> <b>Tur et al. Arch Neurol 2011</b>	% pacientes con progresión, cambios clínicos desde el inicio del EC en cuanto a EDSS, TWT, PASAT, MSFC y test neuropsicológicos; lesiones activas <sup>d</sup> y cambios en VLT2, VLT1, atrofia cerebral, parámetros de MTR	Efectos beneficiosos en: MSFC (p=0,0356), VLT1 (p=0,0296) y VLT2 (p=0,0032), número de lesiones activas (p=0,0005) y % pacientes con lesiones activas (p=0.0102)	A los 5 años de finalizar EC se observaron efectos beneficiosos (en el grupo que recibió IFNb-1b) en NHPT, datos neuropsicológicos y medidas de atrofia; el aumento (y agrandamiento) de lesiones durante el EC se correlacionó con el aumento del EDSS en los siguientes 5 años.
<b>Ensayo clínico INFORMS®</b>	VLT1, VLT2, atrofia cerebral y espinal, parámetros de MTR	En curso	
<b>Ensayo clínico ORATORIO®</b>	Cambios en TWT; cambios en VLT2	En curso	

**a:** Ir a TABLA III-2 para ver los fármacos evaluados en cada ensayo; **b:** Se muestran los resultados más relevantes relacionados con los objetivos secundarios; **c:** Un análisis de espectroscopía por RM realizado posteriormente con una pequeña muestra de pacientes que participaron en el EC no mostró cambios a lo largo del estudio en cuanto a las concentraciones de metabolitos cerebrales, en ninguno de los 2 grupos de tratamiento (Sajja et al., 2008); **d:** Una lesión activa fue definida como una lesión (observada a los 24 meses) nueva o que había aumentado de tamaño respecto a la RM basal. *Abreviaturas:* EC: ensayo clínico; EDSS: *Expanded Disability Status Scale*; Gd+: lesiones realizadas tras administración de gadolinio; <sup>1</sup>H-MRS: espectroscopía por RM, del inglés *<sup>1</sup>H-Magnetic Resonance Spectroscopy*; IFNb-1a: interferón beta-1a; IFNb-1b: interferón beta-1b; IGIV: inmunoglobulinas intravenosas; MSFC: *Multiple Sclerosis Functional Composite*; MTR: ratio de transferencia de magnetización, del inglés *Magnetization Transfer Ratio*; NHPT: *Nine Hole Peg Test*; RM: resonancia magnética; TWT: *Timed 25-Foot Walk Test*; VLT1: volumen de lesiones en T1; VLT2: volumen de lesiones en T2.

Dos años más tarde fueron publicados los resultados de otro gran ensayo clínico multicéntrico llevado a cabo en pacientes con EMPP, esta vez con rituximab intravenoso (1000 mg cada 24 semanas), un anticuerpo monoclonal dirigido selectivamente contra las células B. Si bien el tratamiento no fue eficaz retrasando la progresión de la discapacidad, que era el objetivo principal del ensayo, un análisis de subgrupos mostró ciertos efectos beneficiosos en los pacientes más jóvenes y que presentaban una mayor actividad inflamatoria en la RM inicial (Hawker et al., 2009).

Ese mismo año se publicaron los resultados otro ensayo, en este caso unicéntrico, en el que se evaluaba la eficacia del IFN $\beta$ -1b subcutáneo (8 MIU a días alternos). No se observó ningún efecto beneficioso en cuanto al objetivo primario del estudio, que era la progresión mantenida de la discapacidad, pero se observaron efectos en la escala clínica compuesta MSFC (del inglés, *Multiple Sclerosis Functional Composite*) y en diversos parámetros de RM relacionados con la actividad inflamatoria (Montalban et al., 2009b). Tras estos resultados, se quiso evaluar nuevamente a la cohorte que había participado en el ensayo clínico, a los cinco años de la finalización del mismo. El objetivo de este estudio, que corresponde al tercer estudio de la presente tesis doctoral, fue investigar si los efectos producidos por el IFN $\beta$ -1b durante el ensayo habían dejado algún tipo de secuela en los pacientes. En este sentido, se observaron ciertos efectos beneficiosos, aunque muy modestos, en cuanto al NHPT, parámetros neuropsicológicos y parámetros de RM como la atrofia cerebral (Tur et al., 2011b). Más adelante se describen con detalle los resultados obtenidos en este último trabajo.

En conclusión, a pesar de los efectos beneficiosos observados en los parámetros de RM, ninguno de los fármacos probados en ensayos clínicos en pacientes con EMPP ha sido capaz de ralentizar la progresión de la discapacidad. Actualmente se están llevando a cabo varios ensayos con nuevas moléculas cuya eficacia en la EMRR ha sido ya demostrada. Es posible, pues, que el futuro próximo traiga cambios esperanzadores desde el punto de vista terapéutico.

### 13. Resumen

La EMPP es la forma menos frecuente de EM (ocurre en un 10-15% de los casos) pero es la que tiene peor pronóstico. Si bien la paraparesia espástica es su forma más frecuente de presentación, un cierto grado de deterioro cognitivo -que puede llegar a ser más invalidante que la discapacidad física- puede aparecer a lo largo de la enfermedad, hasta en un tercio de los pacientes. La complejidad de los procesos patológicos responsables de la afectación cognitiva se ha hecho patente en todos los estudios realizados, aunque es posible que el daño en la SG sea un elemento crucial en su desarrollo.

A nivel genético se han hallado algunas diferencias entre la EMPP y los otros subtipos de la enfermedad. No obstante, estas diferencias son escasas y no justifican que la EMPP sea considerada como una enfermedad aparte. Los estudios patológicos y de RM realizados hasta ahora muestran que la EMPP se caracteriza por presentar una menor inflamación y una más pronunciada neurodegeneración -que puede ocurrir como consecuencia de la inflamación, aguda o crónica, e independientemente de ella- que las formas en brotes. Si bien es posible que en la EMPP predomine la neurodegeneración que aparece independientemente de la inflamación, es también posible que el efecto nocivo de la inflamación sobre la degeneración sea más acusado en la EMPP que en otras formas de la enfermedad. En cualquier caso, en la EMPP tanto la neurodegeneración como la inflamación han demostrado ser cruciales en el desarrollo de discapacidad motora y cognitiva.

El diagnóstico de EMPP es todavía una tarea difícil. Sin embargo, la reciente simplificación de los criterios diagnósticos, donde se ha homogeneizado la forma de definir diseminación en espacio entre todos los subtipos de EM, y el hecho de que desde 2005 ya no sea obligatoria la presencia de BOC de IgG en el LCR para llegar al diagnóstico, facilitarán sin duda dicha tarea al neurólogo clínico. Ningún tratamiento ha demostrado ser eficaz para esta forma de la enfermedad. Sin embargo, los resultados de los ensayos clínicos hoy en marcha pueden cambiar drásticamente el sombrío panorama actual del tratamiento en la EMPP.



### III. HIPÓTESIS

Este proyecto de tesis doctoral se diseñó para dar respuesta a algunas de las principales incógnitas que atañen a la EMPP, siempre con el fin último de profundizar en los procesos inmunopatológicos que subyacen al aumento irreversible de la discapacidad y considerando la RM como herramienta fundamental para conocer tales procesos *in vivo*. Por ello, nos planteamos una serie de hipótesis que sirvieron como punto de partida para el desarrollo de los estudios que conforman este proyecto de tesis.

1. En primer lugar quisimos estudiar los cambios tisulares a nivel del SNC responsables de la aparición de deterioro cognitivo en la EMPP, centrándonos especialmente en el tejido que tiene una apariencia normal con las técnicas convencionales de RM. En este caso, nuestra hipótesis fue que la alteración de cada dominio cognitivo respondería, probablemente, a un daño tisular específico en el SNC. Asimismo, pensamos que existiría una relación cuantitativa entre el daño tisular y la afectación cognitiva. Es sabido que el rol de las lesiones visibles en la aparición de la discapacidad en la EMPP evolucionada es menor que en las formas de inicio en brotes. No obstante, pensamos que cuanto mayor fuese el volumen de lesiones, mayor sería el deterioro cognitivo.

2. En segundo lugar quisimos explorar la capacidad de las alteraciones tisulares acontecidas en el SNC en momentos muy precoces de la enfermedad para predecir la aparición de discapacidad a medio-largo plazo. Gracias a la literatura sabemos que, a día de hoy, las técnicas convencionales de RM, basadas esencialmente en la presencia de lesiones visibles, han logrado tan solo de forma parcial predecir qué pacientes van a presentar una peor evolución clínica. Así pues, referente a este segundo asunto, nuestra hipótesis fue que, si bien la carga de lesiones podría tener un efecto sobre el aumento de la discapacidad, sería probablemente el daño en el tejido de apariencia normal aquel que nos daría más información acerca de la evolución de los pacientes a medio-largo plazo. En la literatura cada vez hay más evidencias de que en las formas progresivas de EM, a medida que pasa el tiempo, el daño en la SG va

dominando el conjunto de alteraciones histopatológicas que se dan en el SNC y se convierte en uno de los principales responsables de la aparición de la discapacidad. Por ello, nos planteamos que quizás la presencia, ya desde momentos muy precoces de la enfermedad, de daño microscópico en la SG, podría también determinar una peor evolución clínica posterior. Según esta hipótesis, esos cambios microscópicos precoces en la SG podrían, de alguna manera, constituir un indicio de aquel daño que sabemos que posteriormente se establecerá en la SG de estos pacientes.

3. Finalmente, con los signos observados, a raíz de un ensayo clínico con IFN $\beta$ -1b que se llevó a cabo en nuestra unidad entre 1998 y 2000, de un posible, aunque modesto, efecto beneficioso de la intervención inmune en esta forma de la enfermedad, quisimos investigar si esos cambios que se habían producido en el grupo que recibió tratamiento durante el ensayo se mantenían años después de la intervención terapéutica. Para llevar a cabo este trabajo partimos de la premisa de que el sustrato patológico determina la sintomatología de la enfermedad y de que si somos capaces de cambiar dicho sustrato patológico, podemos estar en disposición, por lo menos desde un punto de vista teórico, de cambiar los acontecimientos clínicos posteriores. Además, este estudio debe entenderse en el contexto de la ausencia, a día de hoy, de tratamientos capaces de retrasar la aparición de discapacidad irreversible. Así, la hipótesis general de este tercer estudio fue que los cambios acontecidos a nivel tisular durante el ensayo clínico, dado que probablemente fueron clínicamente relevantes mientras duró la exposición al IFN $\beta$ -1b (hubo diferencias entre brazos terapéuticos en cuanto a las puntuaciones del MSFC), podrían haber ocasionado cambios tisulares que fuesen visibles incluso años después de haber cesado la exposición al fármaco. Además, planteamos la hipótesis de que esos cambios tisulares tardíos podrían, a su vez, ser clínicamente relevantes.

## IV. OBJETIVOS

Los objetivos de esta tesis fueron los siguientes:

1. Investigar el grado de correlación entre el daño en los diferentes tejidos cerebrales y diversos aspectos de la discapacidad, especialmente de la discapacidad cognitiva, en pacientes con EMPP establecida. Es decir, estudiar de qué manera el daño en cada uno de los tejidos cerebrales se correlaciona con el déficit cognitivo global y con la alteración específica de cada dominio cognitivo.

2. Investigar qué parámetros de RM cerebral, medidos en fases muy tempranas de la enfermedad, son capaces de predecir una peor evolución clínica a medio-largo plazo, concretamente, a los cinco años de seguimiento; asimismo, investigar si los cambios que tienen lugar en los parámetros de RM a lo largo del tiempo reflejan los cambios clínicos ocurridos durante el mismo periodo de tiempo, también en fases tempranas de la enfermedad.

3. Investigar el impacto a medio-largo plazo de la intervención inmune en pacientes con EMPP, tanto desde un punto de vista clínico como desde el punto de vista de la RM, tras cinco años de haber cesado el tratamiento con el fármaco inmunomodulador. Asimismo, explorar los mecanismos que subyacen al aumento irreversible de la discapacidad, esta vez en una cohorte de pacientes con EMPP establecida.

Concretamente, con este último punto lo que pretendimos fue:

a) Investigar si las diferencias clínicas y de RM que se habían observado durante el EC entre los grupos de tratamiento (placebo e IFNb-1b) estaban todavía presentes después de cinco años de haber recibido la última dosis de tratamiento inmunomodulador.

b) Explorar las diferencias en la evolución clínica y en los parámetros de RM entre los grupos de tratamiento desde la finalización del EC hasta la evaluación cinco años más tarde.

c) Explorar las diferencias en la en la evolución clínica y en los parámetros

de RM entre los grupos de tratamiento desde el inicio del EC hasta la evaluación cinco años después de haber finalizado el mismo.

d) Investigar si los cambios ocurridos durante el EC a nivel clínico y de RM se correlacionaron con los cambios clínicos (según la escala del EDSS) ocurridos durante los cinco años siguientes a la finalización del EC.

## V. MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Participantes

Para llevar a cabo el resto de proyectos de esta tesis utilizamos pacientes de dos cohortes diferentes. Mientras el primer y el segundo proyectos se llevaron a cabo en pacientes provenientes de una cohorte de pacientes con EMPP del *National Hospital for Neurology and Neurosurgery* (Queen Square, *University College of London, Institute of Neurology*, London, UK), el tercer proyecto se llevó a cabo en una cohorte de EMPP de la *Unitat de Neuroimmunologia Clínica* (UNiC) (que actualmente se denomina *Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya* [CEM-Cat]), con sede en Hospital Universitario Vall d'Hebron de Barcelona.

Todos los estudios fueron aprobados por los Comités Éticos de los centros respectivos y todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito.

#### 1.1. Participantes del primer estudio

Veintisiete pacientes con EMPP definida (Thompson et al., 2000) (edad media 51,73 años (rango: 31, 68 años), 15 varones), que ya habían participado en un estudio longitudinal iniciado cinco años atrás y publicado anteriormente (Khaleeli et al., 2008a) fueron invitados a participar en este estudio transversal, consistente en la realización de un protocolo de resonancia magnética (RM) y la realización de pruebas neuropsicológicas, cinco años después de que los pacientes fueran evaluados por primera vez al entrar en el estudio longitudinal.

La mediana de tiempo entre las evaluaciones cognitivas y la realización de la RM fue de 15 días (el rango fue de -190 a 762 días, indicando que algunos pacientes tuvieron una evaluación neuropsicológica [desde 190 días] antes de la resonancia magnética, mientras que otros [hasta 762 días] después). La información sobre las características de los pacientes como las características clínicas y sociodemográficas, las puntuaciones de depresión, las puntuaciones de ansiedad, la situación laboral y el perfil cognitivo se expone en

el capítulo de resultados (**TABLA VI-1**). Treinta y un sujetos sanos se sometieron a la evaluación neuropsicológica, pero no se les realizó el protocolo de imagen.

Los criterios de exclusión para todos los sujetos del estudio fueron la presencia de antecedentes de otras enfermedades neurológicas o sistémicas que causaran deterioro cognitivo, enfermedades psiquiátricas, lesiones cerebrales que hubiesen comportado una pérdida de la conciencia y el abuso de alcohol o drogas.

## **1.2. Participantes del segundo estudio**

Cuarenta y siete pacientes con el diagnóstico de EMPP definida o probable (Thompson et al., 2000) de reciente aparición (EMPP temprana), es decir, dentro de los cinco años desde el inicio de los síntomas, y 18 controles sanos fueron invitados a participar en este estudio y fueron investigados en el momento basal. A todos los sujetos (pacientes y controles) se les invitó a realizarse una RM cerebral en el momento basal, luego con una frecuencia semestral hasta los tres años de seguimiento y finalmente a los cinco años de seguimiento. A los pacientes del estudio se les invitó, además, a realizarse evaluaciones clínicas periódicas con una frecuencia igual a la de la RM.

No todos los participantes atendieron a todas las convocatorias de RM o de evaluación clínica. La **TABLA V-1** muestra el número de sujetos estudiados en cada tiempo. Para solucionar este problema de bajas intermitentes en el estudio, se llevaron a cabo análisis de regresión de modelo mixto, como se explica más adelante, en el apartado de análisis estadístico, dentro de este mismo capítulo.

A los cinco años de seguimiento, 42 pacientes (16 mujeres, con una media de edad de 44,38 años, rango 19-63) y diez controles fueron evaluados. En pacientes, las razones por las que no fueron evaluados a los cinco años fueron las siguientes: muerte por causas no relacionadas con su EM (dos casos), la retirada voluntaria del estudio (tres casos).

**TABLA V-1. Número de individuos investigados en cada momento del estudio**

	Tiempos del estudio (meses)							
	0	6	12	18	24	30	36	60
<b>Pacientes</b>								
Evaluaciones clínicas	47	37	36	30	35	30	43	42
Realización de RM	46	34	33	33	30	26	34	27
<b>Controles</b>								
Realización de RM	17	15	16	10	12	8	12	10

Esta tabla muestra el número de sujetos estudiados en cada momento, en cada tiempo del estudio, Los tiempos del estudio están expresados en meses (= meses desde el inicio del estudio).

Ninguno de los pacientes estaba tomando ningún tratamiento inmunomodulador. Dos pacientes habían recibido un único ciclo de corticosteroides intravenosos (dos hombres, que recibieron esteroides a los tres y entre los tres y los cinco años del seguimiento, respectivamente) por empeoramiento de los síntomas, sin que estos síntomas fuesen considerados como brotes. Dos pacientes estaban tomando corticosteroides por vía oral cada tres meses (dos hombres) y un paciente varón había recibido cinco ciclos de mitoxantrona endovenosa, entre los tres y los cinco años del seguimiento.

### **1.3. Participantes del tercer estudio**

A todos aquellos pacientes que habían completado la fase doble ciego del ensayo clínico (EC) con IFNb-1b llevado a cabo en nuestra unidad entre 1998 y 2000, es decir, a 67 de los 73 que inicialmente fueron recrutados para el ensayo, se les invitó a participar en este estudio.

Aunque los pacientes que habían participado en el EC tenían un curso fundamentalmente progresivo, se les permitía haber presentado un único brote a lo largo de toda la enfermedad. Dado que durante el EC original no se observaron diferencias en cuanto a la respuesta al IFNb-1b entre los pacientes que habían presentado algún brote durante su evolución clínica (afectos pues de una 'EM transicional progresiva') y aquellos que habían presentado un curso progresivo,

sin brote alguno (EMPP 'pura'), considerando además la poco numerosa población de estudio, en este estudio de seguimiento no se tuvo en cuenta, de cara al análisis de los datos, si los pacientes habían experimentado o no algún brote durante la evolución de la enfermedad.

## **2. Evaluaciones clínicas**

### **2.1. Evaluaciones clínicas del primer estudio**

Los pacientes fueron examinados neurológicamente y evaluados según la escala del EDSS (*Kurtzke's Expanded Disability Status Scale*) (Kurtzke, 1983). También se les realizaron los subtest integrados dentro del MSFC (*Multiple Sclerosis Functional Composite*) (Cutter et al., 1999), es decir, el NHPT (*Nine-Hole Peg Test*), el TWT (*25-foot Timed Walk Test*) y el PASAT (*Paced Auditory Serial Addition Test* – versión de 3s.).

### **2.2. Evaluaciones clínicas del segundo estudio**

En cada visita, los pacientes se evaluaron según la escala del EDSS. Además, siempre que ello fue posible, los pacientes fueron evaluados según los subtest que conforman el MSFC. En la última visita de seguimiento, a los cinco años de haberse iniciado el estudio, el EDSS se obtuvo en persona en 27 pacientes. En los 15 pacientes restantes, el EDSS se obtuvo mediante conferencia telefónica (Lechner-Scott et al., 2003), puesto que estaban demasiado discapacitados para que se les realizara una RM y declinaron la invitación de venir en persona para hacerse la exploración neurológica. En cuanto a las puntuaciones de los subtest del MSFC, éstas se obtuvieron en 26 de los 27 que atendieron a la última visita.

### **2.3. Evaluaciones clínicas del tercer estudio**

Se realizó una evaluación clínica a los cinco años de haber finalizado el EC,

obteniéndose información sobre las siguientes escalas clínicas:

a) EDSS;

b) MSFC y los subtest que lo conforman (NHPT, TWT y PASAT). Para los análisis estadísticos se trabajó siempre con los valores normalizados de dichos subtest (*z-scores*), es decir, *z-NHPT*, *z-TWT* y *z-PASAT*;

c) Índice de deambulaci3n;

d) Escalas relacionadas con la seguridad del fármaco, como la escala de Ashworth, la Escala de Depresi3n de Beck (BDI, del inglés *Beck Depression Inventory*) y la Escala de Severidad de la Fatiga (FSS, del inglés *Fatigue Severity Scale*). Adem3s, se administr3 el *Sickness Impact Profile* (SIP), un cuestionario dirigido a conocer la disfunci3n f3sica y neuropsicol3gica generada por la enfermedad (Beck et al., 1961; Bohannon and Smith, 1987; Krupp et al., 1989; Pollard et al., 1976).

Para obtener los valores normalizados de los subtest del MSFC seguimos las pautas publicadas (Fischer et al., 1999), utilizando la poblaci3n de estudio a nivel basal (antes de recibir el tratamiento del EC) como poblaci3n de referencia. Sabemos que los *z-scores* nos indican el n3mero de desviaciones est3ndar que la puntuaci3n de ese individuo y en esa prueba se aleja de la puntuaci3n media del grupo. Por ello, dichos *z-scores* nos dieron una idea de la posici3n del individuo respecto al grupo global en cuanto a la realizaci3n de esa prueba. Para los subtest que se miden en segundos, el NHPT y el TWT, dado que las puntuaciones altas (por encima de la media) dar3an *z-scores* positivos pero estar3an indicando una peor realizaci3n de la prueba (a m3s segundos, pero realizaci3n), el *z-score* final del subtest se obtuvo multiplicando por -1. Tamb3n se obtuvo un *z-score* global para cada individuo, para el MSFC.

En aquellos pacientes que estaban demasiado discapacitados para acudir en persona a la evaluaci3n hecha a los cinco a3os desde el final del EC, se obtuvo la informaci3n del EDSS mediante conferencia telef3nica (Lechner-Scott et al., 2003).

A los tres meses de haberse realizado la visita a los cinco a3os de

seguimiento, se realizó nuevamente una visita que tuvo como finalidad confirmar los empeoramientos observados en el EDSS. Así pues, la puntuación del EDSS con la que se trabajó para todos los efectos fue la puntuación del EDSS confirmada a los tres meses. No obstante, en aras de la comodidad, hablaremos siempre de 'EDSS' (refiriéndonos al 'EDSS confirmado'). Las puntuaciones del EDSS de los pacientes que murieron después de la finalización del EC y no participaron en el estudio de seguimiento no fueron incluidas en el análisis.

### **3. Evaluaciones neuropsicológicas**

Las evaluaciones neuropsicológicas se realizaron para llevar a cabo el primer y el tercer estudios. Cabe destacar aquí que las baterías de test utilizadas no fueron las mismas en ambos estudios, dado que se realizaron en diferentes centros, como parte de proyectos originalmente distintos, en diferentes tiempos y bajo la tutela de diferentes personas. Si bien esto fue una limitación del proyecto de la tesis, a la hora de elaborar las conclusiones de la misma intentamos hablar siempre de dominios cognitivos afectados más que de test alterados.

#### **3.1. Evaluaciones neuropsicológicas del primer estudio**

Una batería neuropsicológica similar a la utilizada en estudios anteriores (Summers et al., 2008b; Summers et al., 2008a) fue administrada (una sola vez) a todos los sujetos del estudio por un psicólogo experimentado. Mediante la batería utilizada se obtuvo la siguiente información:

1) Cociente Intelectual (CI) premórbido, que se calculó utilizando el *National Adult Reading Test* (NART) o Test Nacional de Lectura para Adultos (Nelson HE., 1982); el CI actual se evaluó con la escala revisada de Inteligencia de Wechsler para Adultos (WAIS-R) (Wechsler DA, 1981). Cuatro pruebas de inteligencia verbal (de vocabulario, de retención de dígitos, de aritmética y de semejanzas) y tres pruebas de inteligencia manipulativa o de ejecución (prueba de completar figuras, de ordenamiento de figuras y de diseño

de cubos) se utilizaron para obtener las puntuaciones en la escala verbal y la escala manipulativa del CI.

Para obtener un índice de disminución del CI, el CI estimado actual (WAIS IQ) se restó de la estimación de CI premórbida (es decir, del NART IQ). Si el índice de disminución del CI daba lugar a un valor positivo, ello indicaba un menor CI actual respecto a la estimación premórbida (Nelson HE., 1982; Penny et al., 2010).

2) La capacidad de memoria visual y verbal fue evaluada utilizando las versiones inmediata y diferida (30 min) de los test de la historia y la figura que se hallan dentro de la batería para adultos de memoria y procesamiento de la información (Coughlan AK. and Hollows AK., 1985).

3) La atención y la velocidad de procesamiento de la información se evaluaron utilizando el PASAT (versión de 3 segundos) (Rao et al., 1989) y el test de símbolos de dígitos (*Symbol Digit Modalities Test* [SDMT]) (Smith A., 1982). La versión del SDMT que se utilizó en todos los pacientes fue la versión escrita, excepto en aquellos con ataxia, a los que se administró la versión oral.

4) Las funciones ejecutivas se evaluaron utilizando el test de Hayling de completar frases (Burgess PW. and Shallice T., 1997), que evalúa la generación de respuestas verbales y la inhibición, y el test de anticipación espacial de Brixton (Burgess PW. and Shallice T., 1997), que evalúa el razonamiento espacial mediante la identificación de patrones de movimiento en el espacio de un determinado objeto y la detección de cambios en dichos patrones.

Los sujetos no habían sido previamente evaluados neuropsicológicamente, con la excepción del PASAT, que se había administrado a los pacientes en varias ocasiones. En aquellos sujetos con agudeza visual corregida inferior a 6/24 no se pudieron obtener puntuaciones en las pruebas de CI manipulativo, la prueba de la reproducción de la figura o el SDMT.

Las puntuaciones directamente obtenidas de cada prueba, con

excepción de la estimación del CI actual y del CI premórbido, se convirtieron en puntuaciones normalizadas (*z-scores*) utilizando las puntuaciones del grupo control como referencia. Para cada paciente, la puntuación normalizada de un test determinado se multiplicó por -1 cuando la puntuación original en ese test se situaba por debajo de la puntuación mediana del grupo control en ese mismo test, de tal manera que las puntuaciones por debajo de 0 indicaran siempre un rendimiento en la prueba por debajo de la media del grupo control y, por tanto, indicaran un peor rendimiento.

Dado que para el SDMT teníamos inicialmente dos versiones, la oral y la escrita, previamente a la normalización descrita arriba, las puntuaciones del SDMT fueron transformadas en *z-scores* usando como referencia datos normativos publicados (Strauss E. et al., 2006). Ello nos permitió poner las puntuaciones iniciales del SDMT en una sola escala de puntuaciones, que luego fueron transformadas en nuevos *z-scores* en relación con nuestro grupo de control.

Finalmente, mediante el cálculo del promedio de *z-scores* de los test realizados para cada sujeto, obtuvimos un índice de rendimiento cognitivo global para cada sujeto, que pretendía dar una medida del rendimiento cognitivo global (Strauss E. et al., 2006). Esta metodología se ha utilizado en un trabajo anterior (Penny et al., 2010). A todos los sujetos se les interrogó acerca de los síntomas actuales de ansiedad y depresión mediante la escala HADS (del inglés, Hospital Anxiety and Depression Scale) (Snaitth and Zigmond, 1986). Consideramos que la ansiedad y la depresión eran clínicamente significativas cuando se alcanzaron puntuaciones iguales o superiores a 11.

### **3.2. Evaluaciones neuropsicológicas del tercer estudio**

Un neuropsicólogo experto ajeno a la asignación previa del paciente a uno u otro grupo de tratamiento administró la Batería Neuropsicológica Breve (BNB) de Rao (Rao et al., 1991) a los pacientes.

Con ella se obtuvo información acerca de:

a) Atención/velocidad de procesamiento de la información, a través de los test PASAT y SDMT;

b) Memoria verbal inmediata y diferida (*Selective Reminding Test* [SRT]);

c) Memoria visuoespacial inmediata y diferida (10136 *Spatial Recall Test* [Spatial-RT]);

d) Fluencia verbal (un aspecto de la función ejecutiva) (prueba de evocación categorial lexicosemántica o *Word List Generation* [WLG]);

Las evaluaciones neuropsicológicas nunca fueron realizadas en momentos de brote o en momentos en los que el paciente hubiese recibido corticosteroides. En aras de la comodidad, a partir de este momento se nombrarán los test según sus siglas en inglés.

## **4. Evaluaciones de RM**

### **4.1. Generalidades**

Las técnicas de RM se han dividido clásicamente entre convencionales y no convencionales, teniendo estas últimas un carácter cuantitativo más que cualitativo. Dado que el término convencional puede llevar a confusión (por ser un concepto sujeto al paso del tiempo) utilizaremos el término *técnicas cuantitativas de RM* para referirnos a aquellas que fueron catalogadas como no convencionales en el momento de su creación.

Las técnicas cuantitativas de RM surgieron como respuesta a la frustración del científico que veía cómo las técnicas convencionales de RM no permitían medir con exactitud los procesos biológicos que pretendían representar. El número de técnicas cuantitativas ha ido aumentando en los últimos años, así como también ha ido aumentando la sofisticación de las técnicas cuantitativas existentes. Entre estas destacamos la imagen por

transferencia de magnetización (MTI, de las siglas en inglés *Magnetization Transfer Ratio*) puesto que es la que hemos utilizado en los estudios que conforman esta tesis doctoral.

Cuando se habla de secuencias potenciadas en T1, en T2 o secuencias de densidad protónica se habla de secuencias cuyas características permiten diferenciar tejidos en cuanto a sus tiempos T1 y T2 o en base a su densidad de protones. Los tiempos T1 y T2 son propiedades intrínsecas de cada tejido, como se describe más adelante.

Cuando un tejido se somete a la acción de un campo magnético, por ejemplo cuando se introduce en la resonancia -pero sin que se le aplique todavía ningún haz de radiofrecuencia (RF)-, dicho tejido se polariza, convirtiéndose en un imán, ya que todos sus protones con capacidad de movimiento comienzan a moverse en sentido longitudinal, en el mismo sentido que el campo electromagnético aplicado. Este imán apuntará al norte. En este punto, dentro de estar todos los protones rodando en la misma dirección, estos tienden a colocarse de tal manera que sus cargas eléctricas se contrarrestan, es decir, que acaba habiendo tantas cargas eléctricas apuntando hacia arriba (norte) como hacia abajo (sur) del eje longitudinal delimitado por el campo magnético. De todas maneras, raramente llegan a contrarrestarse del todo, quedando algunas asimetrías en cuanto a la carga eléctrica del tejido, que es positiva ya que el protón suelto siempre tiende a apuntar al norte. Esto ocurre porque es la forma de menor gasto de energía para el protón (los protones están en un nivel de energía menor si apuntan hacia el norte del campo magnético). Esta situación ligeramente asimétrica provoca una magnetización longitudinal en el tejido, en el mismo sentido que el campo magnético.

Tras la estimulación mediante un haz o un pulso de RF, el tejido se carga de energía (electromagnética) y sus protones comienzan a moverse de forma sincronizada -en fase- (nótese que el movimiento sincronizado de los protones aparece en el momento que el tejido se somete al pulso de RF, no antes). Ello provoca la aparición de una magnetización transversal que es detectada por el aparato de RM (por el *coil* receptor) en forma de energía eléctrica -ya que todo campo magnético en movimiento genera una corriente

eléctrica- que es la que se utilizará para crear las imágenes de RM.

Una vez finalizado el pulso de RF, los protones del tejido tienden a perder la energía previamente otorgada, cediéndola al medio de alrededor (llamado *lattice* en inglés). De esta manera vuelven a adoptar la posición previa al pulso de RF, perdiéndose la magnetización transversal y reapareciendo la magnetización longitudinal.

Pero este fenómeno no ocurre de forma homogénea para todos los tejidos, sino que cada uno, dependiendo de su composición bioquímica, esencialmente de su cantidad de agua y de macromoléculas lipídicas-lipoproteicas, tiene una capacidad específica para ceder esa energía otorgada (magnetización transversal) y para volver a su posición inicial (magnetización longitudinal). El tiempo que un tejido necesita para perder la magnetización transversal está en relación con el tiempo llamado  $T_2$ , mientras que el tiempo que el tejido necesita para recuperar su magnetización longitudinal inicial está en relación con el tiempo llamado  $T_1$ . Aunque ambos fenómenos (pérdida de magnetización transversal y recuperación de magnetización longitudinal) se dan de forma simultánea, son fenómenos diferentes y dependen de factores distintos, siendo el tiempo  $T_1$  mucho más largo que el tiempo  $T_2$  (Tofts, 2007).

Mientras el agua (o el tejido líquido en general), debido a la naturaleza física de sus moléculas, tiene unos tiempos  $T_2$  y  $T_1$  largos, los tejidos con gran cantidad de macromoléculas lipídicas (o tejidos sólidos, en general) tienen unos tiempos  $T_2$  y  $T_1$  cortos.

Así pues, las secuencias que llamamos potenciadas en  $T_2$  o potenciadas en  $T_1$  son aquellas que permiten poner de manifiesto las diferencias de señal entre tejidos, en base a sus diferentes tiempos  $T_2$  y  $T_1$ , respectivamente. La forma que tenemos de potenciar las diferencias en  $T_2$  o en  $T_1$  entre tejidos es jugando con el número y el momento de haces de RF enviados (ello está en relación con el tiempo de repetición, TR) y decidiendo cuándo se hace la lectura de la señal de resonancia (en relación con el tiempo de eco, TE). En cuanto a la secuencia de densidad protónica (DP) que, como su nombre indica, está diseñada para crear una imagen en base el número de

protones por unidad de volumen de cada tejido, lo que se pretende es buscar una situación en la que aquellos potenciales contrastes debidos a las diferencias en los tiempos T1 y T2 queden minimizados (**TABLA V-2**) (Tofts, 2007).

**TABLA V-2. Diferencias entre las principales secuencias**

	<i>Tiempo de eco corto</i>	<i>Tiempo de eco largo</i>
<b>Tiempo de repetición corto</b>	Secuencias potenciadas en T1	-
<b>Tiempo de repetición largo</b>	Secuencias de densidad protónica	Secuencias potenciadas en T2

Esta tabla muestra de qué manera se pueden obtener secuencias que potencien las diferencias entre tejidos en base al tiempo T1 particular de cada tejido (secuencias potenciadas en T1), en base al T2 (secuencias potenciadas en T2) o en base a la diferente densidad protónica de cada uno de ellos.

#### 4.2. Imagen por transferencia de magnetización

La imagen por transferencia de magnetización (MTI, del inglés *Magnetization Transfer Imaging*) es un método relativamente nuevo de RM que se utiliza para aumentar el contraste entre tejidos por medios físicos en lugar de medios químicos. Esta técnica refleja el intercambio de magnetización entre los protones que se mueven libremente y los que están unidos a macromoléculas, como las que se hallan en la mielina o en las membranas de los axones (van Waesberghe et al., 1999). Por tanto, esta técnica tiene la capacidad de reflejar *in vivo* los cambios patológicos que ocurren precisamente en estas estructuras, la mielina y los axones. Por intercambio de magnetización entendemos aquel intercambio de energía (electromagnética) que tiene lugar entre dos tejidos cuando son estimulados mediante un haz de RF.

Los pasos para la obtención de los parámetros de MTI podrían describirse de forma esquemática de la siguiente manera:

1. Como punto de partida, recordemos que la imagen de RM se basa en el movimiento sincronizado de los protones del cuerpo con capacidad libre de movimiento, cuando son estimulados mediante un haz o pulso de RF. Debemos recordar también que los protones, por su carga positiva, cuando se ponen en movimiento generan un

campo electromagnético, que corresponde a la señal que recogeremos para crear las imágenes. La capacidad de la RM para producir imágenes donde se diferencia un tejido de otro, es decir, para crear contrastes entre tejidos, radica en la diferente cantidad y comportamiento de dichos protones libres en cada uno de los tejidos. Es decir, en el diferente comportamiento electromagnético de cada uno de ellos.

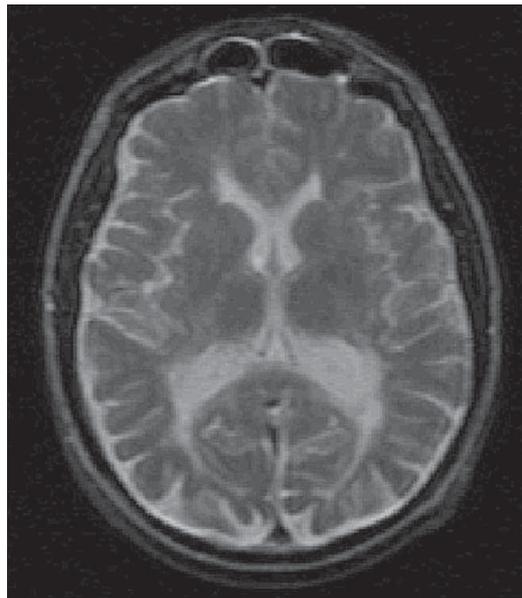
2. En el caso de la MTI, supongamos que tenemos dos tejidos cuyo contraste entre ellos queremos incrementar (y cuantificar). Para que esta técnica sea efectiva, estos dos tejidos deben comportarse como dos sistemas anatómicos capaces de intercambiar energía entre ellos; además, deben tener un comportamiento electromagnético claramente diferente el uno del otro (uno de los sistemas debe tener un T2 más corto que el otro, debe perder energía -electromagnética- más rápidamente que el otro). Consideremos que estos dos sistemas anatómicos son el agua y las macromoléculas e imaginemos que se comportan como dos reservorios de energía.
3. Las macromoléculas tienen un T2 muy corto en relación con el T2 del agua: dadas las 'inhomogeneidades' del tejido que contiene macromoléculas, es fácil que los protones que han sido estimulados (mediante haz de RF) dejen de estar en fase, es decir, es fácil que dejen de moverse de forma sincronizada. Ello hace que el tejido que contiene macromoléculas sea un tejido que fácilmente pierde energía tras una estimulación. Por ello decimos que el tejido con macromoléculas tiene un tiempo T2 (o un T2) bajo, más bajo que el T2 de los líquidos que, al ser molecularmente más homogéneos, sus protones se mueven de forma sincronizada durante más tiempo, una vez han sido estimulados.
4. Dadas las características electromagnéticas diferentes de estos dos sistemas anatómicos, es posible enviar un haz de RF que estimule selectivamente los protones ligados a las macromoléculas y en cambio no estimule el agua libre. En otras palabras, es posible cargar

de energía a uno de los sistemas anatómicos -macromoléculas- y en cambio no al otro.

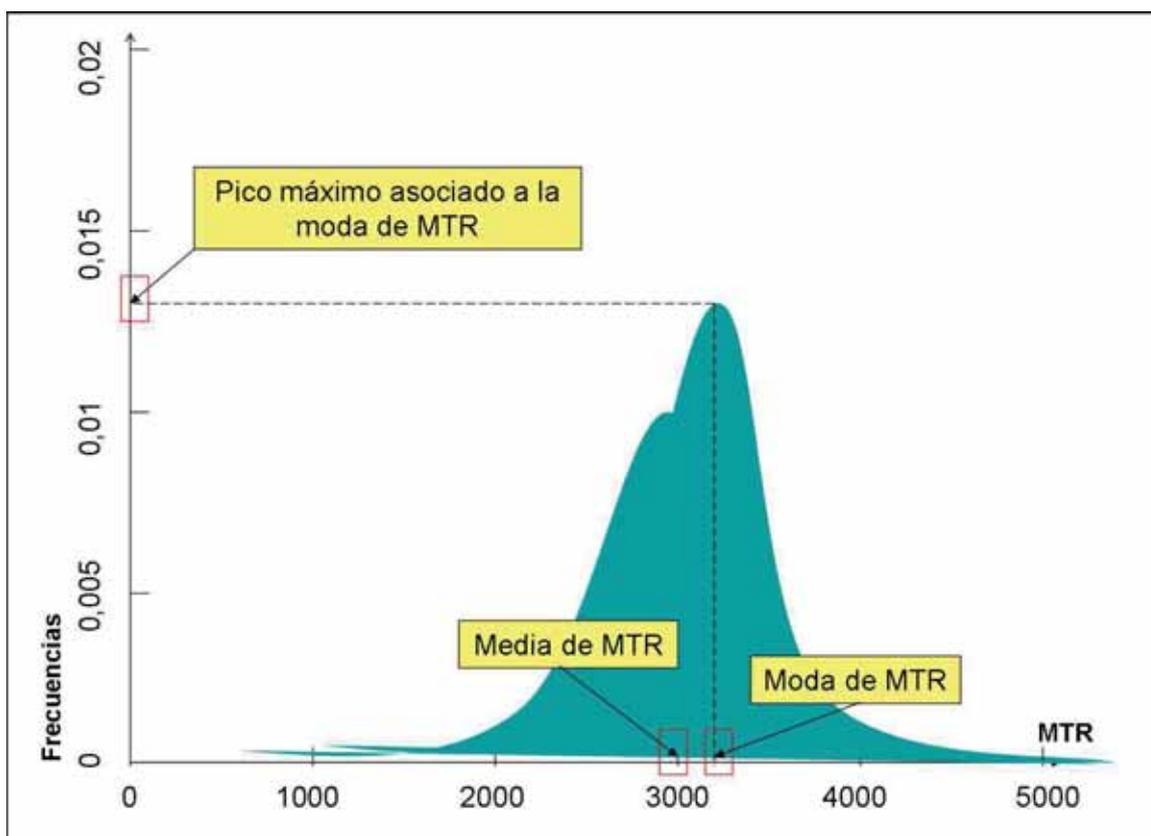
5. Una vez el sistema anatómico de macromoléculas ha sido cargado de energía electromagnética, ésta es cedida de forma espontánea al agua libre de alrededor de dichas macromoléculas.
6. Si enviamos otro pulso de RF, esta vez capaz de estimular tanto el agua libre como aquella de alrededor de las macromoléculas, nos encontraremos con que ésta última, como ya estaba cargada energéticamente debido a haber absorbido la energía de las macromoléculas del primer pulso de RF, tendrá un comportamiento de cuerpo saturado. Por ello, el pulso primeramente enviado con el objeto de estimular selectivamente las macromoléculas también se denomina pulso de saturación (llamado pulso de presaturación por algunos autores).
7. Desde un punto de vista de la imagen obtenida, el agua que se comporta como cuerpo saturado producirá una imagen similar a la que se obtiene cuando se lanzan haces de RF separados por un período corto de tiempo (corto TR) mientras que el agua que no estaba alrededor de las macromoléculas, y por tanto no saturada, producirá una imagen similar a la que se obtiene cuando se lanzan haces de RF separados por un largo período de tiempo (largo TR).
8. La técnica de MTI permite cuantificar la diferente cantidad de señal entre los dos compartimentos de agua, la que está alrededor de las macromoléculas y la que no lo está, a través del cálculo del ratio de transferencia de magnetización (MTR, del inglés *Magnetization Transfer Ratio*). Así, el MTR es una forma indirecta de cuantificar la cantidad de macromoléculas de un tejido.
9. Dado que las macromoléculas en el SNC están sobre todo presentes en la mielina, la técnica de MTI es especialmente útil para detectar pérdidas de mielina en el tejido cerebral que pasarían inadvertidas según las técnicas convencionales de RM. Valores altos de MTR

indicarán un buen estado de mielinización del tejido (como ocurre en los controles), mientras que valores bajos indicarán la presencia de desmielinización (como ocurre en los pacientes con EM).

10. Con los valores obtenidos de MTR para cada una de las regiones cerebrales, se crean los mapas de MTR que dan lugar a las imágenes de MTR (**FIGURA V-1**). Después, con el objeto de estudiar la composición del tejido, esta información puede manipularse de diferentes maneras. Una de ellas consiste en la creación de histogramas de MTR, que a su vez deben ajustarse según el volumen cerebral de cada individuo (obtención de histogramas de MTR normalizados).
11. Con los histogramas de MTR, que podemos hacer que reflejen de forma selectiva la situación en la sustancia gris, la sustancia blanca de apariencia normal o el tejido intralesional, automáticamente obtenemos los parámetros que los definen. Estos parámetros son la media, la moda y el pico máximo asociado a la moda de MTR (**FIGURA V-2**), que son los parámetros que utilizaremos para correlacionar el daño cerebral de un paciente con los parámetros clínicos de cada estudio.



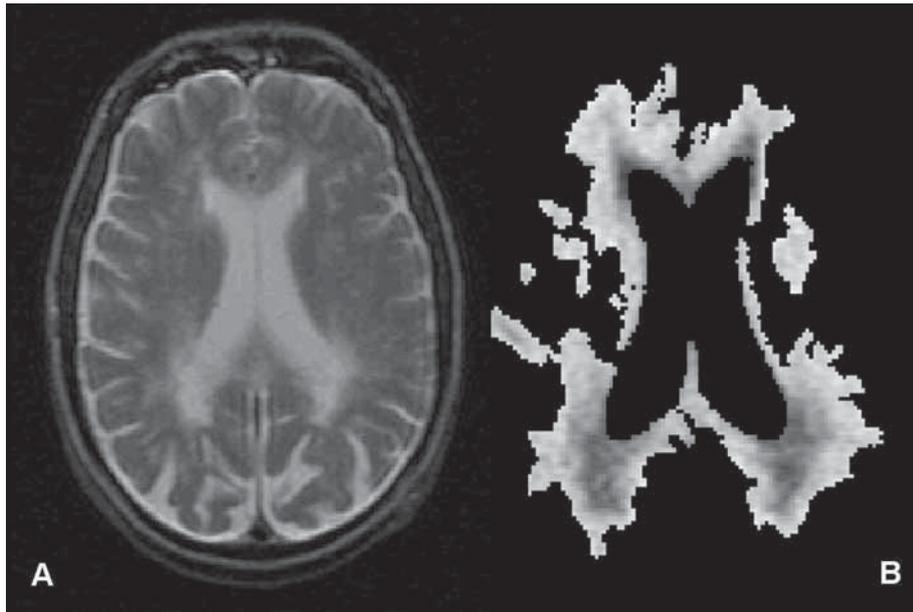
**FIGURA V-1. Imagen por MTI.** Imagen creada a partir del mapa de MTR obtenido para un paciente.



**FIGURA V-2. Imagen esquemática de un histograma de MTR de la sustancia gris.** Los parámetros que definen el histograma son la media: valor promedio de MTR para un tejido; moda: valor de MTR que más se repite en el tejido, es decir, valor de MTR que más unidades de volumen comparten (más frecuente); y pico máximo asociado a la moda de MTR: unidades de volumen que presentan la cantidad más frecuente de MTR. Las unidades de media y moda de MTR son unidades porcentuales, mientras que el pico máximo asociado a la moda de MTR es el volumen porcentual. *Abreviaturas:* MTR: ratio de transferencia de magnetización, del inglés *Magnetization Transfer Ratio*.

### 4.3. Obtención del volumen de lesiones en T2 y de volúmenes de sustancia blanca de apariencia normal y de sustancia gris

En cuanto a las lesiones, estas se delimitan en las imágenes de densidad protónica (DP) pero siempre teniendo como referencia las imágenes en T2. El proceso tiene lugar de forma semiautomática. Tras delimitar las lesiones se crean máscaras de lesión, que se tendrán en cuenta para el resto del proceso de obtención de volúmenes (**FIGURA V-3**).



**FIGURA V-3.** A. Imagen obtenida mediante una secuencia potenciada en T2; B. Imagen de una máscara de lesión.

Para obtener los volúmenes de sustancia gris (SG) y sustancia blanca de apariencia normal (SBAN) se siguen los pasos siguientes:

1. A partir de secuencias potenciadas en T1 se hace una segmentación del tejido cerebral, que consiste en la clasificación de los vóxeles en función de si pertenecen a SG o a SB (**FIGURA V-4**). Tal clasificación pasa primeramente por la asignación, a cada uno de los vóxeles, de una probabilidad (del 0 al 1) de pertenecer a SG o de pertenecer a SB; posteriormente a esta asignación, definiremos, a priori, a partir de qué probabilidad nosotros consideraremos un vóxel como perteneciente a la SG o a la SB. Este es un proceso automático a partir del cual obtendremos los vóxeles que pertenecen a uno u otro segmento. Generalmente la probabilidad 'umbral' es de 0,75, es decir, un vóxel con una probabilidad superior a 0,75 de pertenecer a SG será finalmente clasificado como perteneciente a la SG, y lo mismo ocurrirá para la SB, siendo el resto de vóxeles, aquellos que no alcancen el 0,75 para uno u otro tejido, descartados.
2. Las máscaras de lesión obtenidas previamente se aplican sobre los

mapas de probabilidad de pertenencia a uno u otro tejido. De este paso obtenemos los volúmenes brutos de SG, SB de apariencia normal (SBAN) y lesiones en T2. En este paso asumimos que las todas las lesiones que hemos detectado asientan en la SB (dadas las características de las secuencias utilizadas, no aptas para visualizar las lesiones en SG), por lo que la diferencia entre los vóxeles de SB obtenidos en el paso previo y los vóxeles que contienen lesiones es considerada como tejido libre de lesiones visibles, o sea, tejido (de SB) de apariencia normal. En cuanto a la SG, sin embargo, debido a que las secuencias que utilizamos no permiten la detección de lesiones corticales, como antes se ha mencionado, toda la SG que somos capaces de visualizar tiene una apariencia normal. Por ello, cuando hablamos de SG en realidad nos estamos refiriendo a la *SG de apariencia normal*. No obstante, en aras de la comodidad, siempre hablaremos de ella como ‘SG’.



**FIGURA V-4. Imágenes resultantes del proceso de segmentación del tejido cerebral.** A: sustancia blanca; B: sustancia gris. A estos mapas se les extrae la parte correspondiente a las lesiones (la máscara de lesión), de tal manera que nos quedan tres segmentos principales: sustancia gris, sustancia blanca de apariencia normal (asumimos que todas las lesiones asientan en la sustancia blanca) y lesiones.

3. Los volúmenes brutos son divididos entre el volumen intracerebral total, que es la suma de SG, SBAN, lesiones y líquido cefalorraquídeo (LCR), para obtener los volúmenes normalizados de SG y SB. Estos volúmenes resultantes son multiplicados por 100 para obtener el porcentaje de volumen de SG y de SBAN.
4. En el caso de que se quiera obtener la fracción global de parénquima cerebral, incluyendo todo tipo de tejidos, lo que se hace es dividir la suma de SG, SBAN y lesiones entre el volumen cerebral total (SG+SBAN+lesiones+LCR).

#### **4.4. Adquisición y post-procesado en el primer y el segundo estudios**

A todos los pacientes se les realizó una RM cerebral en un escáner de 1.5 Teslas GE Signa.

Las secuencias que fueron adquiridas y analizadas fueron las siguientes:

1) Secuencia de MTI, que consiste en una secuencia 2D dual echo spin-echo (SE), a la que se le intercalan imágenes de DP y T2 (28 cortes contiguos en el plano axial; tiempo de repetición (TR): 1720 ms; tiempo de eco (TE): 30/80 ms; número de excitaciones: 0,75; matriz adquirida de 256x128; matriz reconstruida de 256x256; campo de visión de 240x240 mm). Para obtener las imágenes de MTR, se usaron ecos con y sin (pre)saturación de transferencia de magnetización (Barker et al., 1996; Khaleeli et al., 2007b). El VLT2 se obtuvo a partir de las imágenes de DP, siempre con referencia a las imágenes potenciadas en T2 (Plummer DL, 1992). De los mapas de MTR se obtuvieron histogramas normalizados de MTR; de los histogramas se obtuvieron los siguientes parámetros: la media de MTR, la moda de MTR y el pico máximo asociado a la moda de MTR, para la SG y la SBAN (Khaleeli et al., 2008a).

2) Secuencia volumétrica FSPGR (*3D inversion prepared fast spoiled gradient recall*) (124 cortes contiguos en el plano axial, TR: 13,3ms, TE: 4,2ms, tiempo de inversión (TI): 450ms, matriz de 256x160 (matriz reconstruida de 256x256, resolución final en el plano de 1,17x1,17mm), campo de visión de

300x225mm, grosor del corte de 1,5mm) (Khaleeli et al., 2007b). El programa SPM2 (versión 2 del SPM, *Statistical Parametric Mapping, Wellcome Department of Cognitive Neurology*) se utilizó para segmentar la SG y la SBAN mediante el establecimiento de un umbral del 0,75 (Khaleeli et al., 2008a). En primer lugar, las máscaras de lesión (de naturaleza binaria) se aplicaron a los mapas de probabilidad de los tejidos. Para obtener los volúmenes normalizados de los tejidos cerebrales, los volúmenes de SG y SBAN fueron divididos por el volumen total intracraneal (la suma de SG, SBAN, lesiones y volumen de LCR). Finalmente, estos volúmenes se multiplicaron por 100 para producir fracciones porcentuales de SG y SBAN (Khaleeli et al., 2008a).

#### **4.5. Adquisición y post-procesado en el tercer estudio**

A todos los pacientes se les invitó a realizarse una RM cerebral, que se llevó a cabo en un escáner Magnetom Vision Plus de 1.5 Teslas (Siemens, Erlangen, Germany).

Se realizaron las siguientes secuencias:

1) Secuencias transversales potenciadas en T2 (T2-weighted dual-echo fast-acquisition); los parámetros de RM fueron 3000ms/14-85ms/5/1 (TR/TE/*echo train length*/adquisiciones);

2) Secuencias transversales potenciadas en T1 (T1-weighted spin-echo); los parámetros fueron 667ms/14ms/2 (TR/TE/ adquisiciones);

3) Secuencia gradiente-eco en dos dimensiones (Two-dimensional gradient-echo (2D-GE) pulse sequence), cuyos parámetros fueron 805ms/12ms/30/1 (TR/TE/flip angle/adquisiciones), que fue repetida con una secuencia adicional de (pre)saturación (para saturar a los protones del agua que se halla en contacto con las macromoléculas tisulares). La diferencia entre las secuencias con y sin el pulso de saturación protónica fue utilizada para obtener las imágenes de MTI (ver apartado 4.5.2. Imagen por transferencia de magnetización).

Las máscaras de lesión en T2 fueron delineadas inicialmente en secuencias de DP, siempre usando las secuencias en T2 como referencia, usando Dispimage (Plummer DL, 1992). A partir de estas máscaras de lesión se obtuvieron las máscaras de lesión en T1, considerando como lesión aquella región hipointensa en la imagen potenciada en T1 que fuera hiperintensa en la imagen potenciada en T2 (Aymerich et al., 2001). Los volúmenes de lesiones en T1 y en T2 (VLT1 y VLT2, respectivamente), fueron calculados a partir de estas máscaras.

La atrofia cerebral fue evaluada mediante el cálculo de la fracción de parénquima cerebral (FPC), en base a un algoritmo que ha sido ya previamente descrito (Aymerich et al., 2000; Aymerich et al., 2001). El volumen intracerebral total (VIT) fue calculado como la suma de los volúmenes de los siguientes tejidos: SBAN, SG de apariencia normal (SG) (ver comentarios sobre la SG de apariencia normal que aparecen en el apartado 4.5.3.), LCR, lesiones (máscaras de lesiones). La FPC fue calculada como:  $(SBAN + SGAN + lesiones)/VIT$ . Después, este valor fue multiplicado por 100 para obtener el %. Así, la FPC se expresa en %.

A partir de las secuencias de MTI se obtuvieron los mapas de MTR. El MTR se obtuvo como:  $MTR = 100 * (M_o - M_s) / M_o$ , donde  $M_o$  y  $M_s$  son las intensidades de señal para una determinada región, sin y con el pulso de saturación (protónica), respectivamente. Se realizó un análisis de histograma en base a las imágenes de MTR de la SBAN, obteniéndose los siguientes parámetros (referentes todos a la imagen de MTR en SBAN): moda, media y pico máximo asociado a la moda de MTR.

Las variables de RM que se obtuvieron finalmente fueron: VLT1 y VLT2, FPC, número de lesiones activas, definidas como lesiones nuevas o agrandadas en el escáner hecho a los 5 años de seguimiento tras el EC, tomando como referencia el escáner hecho al finalizar el EC, y parámetros de MTR de la SBAN (nótese que no se obtuvieron parámetros relativos específicamente a la sustancia gris (SG), como volumen de SG o parámetros de MTR en SG). Consideramos como lesión nueva toda área de hiperintensidad que hubiese aparecido en una región cerebral que previamente se hubiese catalogado como tejido cerebral

normal en una imagen de DP (Molyneux et al., 1999).

## **5. Análisis estadístico**

Para realizar el análisis estadístico en los proyectos segundo y tercero se utilizó Stata versión 9.2 (Stata Corporation, College Station, Texas, EE.UU.). En el cuarto proyecto, todos los análisis estadísticos se realizaron con SAS ® versión 8.2 (SAS Institute, Cary, NC).

El nivel de significación estadística se fijó en un valor de p menor de 0,05.

### **5.1. Análisis estadístico del primer estudio**

Las variables sociodemográficas y clínicas se compararon mediante el test de chi-cuadrado, el test t de Student y el test de U de Mann-Whitney, según correspondía. Los pasos seguidos hasta obtener las variables de RM que mejor explicaban el rendimiento en cada uno de los test neuropsicológicos se describen a continuación y se exponen de forma esquemática en la **FIGURA V-5** y la **FIGURA V-6**.

#### Paso 1

Las puntuaciones obtenidas en los test neuropsicológicos se compararon entre los dos grupos de sujetos (pacientes y controles) mediante modelos de regresión lineal (un modelo de regresión para cada una de las pruebas neuropsicológicas), considerando las puntuaciones en cada test como la variable dependiente e incluyendo las siguientes variables como variables independientes: un indicador de grupo (grupo de pacientes frente a grupo control), edad, años de educación y CI premórbido.

Como el objetivo del estudio era identificar las variables de imagen que mejor se asociaban con el deterioro cognitivo, solo los test en los que los

pacientes tuvieron resultados significativamente peores que los controles, o en los que se vio una tendencia hacia un resultado peor en pacientes que en controles ( $p < 0,1$ ), se incluyeron en el siguiente paso del análisis.

## Paso 2

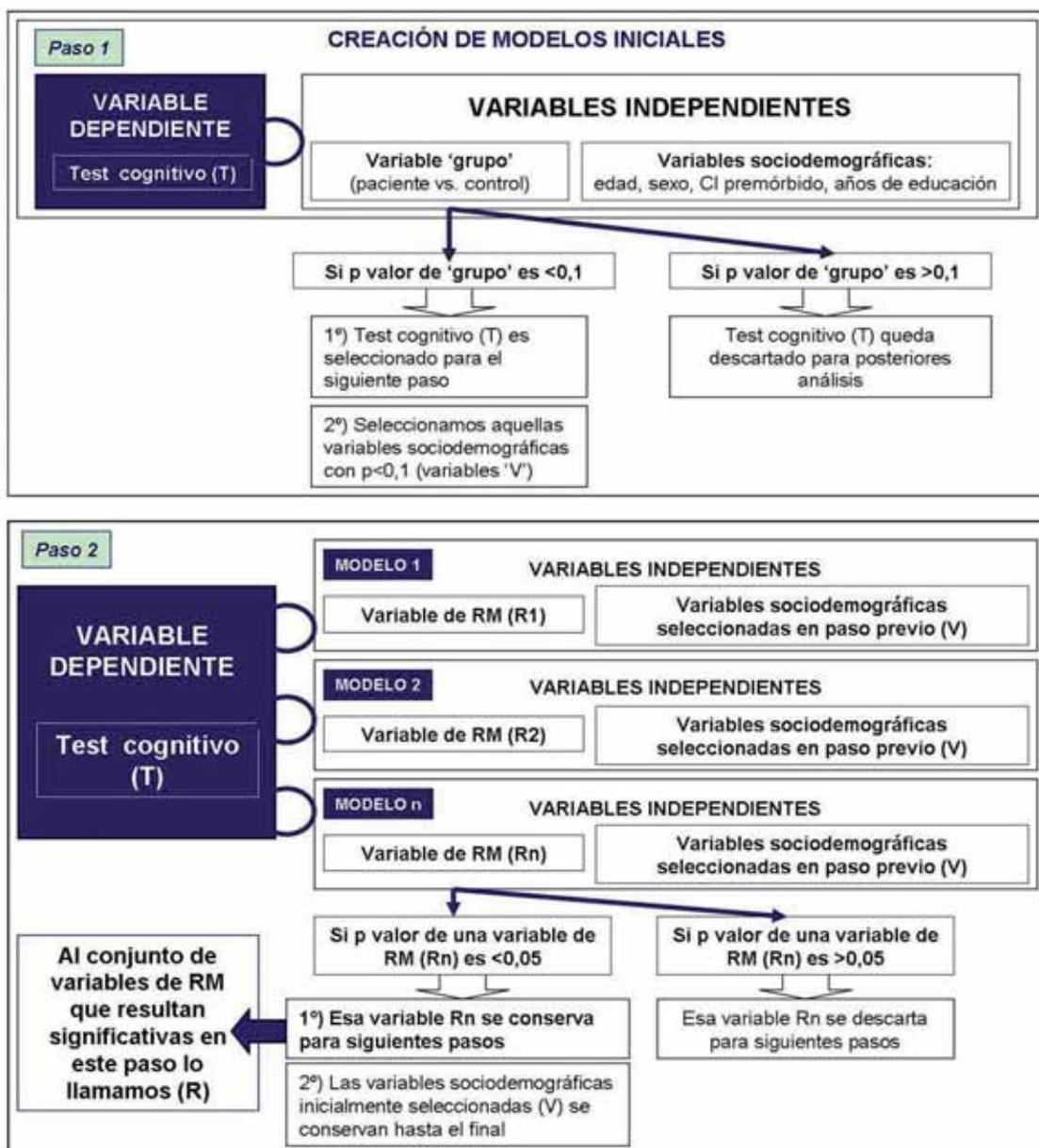
La asociación entre los parámetros de RM y el deterioro cognitivo se evaluó mediante modelos de regresión lineal, considerando la puntuación obtenida en cada prueba cognitiva como la variable dependiente.

Inicialmente las variables independientes se introdujeron por separado en cada modelo e incluyeron: (i) Medidas de RM: parámetros de MTR de SG y SBAN, volúmenes de SG y SBAN y volumen de lesiones en T2; (ii) Variables sociodemográficas: edad, sexo, índice de inteligencia premórbida y años de educación, pero solo si se correlacionan (en base al test de correlación de Pearson realizado previamente) con el rendimiento en cada prueba con una  $p < 0,1$ . Decidimos seleccionar este punto de corte del valor de  $p$  para evitar que asociaciones reales entre estas variables sociodemográficas y las puntuaciones de los test, dado el bajo número de pacientes estudiados, pasaran indebidamente desapercibidas (por tener una  $p > 0,05$ ). De esta manera creamos un ambiente más ‘conservador’ de cara a la obtención final de asociaciones entre RM y parámetros cognitivos, ya que esas variables sociodemográficas que mostraban una tendencia hacia la asociación significativa con la puntuación cognitiva fueron tenidas en cuenta hasta el final. Así, pudimos controlar por ‘factores externos’ hasta la obtención de los modelos finales, con el objeto de evitar el llegar de forma precipitada a conclusiones sobre la asociación de los parámetros de imagen y el rendimiento cognitivo de nuestros pacientes, tal como se ha hecho en otros trabajos (Bodini et al., 2012; Penny et al., 2010; Summers et al., 2008b; Summers et al., 2008a).

## Paso 3

Las variables de RM que resultaron estar significativamente asociadas de

forma individual con la variable dependiente en el paso previo (Paso 2) entraron juntas en un modelo de regresión lineal posterior. En este modelo, las variables sociodemográficas que habían resultado significativas en el paso más inicial (Paso 1) (si  $p < 0,1$ ), las puntuaciones en la escala del EDSS y las puntuaciones de ansiedad y depresión según la escala HADS se introdujeron como covariables.



**FIGURA V-5. Pasos del análisis estadístico (pasos 1 y 2).** Con estos modelos se identificaron las variables de RM que estaban asociadas con el rendimiento cognitivo en cada test de forma independiente. Finalmente se obtuvieron los coeficientes de correlación parcial (CCP), que nos dieron una medida de la fuerza relativa de las asociaciones entre las variables independientes y la variable dependiente (Kendall MG and Stuart A., 1973).

#### Paso 4

Para solucionar el problema de los diferentes intervalos entre las evaluaciones neuropsicológicas y las evaluaciones de RM, hicimos lo explicado a continuación.

En primer lugar, la duración del intervalo se incluyó en el modelo final (como variable "intervalo"), junto con un término de interacción "variable de RM x (=multiplicado por) intervalo". Esta operación se realizó para todos los modelos finales (es decir, para todas las variables cognitivas). Consideramos que cuando el término de interacción resultara significativo sería sinónimo de que la relación entre la variable de RM (independiente) y la variable cognitiva (dependiente) se vería modificada por la duración del intervalo.

En segundo lugar, realizamos dos análisis post-hoc incluyendo solo los pacientes con un intervalo entre RM y evaluación cognitiva "corto". Para definir un "corto" intervalo tomamos dos puntos de corte diferentes, de 180 días y 90 días, que fueron elegidos arbitrariamente. Diecisiete pacientes tenían un intervalo de 180 días o menos y 14 tenían un intervalo de 90 días o menos. Los modelos finales obtenidos en el Paso 3 se volvieron a ejecutar pero solo con los pacientes que pertenecían a los grupos con "corto" intervalo.

Para cada modelo, obtuvimos el porcentaje de la varianza del rendimiento en cada test explicado por las variables independientes del modelo multiplicando el valor de R-ajustada al cuadrado por 100. Los residuos de los modelos finales fueron revisados con el objeto de comprobar la normalidad de los datos y la presencia de valores extremos.

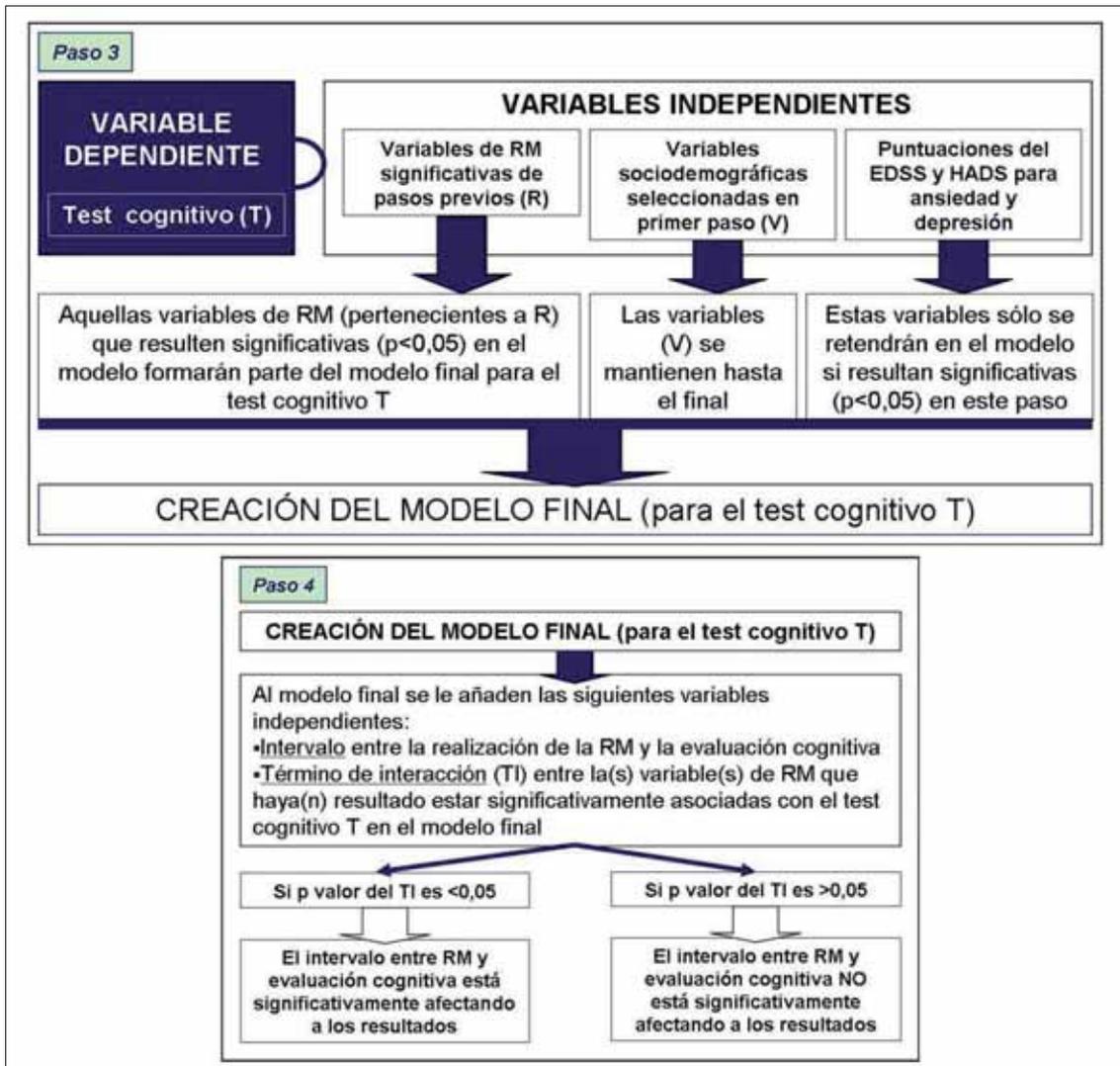


FIGURA V-6. Pasos del análisis estadístico (pasos 3 y 4). Esta figura muestra los pasos 3 y 4 del análisis estadístico (ver texto para más detalles).

## 5.2. Análisis estadístico del segundo estudio

### Evaluación de la progresión clínica durante los cinco años del estudio

Para evaluar los cambios en la EDSS en el tiempo, las puntuaciones EDSS al inicio del estudio (momento basal) y a los cinco años de seguimiento se compararon mediante el test de Wilcoxon para datos apareados, dado que la variable EDSS no sigue una distribución normal. Los cambios en las puntuaciones del EDSS desde el momento basal hasta los cinco años de seguimiento se convirtieron en 'pasos'. Un aumento de un 'paso' venía definido por el aumento de un punto en el EDSS si el EDSS inicial era de 5,5 o inferior,

o por el aumento de medio punto en el EDSS si el EDSS inicial era superior a 5,5, tal como se ha descrito en trabajos anteriores (Khaleeli et al., 2007b; Khaleeli et al., 2008a).

En cuanto a las puntuaciones de los subtest del MSFC, primeramente asignamos el valor de 180 segundos o 300 segundos al TWT o al NHPT, respectivamente, cuando la persona era incapaz de hacer la prueba debido a su discapacidad por la EM (Fischer et al., 1999). Después, todas las puntuaciones (en segundos) de los subtest fueron transformadas en valores normalizados (*z-scores*) según las normas publicadas, utilizando nuestra muestra en el momento basal como muestra de referencia (Fischer et al., 1999). Así pues, las puntuaciones iniciales de TWT, NHPT y PASAT fueron convertidas en *z-TWT*, *z-NHPT* y *z-PASAT*. Dado que no todos los pacientes habían realizado los subtest del MSFC en todos los tiempos del estudio, tal como ocurría con las RM, para evaluar los cambios a lo largo del tiempo, en lugar de utilizar t-test para datos apareados comparando diferentes tiempos del seguimiento, utilizamos análisis de regresión de modelo mixto (centrados en el individuo) (Laird and Ware, 1982), de tal forma que, para cada subtest (cuya *z-score* actuaba como variable dependiente) analizábamos los cambios a lo largo del tiempo (la variable tiempo actuaba como variable independiente) que realizaba cada individuo como parte del grupo. Cuando el valor de *p* de la variable 'tiempo' estaba por debajo de 0,05 se consideraba que a nivel de grupo los pacientes habían presentado un cambio significativo en el *z-score* concreto que se estuviera analizando. De esta manera maximizamos el uso eficiente de todos los datos disponibles, dado que el modelo permitía el análisis aunque hubiese datos ausentes.

#### Predicción de la progresión clínica a los cinco años

Para identificar los parámetros de RM basales (obtenidos al inicio del estudio) capaces de predecir el aumento de la discapacidad se usaron los siguientes modelos:

- a) Para predecir cambios en el EDSS: modelo de regresión logística

ordinal, con la variable 'cambios en el EDSS medidos en pasos' como variable dependiente; como variables independientes: edad, sexo, tiempo de evolución de la enfermedad y parámetros de RM obtenidos en el momento basal.

b) Para predecir cambios en los subtest del MSFC: modelos de regresión lineal (un modelo para cada *z-score*), con la variable '*z-score* del subtest del MSFC' medida a los cinco años de seguimiento como variable dependiente; como variables independientes: *z-score* del subtest del MSFC en el momento basal, edad, sexo, tiempo de evolución de la enfermedad y parámetros de RM obtenidos en el momento basal. Para predecir la progresión en el z-TWT, se excluyó del análisis a todos aquellos pacientes que ya no podían caminar en el momento basal, ya que los valores basales de estos pacientes (180 segundos) habrían predicho perfectamente los valores a los 5 años (180 segundos), independientemente de la naturaleza o número de las variables incluidas en el modelo.

Finalmente, para descubrir cuál o cuáles de los parámetros de RM obtenidos a nivel basal explicaban mejor la variabilidad de la variable dependiente, se siguieron tres pasos:

a) En primer lugar, cada medida de RM fue introducida por separado en el modelo;

b) En segundo lugar, las variables que habían resultado ser significativas ( $p < 0,05$ ) en el paso previo fueron todas ellas incluidas juntas en un nuevo modelo de regresión. Tras este paso quedaban seleccionadas aquellas variables de RM que seguían siendo significativas. El modelo final quedaba pues constituido por estas últimas variables de RM significativas.

c) En tercer lugar, para conocer el porcentaje de la varianza de la medida de progresión utilizada en cada caso que podía explicarse por el modelo final conseguido, multiplicamos el valor del cuadrado de R (valor obtenido en cada modelo estadístico creado) por 100.

### Cambios concurrentes en la RM y en la clínica durante el periodo de estudio

Para este propósito, haciendo nuevamente el uso más eficiente de los datos y para evitar el sesgo de exclusión de los sujetos que no fueron evaluados en algunos de los tiempos del estudio, utilizamos análisis de regresión lineal de modelo mixto (Laird and Ware, 1982). Utilizamos un modelo para cada parámetro de RM, que se usó como variable dependiente. Entre las variables independientes se encontraba la variable 'tiempo', la variable 'grupo', que indicaba si el sujeto pertenecía al grupo de pacientes o controles, y un término de interacción (TI) que se obtenía tras multiplicar la variable 'tiempo' y la variable 'grupo'. Si el valor de p del TI se hallaba por debajo de 0,05 era sinónimo de que los cambios en el parámetro de RM a lo largo del tiempo se veían influenciados por el hecho de pertenecer al grupo de pacientes o al de controles. Además, en el grupo de pacientes se creó una variable categórica que informaba de la dimensión de la progresión a lo largo de los 5 años de estudio (en base a los cambios en el EDSS). Es decir, sus categorías eran: estabilidad o progresión mínima (empeoramiento de  $\leq 0,5$  'pasos' del EDSS, 13 pacientes), progresión moderada (empeoramiento de 1-2,5 'pasos' del EDSS, 13 pacientes) y progresión marcada (empeoramiento  $\geq 3$  'pasos' del EDSS, 16 pacientes). Así pues, los pacientes fueron divididos en estas tres categorías, en base a su evolución clínica durante el tiempo del estudio. Esta variable también fue introducida en el modelo, así como fue introducido otro nuevo TI creado multiplicando la nueva variable clínica categórica por el tiempo.

Para los cambios en los *z-scores* de los subtest del MSFC, en cada modelo (con la variable de RM como variable dependiente) se introdujo el *z-score* determinado y el TI creado como *z-score* x tiempo. Cuando este nuevo TI resultó significativo, se consideró que los cambios en el parámetro de RM eran sensibles a los cambios clínicos del grupo de pacientes, es decir, se consideró que los cambios de RM reflejaban los cambios clínicos.

Otras variables independientes adicionales fueron la edad, el sexo y una variable adicional relacionada con el cambio que sufrió el escáner en el 2004. Los residuos de todos los modelos finales fueron evaluados para comprobar la

normalidad de los datos y el análisis de valores extremos.

### **5.3. Análisis estadístico del tercer estudio**

#### Análisis a los cinco años de seguimiento tras la finalización del ensayo clínico

Las variables clínicas (EDSS y *z-scores* del MSFC y los subtest), las variables radiológicas y las variables neuropsicológicas entre los dos grupos de tratamiento fueron comparadas mediante prueba de los rangos sumados de Wilcoxon (*Wilcoxon rank sum test*, o test *U de Mann-Whitney*), para datos independientes.

Los datos demográficos entre los dos grupos de tratamiento se compararon mediante el análisis de la varianza para datos independientes (ANOVA de un solo sentido o t-test; o bien test de Kruskal-Wallis, si no se cumplían los requisitos para ANOVA), si eran variables cuantitativas. Si eran variables cualitativas o dicotómicas se utilizó el test de Chi cuadrado.

#### Cambios desde el final y desde el inicio del ensayo clínico hasta el momento del seguimiento, cinco años después de finalizar el ensayo clínico

Se calcularon los cambios en el EDSS, *z-scores* de los subtest del MSFC y las variables de RM. Según el cambio experimentado en el EDSS a lo largo del periodo estudiado, los pacientes fueron clasificados como *respondedores* y *no-respondedores*. Se utilizaron 3 diferentes criterios (Rio et al., 2006) para definir a los *no-respondedores*:

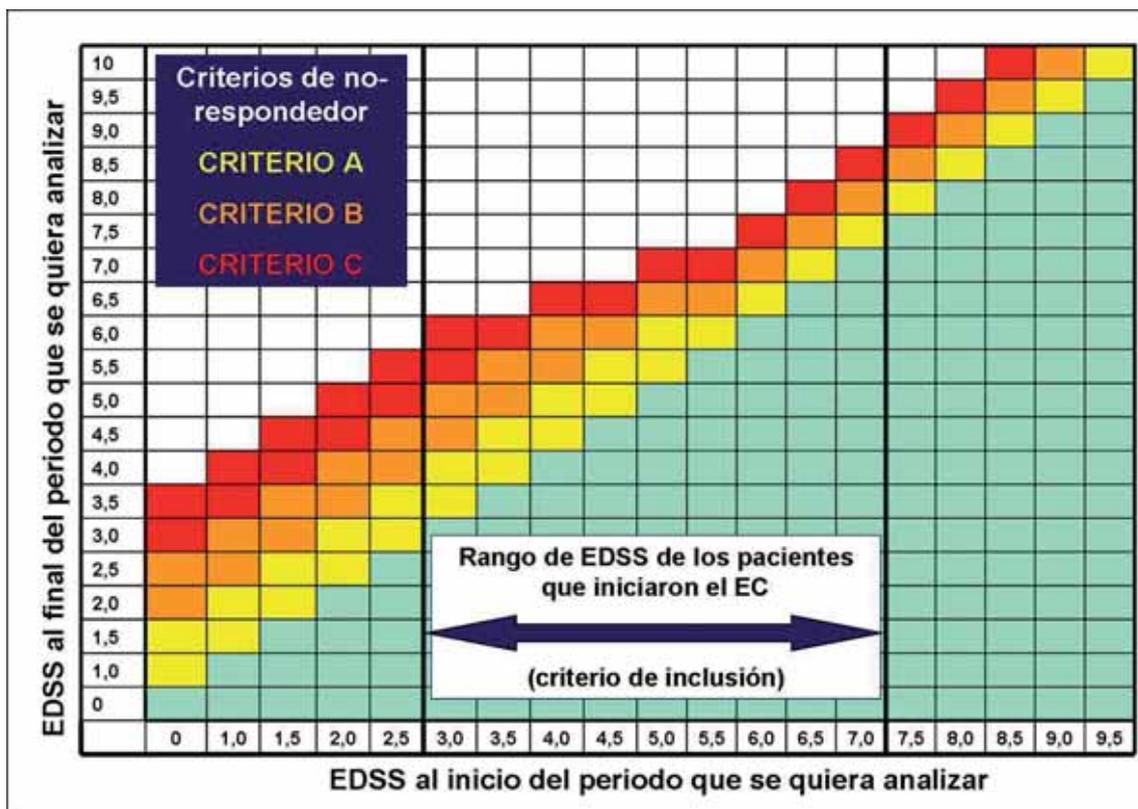
*Criterio A:* por lo menos aumento de 1,5 puntos en el EDSS si el EDSS basal era de 0; aumento de un punto si el EDSS basal era  $\leq 5$ ; o aumento de 0,5 puntos si el EDSS basal era  $\geq 5,5$ . Estos aumentos del EDSS se consideraron como aumentos de un 'paso'.

*Criterio B:* por lo menos aumento de 2,5 puntos en el EDSS si el EDSS basal era de 0; aumento de dos puntos en el EDSS si el EDSS basal estaba

entre 1,0 y 4,0; aumento de 1,5 puntos si el EDSS basal estaba entre 4,5 y 5,0; o aumento de un punto en el EDSS si el EDSS basal era  $\geq 5,5$ . Aumentos de esta dimensión fueron considerados como aumentos de dos ‘pasos’.

*Criterio C:* por lo menos aumento de 3,5 puntos en el EDSS si el EDSS basal era de 0; aumento de tres puntos en el EDSS si el EDSS basal estaba entre 1,0 y 3,0; aumento de 2,5 puntos si el EDSS basal estaba entre 3,5 y 4,0; aumento de dos puntos si el EDSS basal estaba entre 4,5 y 5,0; aumento de 1,5 puntos si el EDSS basal era  $\geq 5,5$ . Aumentos de esta dimensión fueron considerados como aumentos de tres ‘pasos’ (**FIGURA V-7**).

Los porcentajes de *no-respondedores* entre los grupos de tratamiento fueron comparados mediante el test de Chi cuadrado o el test exacto de Fisher, según fuera lo más apropiado.



**FIGURA V-7.** Esquema de los diferentes criterios de no-respondedor utilizados en este trabajo. Como puede observarse, el criterio A (cambios de un ‘paso’ en la escala del EDSS) se cumple más fácilmente que el criterio C (cambios de tres ‘pasos’), puesto que con un menor aumento del EDSS el paciente ya se clasifica como no-respondedor. *Abreviaturas:* EC: ensayo clínico; EDSS: *Expanded Disability Status Scale*.

En cuanto a los cambios desde el inicio del EC, los cambios en el MSFC y los *z-scores* de los subtest se calcularon desde el mes número seis del ensayo, para evitar interferencias con el aprendizaje en la realización de los subtest (Cohen et al., 2001). En cuanto a los cambios en las variables neuropsicológicas, solo se estudiaron los cambios desde el inicio del EC hasta la visita de seguimiento a los cinco años de haber finalizado el ensayo. Para comparar los cambios en los parámetros clínicos (*z-scores* de los subtest del MSFC, EDSS), neuropsicológicos, de seguridad y de RM:

a) Primero se utilizó la prueba de los rangos signados de Wilcoxon (*Wilcoxon signed rank test*), para datos apareados, para hacer las comparaciones dentro del mismo grupo, en diferentes tiempos del estudio;

b) Luego se hizo la prueba de los rangos sumados de Wilcoxon (*Wilcoxon rank sum test*, o *test U de Mann-Whitney*), para datos independientes, con la que se compararon los cambios clínicos, neuropsicológicos o de RM a lo largo del tiempo entre los dos grupos. Las pruebas estadísticas utilizadas siempre fueron pruebas de dos colas, es decir, a priori no se estableció ninguna dirección específica de la hipótesis alternativa.

#### Correlación entre los cambios ocurridos durante el ensayo clínico y la progresión del edss desde la finalización del ensayo clínico hasta los cinco años de seguimiento

Realizamos correlaciones entre los cambios ocurridos durante el EC en cuanto a *z-scores* del MSFC (y *z-scores* de los subtest), VLT1, VLT2, FPC y número total de lesiones activas, y los cambios en el EDSS desde la finalización del EC hasta la evaluación hecha cinco años más tarde. Para este análisis se consideró toda la cohorte de pacientes, independientemente del grupo de tratamiento al que habían sido asignados. Mediante las pruebas de correlación de Spearman, se obtuvieron los correspondientes coeficientes de correlación.

## VI. RESULTADOS

### 1. Primer estudio. Estudio transversal de una cohorte de EMPP establecida: afectación cognitiva y parámetros de RM cuantitativa

#### 1.1. Resultados

No observamos diferencias estadísticamente significativas entre pacientes y controles en cuanto a edad, sexo, años de educación y CI premórbido (**TABLA VI-1**).

#### Diferencias entre pacientes y controles en cuanto a parámetros neuropsicológicos

Los pacientes tuvieron significativamente peores resultados que los controles en cuanto al índice global de rendimiento cognitivo. Ello se debió a que los pacientes obtuvieron peores puntuaciones en los test que evaluaban los siguientes dominios:

- a) CI actual y empeoramiento estimado del CI verbal.
- b) Atención/velocidad de procesamiento de la información, en concreto, puntuaron peor en el SDMT (*Symbol Digit Modalities Test*).
- c) Memoria verbal, concretamente en el test de memoria verbal diferida, es decir, en el test de *Delayed Story Recall*.
- d) Funciones ejecutivas, concretamente puntuaron peor en el *Hayling Test*.

#### Asociación entre parámetros de RM y afectación cognitiva

Los datos de RM del grupo de pacientes están expuestos en la **TABLA VI-2**. Las variables sociodemográficas que se correlacionaron con los test neuropsicológicos en el paso uno que luego fueron utilizadas en posteriores modelos de regresión se muestran en la **TABLA VI-3**.

En cuanto a los parámetros de RM que reflejaban daño en la SG, una

baja moda de MTR de la SG se asoció a un peor índice global de rendimiento cognitivo ( $p < 0,001$ ,  $CCP = 0,77$ ). El modelo, que incluía años de educación ( $p = 0,008$ ,  $CCP = 0,52$ ), explicó el 63% de la varianza del índice global de rendimiento cognitivo (**FIGURA VI-1**). Asimismo, una baja media de MTR de la SG se asoció a un mayor empeoramiento del CI verbal ( $p = 0,001$ ,  $CCP = -0,62$ ). El modelo, que nuevamente incluía años de educación ( $p = 0,04$ ,  $CCP = -0,42$ ), explicó el 42% de la varianza del empeoramiento del CI verbal (**FIGURA VI-2**). Finalmente, un menor pico máximo asociado a la moda de MTR (peak height MTR) de la SG se asoció a una peor función ejecutiva, al asociarse a una peor puntuación en el Hayling test. El modelo explicó el 61% de la varianza de dicho test ( $p < 0,001$ ,  $CCP = 0,79$ ).

En cuanto a los parámetros que describían daño en la SBAN, un volumen bajo de la SBAN se asoció a una peor puntuación en el SDMT ( $p < 0,001$ ,  $CCP = 0,74$ ), que refleja capacidad de atención y velocidad de procesamiento de la información. El modelo, que incluía edad ( $p < 0,001$ ,  $CCP = 0,72$ ), explicó el 69% de la varianza de la puntuación en este test.

Por último, observamos que un mayor volumen de lesiones en T2 se asociaba a una peor puntuación en la prueba de memoria verbal diferida ( $p = 0,007$ ,  $PCC = -0,55$ ). El modelo, que incluía también años de educación ( $p = 0,002$ ,  $CCP = 0,62$ ), edad ( $p = 0,008$ ,  $CCP = 0,54$ ) y la subescala del HADS para ansiedad ( $p < 0,02$ ,  $CCP = -0,50$ ), explicó el 65% de la varianza del test de memoria diferida.

Para todos los modelos, ni el intervalo entre la evaluación neuropsicológica y la RM ni el término de interacción "variable de RM x intervalo" fueron significativos (**TABLA VI-4**).

**TABLA VI-1. Datos sociodemográficos, clínicos y neuropsicológicos<sup>a</sup>**

	<b>Pacientes N = 27</b>	<b>Controles N = 31</b>	<b>p valor</b>
<b>Edad</b> (años), media (mín.; máx.)	51,73 (31; 68)	48,94 (30; 65)	0,146 <sup>b</sup>
<b>Sexo</b> , número de hombres (%)	15 hombres (57,7%)	17 hombres (54,8%)	0,829 <sup>c</sup>
<b>Puntuación en la escala del EDSS</b> , mediana (rango: mín.; máx.)	6 (1,5; 7,5)	-	-
<b>Duración de la enfermedad</b> en el momento de la evaluación neuropsicológica (años) <sup>a</sup>	8,78 (1,24)	-	-
<b>Años de educación</b> , media (rango)	12,96 (10; 19)	13,35 (11; 18)	0,293 <sup>b</sup>
<b>Puntuación de ansiedad</b> , mediana (rango)	6 (0; 16)	5 (0; 20)	0,968 <sup>d</sup>
<b>Puntuación de depresión</b> , mediana (rango)	5 (0; 13)	3 (0; 12)	0,049 <sup>d</sup>
<b>Situación laboral</b> : número de individuos que estaban trabajando en el momento de la evaluación neuropsicológica (%)	7 (27%)	23 (74%)	<b>&lt;0,001<sup>c</sup></b>
<b>Índice global de rendimiento cognitivo</b> (valor normalizado, <i>z-score</i> )	-1,00 (1,34)	0 (0,66)	<b>0,001<sup>b</sup></b>
<b>CI premórbido (estimado<sup>e</sup>)</b>	109,72 (9,94)	111,65 (13,53)	0,480 <sup>b</sup>
<b>CI actual</b>			
Verbal	105,27 (12,96)	112,29 (15,23)	0,026 <sup>b</sup>
Manipulativo	101,39 (11,94)	105,87 (12,51)	0,054 <sup>b</sup>
<b>Deterioro del CI (estimado<sup>f</sup>)</b>			
Verbal	3,16 (9,40)	-2,35 (7,96)	0,036 <sup>b</sup>
Manipulativo	10,36 (9,53)	4,87 (14,34)	0,055 <sup>b</sup>
<b>Memoria</b>			
Test de la historia: recuerdo inmediato (aciertos/56)	32,96 (13,74)	37,64 (6,65)	0,114 <sup>b</sup>
Test de la historia: recuerdo diferido (aciertos/56)	29,42 (13,78)	36 (7,15)	<b>0,011<sup>b</sup></b>
Test de la figura: recuerdo inmediato (aciertos/56)	63,87 (16,21)	70,77 (9,93)	0,074 <sup>b</sup>
Test de la figura: recuerdo diferido (aciertos/56)	62,87 (17,75)	69,97 (9,18)	0,086 <sup>b</sup>
<b>Atención/Velocidad de procesamiento de la información</b>			
PASAT	46,64 (15,64)	49,84 (9,7)	0,618 <sup>b</sup>
SDMT (valor normalizado, <i>z-score</i> )	-0,99 (1,75)	0,12 (1,06)	<b>0,001<sup>b</sup></b>
<b>Funciones ejecutivas</b>			
Test de Hayling (aciertos/23)	15,77 (4,66)	18,74 (1,59)	<b>0,006<sup>b</sup></b>
Test de Brixton (errores/54)	16,94 (7,48)	15,87 (5,39)	0,972 <sup>b</sup>

**a:** Todas las variables están expresadas como media (desviación estándar) salvo que se indique lo contrario; **b:** Test *t de Student*; **c:** Test de Chi cuadrado; **d:** Test de U de Mann-Whitney; **e:** El valor del CI premórbido es una estimación a partir del NART (*National Adult Reading Test*); **f:** El deterioro del CI se obtiene mediante la resta del CI actual al CI premórbido, Valores positivos indican una caída del CI. *Abreviaturas:* CI: cociente intelectual; DE: desviación estándar; EDSS: *Expanded Disability Status Scale*; PASAT 3: *Paced Auditory Serial Addition Test* (versión 3 segundos); SDMT: *Symbol Digit Modalities Test*.

**TABLA VI-2. Datos de RM en pacientes (N=27)**

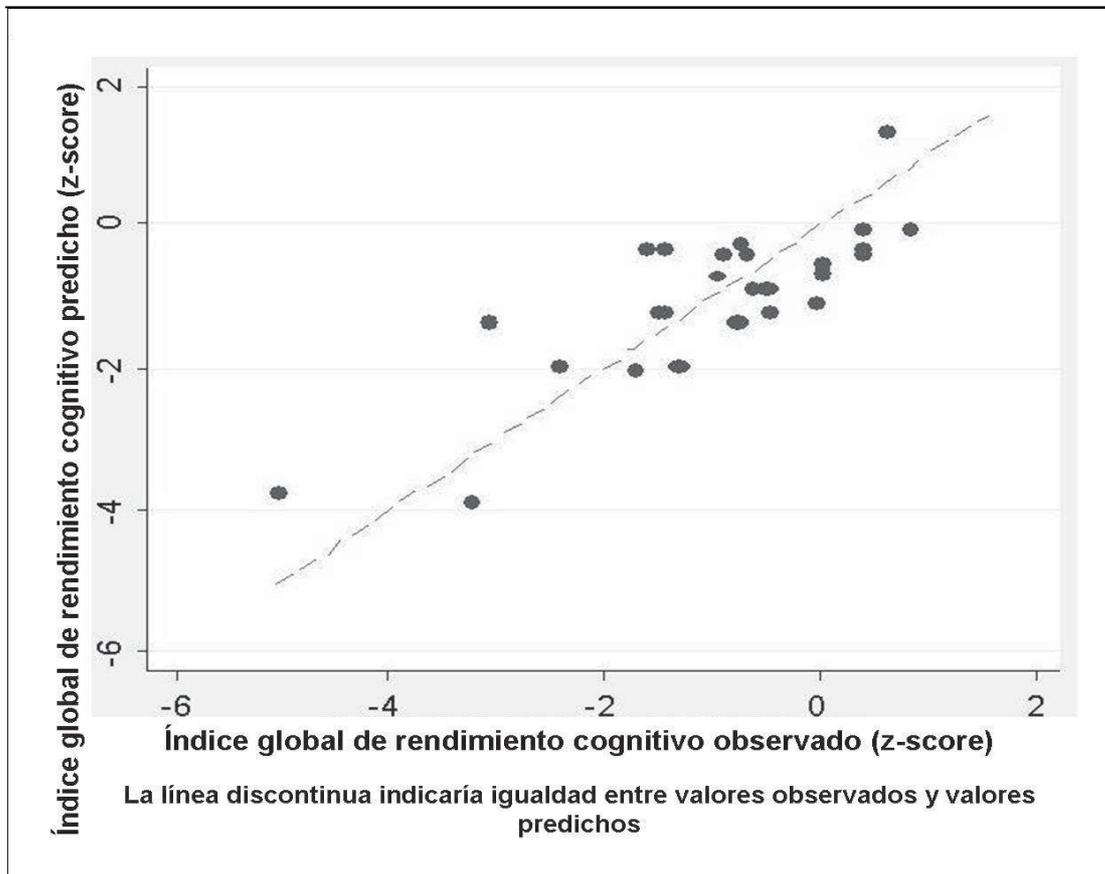
Parámetros de RM	Media (DE)
Media de MTR en SG (pu)	32,271 (1,286)
Moda de MTR en la SG (pu)	33,504 (0,913)
Pico máximo asociado a la moda de MTR en SG (pv)	0,010 (0,001)
Media de MTR en SBAN (pu)	37,789 (0,739)
Moda de MTR en SBAN (pu)	38,108 (0,741)
Pico máximo asociado a la moda de MTR en SBAN (pv)	0,017 (0,002)
Volumen de lesiones en T2 (ml)	31,584 (27,45)
Volumen de SG (porcentaje de la fracción de SG, %)	45,637 (1,935)
Volumen de SBAN (porcentaje de la fracción de SBAN, %)	25,052 (2,088)

*Abreviaturas:* MTR: ratio de la transferencia de magnetización; PU: unidades porcentuales (del inglés, *percentage units*); PV: volúmenes porcentuales (del inglés, *percentage volumes*). SBAN: sustancia blanca de apariencia normal; SG: sustancia gris.

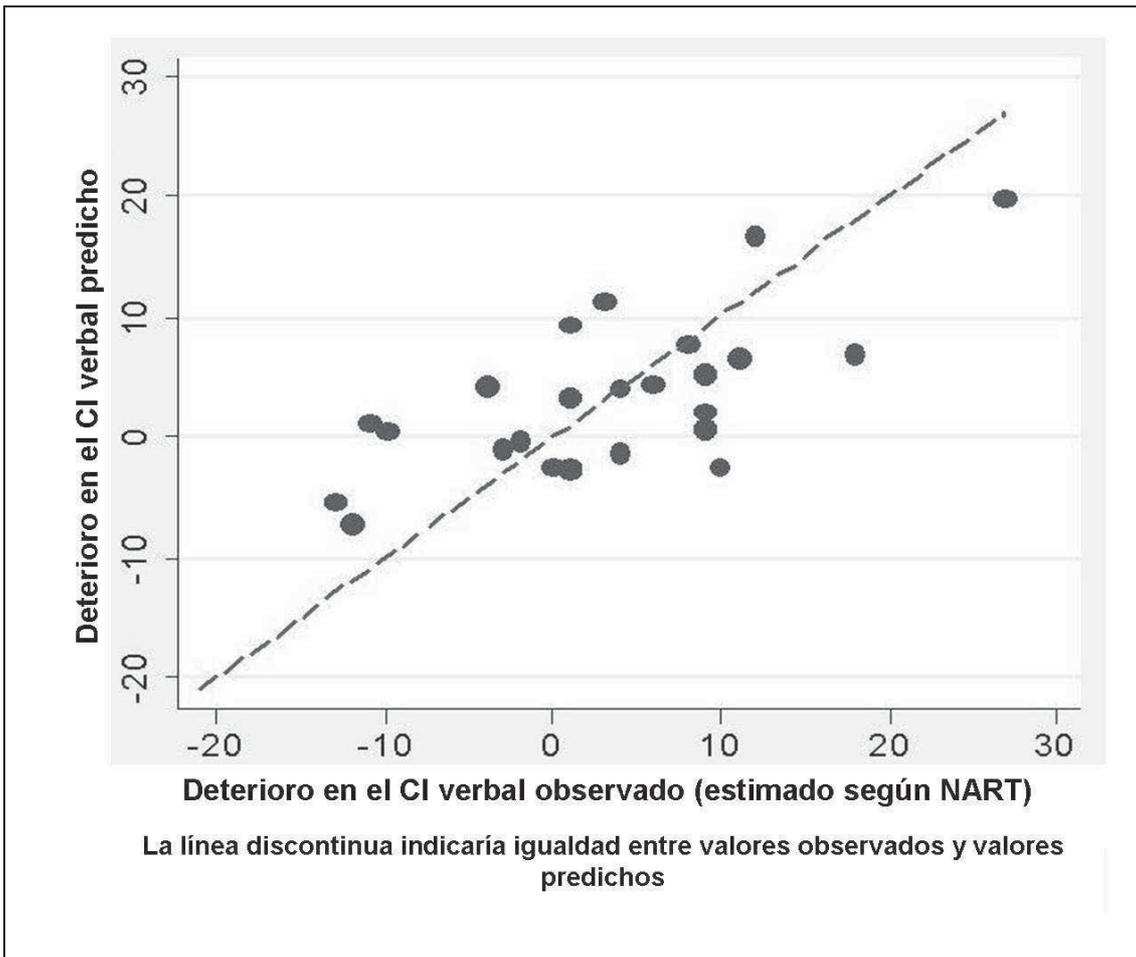
**TABLA VI-3. Variables sociodemográficas que fueron usadas en los modelos de regresión, para cada test cognitivo**

Variables sociodemográficas →	CI premórbido (p valor <sup>a</sup> )	Años de educación (p valor <sup>a</sup> )	Edad (p valor <sup>a</sup> )
<b>Variables cognitivas ↓</b>			
<b>Índice global de rendimiento cognitivo (z-score)</b>	NS	<b>0,030</b>	NS
<b>CI actual</b>			
Verbal	NS	NS	NS
Manipulativo	NS	NS	NS
<b>Deterioro en el CI (estimado)</b>			
Verbal	NS	<b>0,060<sup>b</sup></b>	NS
Manipulativo	NS	NS	NS
<b>Memoria</b>			
Test de la historia: recuerdo inmediato	<b>0,040</b>	<b>0,090</b>	NS
Test de la historia: recuerdo diferido	<b>0,030</b>	<b>0,030</b>	<b>0,020</b>
Test de la figura: recuerdo inmediato	NS	<b>0,006</b>	NS
Test de la figura: recuerdo diferido	NS	<b>0,004</b>	NS
<b>Atención/Velocidad de procesamiento de la información</b>			
PASAT	<b>0,060</b>	NS	NS
SDMT	<b>0,020</b>	NS	<b>0,001</b>
<b>Funciones ejecutivas</b>			
Test de Hayling	NS	NS	NS
Test de Brixton	NS	<b>0,060</b>	NS

a: Los p valores se han obtenido después de realizar un test de correlación de Pearson; b: Correlación negativa: a más años de educación, menor deterioro cognitivo; la variable sexo no se muestra en esta tabla porque no se correlacionó significativamente con ninguna de las variables cognitivas. *Abreviaturas:* PASAT: *Paced Auditory Serial Addition Test*; SDMT: *Symbol Digit Modalities Test*.



**FIGURA VI-1. Índice global de rendimiento cognitivo observado vs. índice predicho en base al modelo final de regresión lineal utilizado.** Esta figura muestra los valores observados del índice global de rendimiento cognitivo versus los valores predichos del mismo índice, en base al modelo final de regresión lineal utilizado en el que se incluyen la moda de MTR de la SG ( $p < 0,001$ ; CCP=0,77) y los años de educación ( $p = 0,008$ ; CCP=0,52). Este modelo explicó el 63% de la varianza del índice global de rendimiento cognitivo.



**FIGURA VI-2. Deterioro observado (estimado) en el CI verbal vs. deterioro predicho en base al modelo final de regresión lineal utilizado.** Esta figura muestra los valores observados (o estimados a partir del NART) del deterioro del CI verbal versus los valores de deterioro del CI verbal predichos a partir del modelo final de regresión lineal utilizado en que incluyen la media de MTR de la SG ( $p=0,001$ ;  $CCP=-0,62$ ) y los años de educación ( $p=0,04$ ;  $CCP=-0,42$ ). Este modelo explicó el 42% de la varianza del empeoramiento del CI verbal.

**TABLA VI-4. Asociaciones significativas entre las variables de RM y las variables cognitivas: modelos finales de regresión<sup>a</sup>**

	Variables cognitivas				
	Índice global de rendimiento cognitivo (z-score)	Deterioro estimado del CI verbal	Memoria verbal diferida (test de la historia: recuerdo diferido)	Velocidad de procesamiento de la información (SDMT)	Funciones ejecutivas (test de Hayling)
<b>Variables sociodemográficas y de RM</b>					
<b>MTR de la SG</b>	1,02 (0,65; 1,40); p<0,001; CCP=0,77 (para la moda de MTR)	-4,13 (-6,44; -1,83); p=0,001; CCP=-0,62 (para la media de MTR)	-	-	3023,71 (2041,43; 4005,98); p<0,001; CCP=0,79 (para el pico asociado a la moda de MTR)
<b>Volumen de SBAN (fracción de volumen, %)</b>	-	-	-	0,53 (0,32; 0,74) p<0,001 CCP=0,74	-
<b>Volumen de lesiones en T2 (ml)</b>	-	-	-0,19 (-0,33; -0,06); p=0,007; CCP=-0,55	-	-
<b>Años de educación</b>	0,16 (0,05; 0,28); p=0,008; CCP=0,52	-1,11 (-2,18; -0,05); p=0,042; CCP=-0,42	2,03 (0,86; 3,2); p=0,002; CCP=0,62	-	-
<b>Edad (años)</b>	-	-	0,51 (0,15; 0,87); p=0,008; CCP=0,54	0,09 (0,05; 0,13); p<0,001; CCP=0,72	-
<b>Puntuación de ansiedad según la HADS</b>	-	-	-1,08 (-1,93; -0,24); p=0,015; CCP=-0,50	-	-
<b>Variables adicionales<sup>b</sup></b>					
<b>Intervalo entre la RM cerebral y la evaluación cognitiva (días)</b>	-0,02 (-0,10; 0,07); p=0,693	0,04 (-0,55; 0,64); p=0,882	-0,004 (-0,04; 0,03); p=0,811	-0,02 (-0,04; 0,01); p=0,167	-0,04 (-0,1; 0,03); p=0,246
<b>T, interacción (variable de RM x intervalo)</b>	0,0005 (-0,002; 0,003); p=0,701	-0,001 (-0,02; 0,02); p=0,876	0,0002 (-0,001; 0,001); p=0,726	0,001 (-0,0003; 0,002); p=0,169	3,26 (-2,92; 9,44); p=0,290

**a:** La tabla expone los coeficientes de regresión (con el intervalo de confianza al 95% entre paréntesis) y el p valor para cada variable independiente dentro del modelo correspondiente; **b:** El hecho de que los valores de p no sean significativos para ninguna de estas variables adicionales quiere decir que el intervalo entre la realización de la RM y la evaluación cognitiva no contribuyó de forma significativa en los resultados. *Abreviaturas:* CCP: coeficiente de correlación parcial; HADS: escala de ansiedad y depresión hospitalaria (del inglés, *Hospital Anxiety and Depression Scale*); SBAN: sustancia blanca de apariencia normal; SDMT: *Symbol Digit Modalities Test*; SG: sustancia gris.

Tal como se esperaba, los análisis post-hoc realizados en los subgrupos de pacientes con intervalos entre la evaluación cognitiva y la RM de 180 o 90 días como máximo confirmaron los resultados observados en el grupo global de pacientes (**TABLA VI-5** y **TABLA VI-6**). Las variables de RM que se asociaron de forma más importante a la función cognitiva o al rendimiento en los diferentes test continuaron siendo significativas a pesar del menor número de sujetos incluidos en los modelos.

La **TABLA VI-7** expone de forma resumida los resultados más relevantes del estudio.

**TABLA VI-5. Asociaciones significativas entre las variables de RM y las variables cognitivas: modelos finales de regresión<sup>a</sup> – Subgrupo de pacientes con un intervalo máximo entre RM y evaluación cognitiva de 180 días (N=17)**

	Variables cognitivas				
	Índice global de rendimiento cognitivo (z-score)	Deterioro estimado del CI verbal	Memoria verbal diferida (test de la historia: recuerdo diferido)	Velocidad de procesamiento de la información (SDMT)	Funciones ejecutivas (test de Hayling)
<b>Variables sociodemográficas y de RM</b>					
<b>MTR de la SG</b>	1,07 (0,63; 1,51); p<0,001; CCP=0,81 (para la moda de MTR)	-4,23 (-6,37; -2,1); p=0,001; CCP=-0,77 (para la media de MTR)	-	-	2696,68 (1626,1; 3767,26); p<0,001; CCP=0,81 (para el pico asociado a la moda de MTR)
<b>Volumen de SBAN (fracción de volumen, %)</b>	-	-	-	0,41 (0,10; 0,72); p=0,013; CCP=0,62	-
<b>Volumen de lesiones en T2 (ml)</b>	-	-	-0,18 (-0,38; 0,01); p=0,057; CCP=-0,52	-	-
<b>Años de educación</b>	0,19 (0,06; 0,32); p=0,008; CCP=0,63	-1,6 (-2,73; -0,46); p=0,010; CCP=-0,64	1,51 (-0,24; 3,27); p=0,084; CCP=0,48	-	-
<b>Edad (años)</b>	-	-	0,48 (-0,07; 0,04); p= 0,083; CCP=0,48	0,07 (0,02; 0,13); p=0,017; CCP=0,61	-
<b>Puntuación de ansiedad según la HADS</b>	-	-	-1,29 (-2,78; 0,19); p= 0,082; CCP=-0,48	-	-

a: La tabla expone los coeficientes de correlación (con el intervalo de confianza al 95% entre paréntesis) y el p valor para cada variable independiente dentro del modelo correspondiente. *Abreviaturas*: CCP: coeficiente de correlación parcial; HADS: escala de ansiedad y depresión hospitalaria (del inglés, *Hospital Anxiety and Depression Scale*); SBAN: sustancia blanca de apariencia normal; SDMT: *Symbol Digit Modalities Test*; SG: sustancia gris.

**TABLA VI-6. Asociaciones significativas entre las variables de RM y las variables cognitivas: modelos finales de regresión<sup>a</sup> – Subgrupo de pacientes con un intervalo máximo entre RM y evaluación cognitiva de 90 días (N=14)**

	Variables cognitivas				
	Índice global de rendimiento cognitivo (z-score)	Deterioro estimado del CI verbal	Memoria verbal diferida (test de la historia: recuerdo diferido)	Velocidad de procesamiento de la información (SDMT)	Funciones ejecutivas (test de Hayling)
<b>Variables sociodemográficas y de RM</b>					
<b>MTR de la SG</b>	1,10 (0,64; 1,57); p<0,001; CCP=0,85 (para la moda de MTR)	-4,73 (-7,26; -2,20); p=0,002; CCP=-0,80 (para la media de MTR)	-	-	2736,38 (1574,62; 3898,15); p<0,001; CCP=0,83 (para el pico asociado a la moda de MTR)
<b>Volumen de SBAN (fracción de volumen, %)</b>	-	-	-	0,40 (0,02; 0,78), p=0,04; CCP=0,60	-
<b>Volumen de lesiones en T2 (ml)</b>	-	-	-0,16 (-0,41; 0,08); p=0,165; CCP=-0,45	-	-
<b>Años de educación</b>	0,23 (0,08; 0,38); p=0,006; CP=0,72	-2,02 (-3,30; -0,74); p=0,006; CCP=-0,74	1,63 (-0,54; 3,81); p=0,124; CCP=0,49	-	-
<b>Edad (años)</b>	-	-	0,6 (-0,19; 1,38); p=0,120; CCP=0,50	0,05 (-0,02; 0,13); p=0,146; CCP=0,45	-
<b>Puntuación de ansiedad según la HADS</b>	-	-	-1,53 (-3,6; 0,54); p=0,128; CCP=-0,49	-	-

a: La tabla expone los coeficientes de correlación (con el intervalo de confianza al 95% entre paréntesis) y el p valor para cada variable independiente dentro del modelo correspondiente. *Abreviaturas:* CCP: coeficiente de correlación parcial; HADS: escala de ansiedad y depresión hospitalaria (del inglés, *Hospital Anxiety and Depression Scale*); SBAN: sustancia blanca de apariencia normal; SDMT: *Symbol Digit Modalities Test*; SG: sustancia gris.

**TABLA VI-7. Tabla resumen con los resultados más relevantes del primer estudio**

<b>RESULTADOS MÁS RELEVANTES</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Los parámetros relacionados con el daño en la SG (parámetros de MTR en SG) fueron los que mejor explicaron la presencia de un bajo índice global de rendimiento cognitivo, un mayor empeoramiento del CI verbal y una peor realización en tareas de función ejecutiva (concretamente, en el <i>Hayling test</i>).</li><li>➤ Un parámetro relacionado con el daño en la SBAN (pérdida de volumen en SBAN) fue el que mejor explicó una peor realización en tareas de atención y velocidad de procesamiento de la información (concretamente, en SDMT).</li><li>➤ El volumen de lesiones en T2 fue el parámetro que mejor explicó una peor realización en tareas de memoria (concretamente, en un test de memoria diferida).</li></ul>

*Abreviaturas:* CI: cociente intelectual; SBAN: sustancia blanca de apariencia normal; SDMT: *Symbol Digit Modalities Test*; SG: sustancia gris.

## **1.2. Relevancia de los resultados del primer estudio**

- En este estudio se investigó la relación existente entre diversas variables de imagen obtenidas mediante técnicas cuantitativas de RM, permitiéndonos así acercarnos mucho más al sustrato patológico de la enfermedad que con técnicas más convencionales de RM, y diferentes parámetros cognitivos en una cohorte de EMPP establecida.
- Con este estudio hemos puesto de manifiesto el papel preponderante de la afectación de la SG en el deterioro cognitivo en estos pacientes. Quizás este sea el dato más remarcable de este primer trabajo y apoyaría la idea de que la afectación de la SG es especialmente relevante en fases más avanzadas de la enfermedad, ya que este

trabajo se ha llevado a cabo en una cohorte de EMPP establecida.

- También con este estudio hemos descrito la importancia de realizar una evaluación global del daño tisular a la hora de explorar el sustrato patológico de la afectación cognitiva. Los parámetros de RM utilizados en este estudio describían daño tisular a diferentes niveles y hemos podido observar cómo este daño a diferentes niveles se correlacionaba con un tipo específico de afectación cognitiva. Si bien estos resultados deben confirmarse con nuevos y más amplios estudios, sí nos ofrecen una idea de la complejidad de la afectación cognitiva en la EM y concretamente en la EMPP.

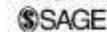
### **1.3. Limitaciones del primer estudio**

- La principal limitación del estudio fue la existencia de un largo intervalo entre la evaluación cognitiva y la realización de la RM. No obstante, cuando llevamos a cabo los modelos finales de regresión introduciendo el término de interacción “variable de RM x intervalo entre RM y evaluación neuropsicológica” pudimos observar que el intervalo no estaba afectando de forma significativa a la relación existente entre la variable de RM y la variable cognitiva. Además, los análisis post-hoc realizados mostraron que las variables de RM que habían resultado estar significativamente asociadas con el variable cognitiva lo seguían estando cuando solo se tenían en cuenta los pacientes con un menor intervalo entre la exploración cognitiva y la RM.
- Otra limitación del estudio fue el bajo número de pacientes estudiados.
- Finalmente, el hecho de que no dispusiéramos de un grupo control para comparar los datos de RM del grupo de pacientes fue otra de las limitaciones del estudio.

## Grey matter damage and overall cognitive impairment in primary progressive multiple sclerosis

C Tur<sup>1,2</sup>, S Penny<sup>3</sup>, Z Khaleeli<sup>1</sup>, DR Altmann<sup>3,4</sup>, L Cipelotti<sup>3</sup>, M Ron<sup>3</sup>, AJ Thompson<sup>1</sup> and O Ciccarelli<sup>1</sup>

Multiple Sclerosis Journal  
17(11) 1324–1332  
© The Author(s) 2011  
Reprints and permissions:  
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav  
DOI: 10.1177/1352458511410341  
msj.sagepub.com



### Abstract

**Objectives:** To identify associations between cognitive impairment and imaging measures in a cross-sectional study of patients with primary progressive multiple sclerosis (PPMS).

**Methods:** Neuropsychological tests were administered to 27 patients with PPMS and 31 controls. Patients underwent brain conventional magnetic resonance imaging (MRI) sequences, volumetric scans and magnetization transfer (MT) imaging; MT ratio (MTR) parameters, grey matter (GM) and normal-appearing white matter (NAWM) volumes, and WM T2 lesion load (T2LL) were obtained. In patients, multiple linear regression models identified the imaging measure associated with the abnormal cognitive tests independently from the other imaging variables. Partial correlation coefficients (PCC) were reported.

**Results:** Patients performed worse on tests of attention/speed of visual information processing, delayed verbal memory, and executive function, and had a worse overall cognitive performance index, when compared with controls. In patients, a lower GM peak location MTR was associated with worse overall cognitive performance ( $p < 0.001$ ,  $PCC = 0.77$ ). GM mean and peak height MTR showed the strongest association with the estimated verbal intelligence quotient (IQ) decline ( $p < 0.001$ ,  $PCC = -0.62$ ), and executive function ( $p < 0.001$ ,  $PCC = 0.79$ ). NAWM volume was associated with attention/speed of visual information processing ( $p < 0.001$ ,  $PCC = 0.74$ ), while T2LL was associated with delayed verbal memory ( $p = 0.007$ ,  $PCC = -0.55$ ).

**Conclusions:** The finding of strong associations between GM MTR, NAWM volume and T2LL and specific cognitive impairments suggests that models that predict cognitive impairment in PPMS should include comprehensive MRI assessments of both GM and WM. However, GM MTR appears to be the main correlate of overall cognitive dysfunction, underlining the role of abnormal GM integrity in determining cognitive impairment in PPMS.

### Keywords

progressive, MRI, multiple sclerosis

Date received: 10th November 2010; revised: 18th February 2011; accepted: 20th April 2011

### Introduction

Cognitive dysfunction in primary progressive multiple sclerosis (PPMS) is present in about 30% of patients;<sup>1–4</sup> it affects a number of domains, notably memory, attention/speed of information processing, and executive function. Previous studies have investigated the structural correlates of cognitive dysfunction in patients with relapse-onset multiple sclerosis, and suggested that parameters reflecting pathological abnormalities in either the white matter (WM),<sup>5,6</sup> grey matter (GM),<sup>7</sup> or both,<sup>8</sup> have a role in determining cognitive dysfunction in specific domains. In PPMS, T2 and T1 lesion loads have been more strongly correlated with poor performance on memory and attention tasks

compared with brain volume,<sup>1–3</sup> while total brain atrophy<sup>1,2</sup> and diffuse WM damage<sup>3</sup> correlated with

<sup>1</sup>Department of Brain Repair and Rehabilitation, UCL Institute of Neurology, London, UK.

<sup>2</sup>Clinical Neuroimmunology Unit, Multiple Sclerosis Centre of Catalonia (CEM-Cat), Department of Medicine, Autonomous University of Barcelona, CARM-Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain.

<sup>3</sup>Department of Neuroinflammation, UCL Institute of Neurology, London, UK.

<sup>4</sup>Medical Statistics Unit, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK.

### Corresponding author:

Dr Olga Ciccarelli, Department of Brain Repair and Rehabilitation, UCL Institute of Neurology, Queen Square, London WC1N 3BG, UK  
Email: o.ciccarelli@ion.ucl.ac.uk

complex reasoning ability, an aspect of executive function. However, the contribution of GM damage in the development of cognitive impairment in PPMS remains to be determined.

Recently, we reported that baseline T2 lesions and GM magnetization transfer ratio (MTR) in early PPMS predicted overall cognitive function and attention/speed of information processing, respectively, assessed 5 years later.<sup>9</sup> MTR reflects the exchange of magnetization between protons that are freely mobile and those associated with macromolecules, such as in myelin or axonal membranes,<sup>10</sup> and, therefore, it has the potential to reflect in vivo pathological changes occurring in myelin and axons.

In this study, we investigated MTR in both GM and normal-appearing WM (NAWM), T2 lesion load, and GM and NAWM tissue volumes in the same cohort of patients with PPMS, 5 years from study entry. The aim was to identify the strongest association between imaging measures of WM and GM and cognitive impairment.

## Methods

### Subjects

In total, 27 patients with definite PPMS<sup>11</sup> (mean age 51.73 years (range 31–68), 15 males), who participated in a longitudinal study previously described,<sup>12</sup> were invited to undergo an imaging protocol, and perform neuropsychological tests, 5 years after study entry. The median time between the cognitive and imaging assessments was 15 days (range: -190, 762 days) (this range indicates that some patients had neuropsychological assessment before the magnetic resonance imaging (MRI) scan, whilst others afterwards). Additional information on patients' characteristics (e.g. clinical and socio-demographic characteristics) depression scores, anxiety scores, employment status, cognitive profile) is given in e-Table 1.

Some 31 healthy controls underwent the neuropsychological assessment, but did not undergo the imaging protocol. The imaging data from a different group of healthy controls previously reported<sup>13</sup> was used for comparison.

Exclusion criteria for all subjects included history of other neurological or systemic illness that could have impaired cognition, psychiatric illness, head injury resulting in loss of consciousness and alcohol or drug abuse.

This study was approved by the Ethics Committee of the National Hospital for Neurology and Neurosurgery and Institute of Neurology and all participants gave written informed consent.

### Clinical assessment

Patients were scored on the Kurtzke's Expanded Disability Status Scale (EDSS)<sup>14</sup> and the Multiple

**Table 1.** Magnetic resonance imaging data in patients

MRI measures	All patients <i>n</i> = 27 Mean (SD)
GM mean MTR (PU)	32.271 (1.286)
GM PL MTR (PU)	33.504 (0.913)
GM PH MTR (PV)	0.01 (0.001)
NAWM mean MTR (PU)	37.789 (0.739)
NAWM PL MTR (PU)	38.108 (0.741)
NAWM PH MTR (PV)	0.017 (0.002)
T2 lesion load (ml)	31.584 (27.45)
GM volume (percentage GM fraction, %)	45.637 (1.935)
NAWM volume (percentage NAWM fraction, %)	25.052 (2.088)

GM, grey matter; NAWM, normal-appearing white matter; MTR, magnetization transfer ratio; PL, peak location; PH, peak height; PU, percentage units; PV, percentage volumes.

Sclerosis Functional Composite (MSFC).<sup>15</sup> Corrected visual acuity was tested using a near visual acuity chart at 40 cm (Precision Vision, La Salle, IL, USA).

### Neuropsychological assessment

A neuropsychological test battery similar to that used in our previous studies<sup>6,16</sup> was administered once to all subjects by a trained psychologist (SP): 1) premorbid IQ was estimated using The National Adult Reading Test (NART)<sup>17</sup> and current IQ was assessed with the Wechsler Adult Intelligence Scale – Revised (WAIS-R).<sup>18</sup> Four verbal subtests (Vocabulary, Digit Span, Arithmetic, Similarities) and three performance subtests (Picture Completion, Picture Arrangement, Block Design) were used to calculate Verbal, Performance, and Full Scale IQ scores. To obtain an index of IQ decline, the estimated current IQ (WAIS IQ) was subtracted from the estimated premorbid IQ (NART IQ). A positive value indicated a decline in current IQ compared with premorbid estimate.<sup>9,17</sup> 2) Verbal and visual recall memory were assessed using the immediate and delayed (30 min) versions of the Story and Figure Recall subtests of the Adult Memory and Information Processing Battery.<sup>19</sup> 3) Attention and speed of information processing were assessed using the Paced Auditory Serial Addition Test (PASAT) (3-s version)<sup>20</sup> and the Symbol Digit Modalities Test (SDMT).<sup>21</sup> The written version of the SDMT was used in all patients except in those with ataxia or dysarthria, in whom the oral version was administered. 4) Executive functions were assessed using the Hayling Sentence Completion Task,<sup>22</sup> a test of verbal response generation and

inhibition, and the Brixton Spatial Anticipation Test,<sup>22</sup> a spatial reasoning and rule detection and rule change task.

Subjects had not previously been tested neuropsychologically, with the exception of the PASAT, which had been administered to patients on several occasions. Subjects with corrected visual acuity less than 6/24 were not given the performance IQ subtests, the figure recall test or the SDMT.

The raw scores on each test, except current and premorbid IQ estimates, were converted to *z*-scores using the scores from the control group as a reference. *z*-scores were multiplied by -1 when appropriate, so that lower scores were always indicative of poorer performance. To equate the scores of the oral and written versions of the SDMT, the raw scores were first converted to a *z*-score with reference to published norms,<sup>23</sup> which allowed us to put the raw scores from these two versions on a single scale. These first *z*-scores were then converted to new *z*-scores with reference to our control group.

Finally, an index of overall cognitive performance was obtained by averaging the calculated *z*-scores;<sup>23</sup> this methodology has been used in a previous paper.<sup>9</sup> All subjects were assessed for current symptoms of anxiety and depression using the Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS).<sup>24</sup> Anxiety and depression were considered to be clinically significant when scores of 11 or more were achieved.

### MR image acquisition and processing

All patients underwent a whole brain MRI scan, which was performed on a 1.5-Tesla GE Signa scanner. The following sequences were acquired and analysed, as previously described.<sup>12,25</sup> In summary:

1. Magnetization transfer (MT) sequence, which consisted of a 2D dual echo spin-echo (SE) sequence, interleaving proton density (PD) and T2-weighted images (28 contiguous axial slices, repetition time (TR) 1720 ms, echo time (TE) 30/80 ms, number of excitations 0.75, acquired matrix 256 × 128, reconstructed matrix 256 × 256, field of view 240 × 240 mm). To calculate the MTR images, both echoes were acquired with and without an MT pre-saturation.<sup>25,26</sup> The T2 lesion volume was obtained on PD-weighted images, with reference to the T2 images.<sup>27</sup> From the MTR maps, the normalized MTR histogram (bin width, 0.1 percentage unit; smoothing window, 0.3 percentage unit) parameters (i.e. mean, peak location and peak height) for GM and NAWM were obtained.<sup>12</sup>
2. 3D inversion-prepared fast-spoiled gradient recall (FSPGR) images (124 contiguous axial slices, TR

13.3 ms, TE 4.2 ms, inversion time 450 ms, matrix 256 × 160 (reconstructed matrix 256 × 256, final in-plane resolution 1.17 × 1.17 mm), field of view 300 × 225 mm, slice thickness 1.5 mm).<sup>25</sup> SPM2 (Statistical Parametric Mapping; Wellcome Department of Cognitive Neurology) was used for segmenting the NAWM and the GM, by setting a threshold of 0.75.<sup>12</sup> Firstly, binary lesion masks were applied to the tissue probability maps. To obtain normalized volumes, GM and NAWM volumes were divided by the total intracranial volume (sum of GM, NAWM, lesion and cerebrospinal fluid volumes). Finally, these volumes were multiplied by 100 to produce percentage GM and NAWM fractions.<sup>12</sup>

### Statistical analysis

Stata version 9.2 (Stata Corporation, College Station, Texas, USA) was used to perform the statistical analysis. A *p* value of < 0.05 was taken as significant.

Socio-demographic and clinical variables were compared using chi-squared tests, *t*-tests and Mann-Whitney rank sum tests as appropriate.

Neuropsychological test scores were compared between the two groups using multiple linear regression models (one regression model for each neuropsychological test), considering performance scores on each test as the dependent variable, and including the following explanatory variables: a group indicator (patient vs. control group), age, years of education and premorbid IQ. As the objective of the study was to identify the imaging variables with the strongest, independent correlation with cognitive impairment, only those tests in which patients performed significantly worse, or showed a trend towards poorer performance, i.e. when the *p* value was < 0.1, compared with controls, were entered into the next step of the analysis.

The comparisons of imaging measures between patients and a different group of healthy controls, who were not studied in this paper, have been previously reported.<sup>13</sup> The association between MRI parameters and cognitive impairment at 5-year follow-up was assessed using multiple linear regression models, considering each cognitive test, in turn, as the dependent variable. Explanatory variables were entered singly into each model, and included: (i) MRI measures (i.e. MTR parameters of GM and NAWM, GM and NAWM volumes, and WM T2 lesion load); (ii) socio-demographical variables (i.e. age, gender, premorbid IQ and years of education), only if they correlated (based on a Pearson's correlation test previously performed) with the performance on each test with a *p* < 0.1. The MRI variables found to be individually significant were entered together in a subsequent model, in which the significant socio-demographical variables, the EDSS

and the HADS anxiety and depression scores were entered as covariates. This model identified the MRI variables independently associated with the cognitive performance, in the sense that their associations with the outcome are not due to confounding associations between the explanatory variables; the resulting partial correlation coefficients (PCC) give a measure of the relative strengths of these independent associations between predictors and outcome.<sup>28</sup>

We dealt with the possible effect of the different intervals between the neuropsychological and the MRI assessments on the relationship between cognitive and imaging variables as follows. First, the duration of the interval was included in the model together with an interaction term 'MRI variable  $\times$  interval'. Secondly, two post-hoc analyses were performed including only those patients with 'short' intervals. Two different cut-off points of 180 and 90 days were arbitrarily chosen to define a 'short' interval. Some 17 patients had an interval of 180 days or less, and 14 an interval of 90 days or less. The final multiple linear regression models obtained for the whole group were re-run using only the two groups of patients with 'short' intervals. The percentage of the variance in performance on the test which was explained by the independent variables in the model was obtained by multiplying the adjusted-*R* squared by 100. Residuals from the final models were checked for normality and outliers.

## Results

No significant differences were observed between patients and controls in age, gender, years of education or premorbid IQ<sup>9</sup> (e-Table 1). Patients scored significantly worse than controls in the overall cognitive index, and this was accounted for by their worse scores in the following four cognitive domains (e-Table 1): (i) current IQ and estimated decline in verbal IQ, (ii) attention/speed of information processing (the SDMT), (iii) verbal memory (the delayed Story Recall test), and (iv) executive function (the Hayling test).

### Association between imaging parameters and cognitive impairment

The MRI data in the patient group are given in Table 1. The socio-demographic variables (i.e., age, premorbid IQ and years of education) which correlated with the cognitive tests and, therefore, were used in the regression analysis, are summarized in e-Table 2.

Regarding GM MTR, the significant results of the multiple linear regression models run in patients are summarized in Table 2 and showed that: (i) a lower GM peak location MTR was associated with worse overall cognitive performance ( $p < 0.001$ , PCC = 0.77),

and the model, which included years of education ( $p = 0.008$ , PCC = 0.52), explained 63% of the variance in overall cognitive performance (Figure 1); (ii) a lower GM mean MTR was associated with greater decline of verbal IQ ( $p = 0.001$ , PCC = -0.62), and the model, which again included years of education ( $p = 0.04$ , PCC = -0.42), explained 42% of the variance in the decline of verbal IQ (Figure 2); (iii) GM peak height (PH) MTR was associated with worse executive function and it explained 61% of the variance in Hayling test performance ( $p < 0.001$ , PCC = 0.79).

With regard to the NAWM measures, a lower NAWM volume was associated with worse attention/speed of information processing ( $p < 0.001$ , PCC = 0.74), and the model, which included age ( $p < 0.001$ , PCC = 0.72), explained 69% of the variance in SDMT performance.

Finally, a higher T2 lesion load was associated with worse delayed verbal recall memory ( $p = 0.007$ , PCC = -0.55) and the model, which also included years of education ( $p = 0.002$ , PCC = 0.62), age ( $p = 0.008$ , PCC = 0.54) and HADS anxiety ( $p < 0.02$ , PCC = -0.50), explained 65% of the variance on this test.

For all the models, neither the interval between neuropsychological and MRI assessments nor the interaction term 'MRI variable  $\times$  interval' were significant (Table 2). Importantly, the post-hoc analyses performed with the subgroup of patients whose delay between the cognitive assessment and the MRI performance was, at the longest, of 180 days or 90 days, confirmed the results observed in the whole cohort (e-Table 3 and e-Table 4). The MR variables that had been found to be the best correlates for each cognitive test and for overall cognitive performance remained significant, despite the lower numbers of patients.

## Discussion

GM MTR shows the strongest, independent association with overall cognitive performance in our patients. The strong correlation between GM peak location MTR and the index of overall cognitive function persisted when GM volume and the other WM parameters were added to the regression model. This confirms the role of GM integrity in determining cognitive dysfunction in patients with PPMS, as has been previously suggested in relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) and secondary progressive multiple sclerosis (SPMS).<sup>7,29,30</sup>

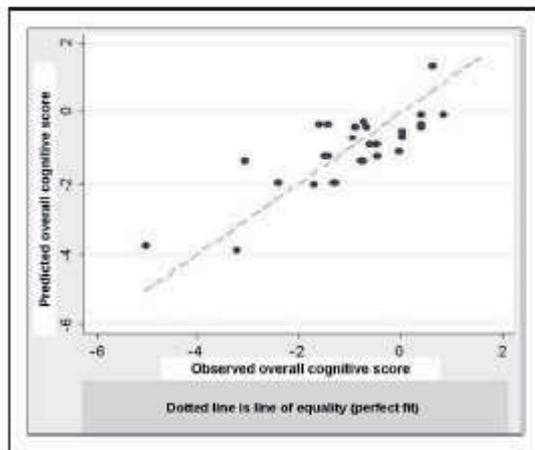
GM MTR was also the MRI measure that best accounted for performance on a test of executive function and the decline in verbal IQ, suggesting that disruption of GM integrity plays a crucial role in the cognitive performance of our patients. In addition, the association between GM peak height MTR and

**Table 2.** Significant associations between the magnetic resonance imaging measures, the socio-demographic and additional variables and the cognitive test performance (Regression Coefficients, 95% Confidence Intervals and *p* values are given)

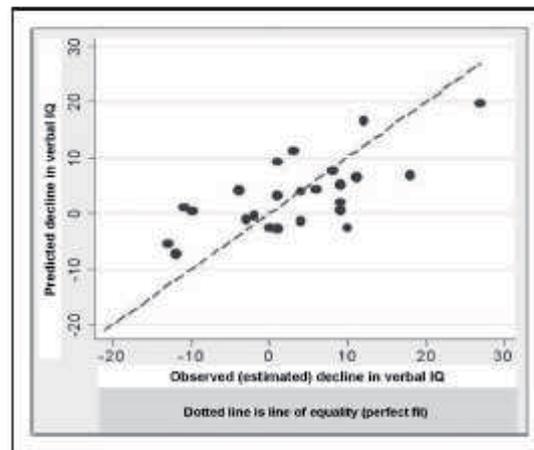
	COGNITIVE TESTS				
	Overall cognitive z-score	Estimated decline in verbal IQ	Verbal memory (delayed story recall test)	Speed of information processing (SDMT)	Executive function (Hayling)
<b>MRI and SOCIO-DEMOGRAPHIC VARIABLES</b>					
GM MTR	1.02 (0.65, 1.40)  <i>p</i> < 0.001 PCC = 0.77 (for MTR peak location)	-4.13 (-6.44, -1.83)  <i>p</i> = 0.001 PCC = -0.62 (for MTR Mean)	-	-	3023.71 (2041.43, 4005.98)  <i>p</i> < 0.001 PCC = 0.79 (for MTR peak height)
PNAWMF (%)	-	-	-	0.53 (0.32, 0.74) <i>p</i> < 0.001 PCC = 0.74	-
T2 LESION LOAD (mL)	-	-	-0.19 (-0.33, -0.06) <i>p</i> = 0.007 PCC = -0.55	-	-
Years of education	0.16 (0.05, 0.28) <i>p</i> = 0.008 PCC = 0.52	-1.11 (-2.18, -0.05) <i>p</i> = 0.042 PCC = -0.42	2.03 (0.86, 3.2) <i>p</i> = 0.002 PCC = 0.62	-	-
Age (years)	-	-	0.51 (0.15, 0.87) <i>p</i> = 0.008 PCC = 0.54	0.09 (0.05, 0.13) <i>p</i> < 0.001 PCC = 0.72	-
HADS anxiety	-	-	-1.08 (-1.93, -0.24) <i>p</i> = 0.015 PCC = -0.50	-	-
<b>ADDITIONAL VARIABLES(*)</b>					
Interval between MRI scan and cognitive assessment (days)	-0.02 (-0.10, 0.07) <i>p</i> = 0.693	0.04 (-0.55, 0.64) <i>p</i> = 0.882	-0.004 (-0.04, 0.03) <i>p</i> = 0.811	-0.02 (-0.04, 0.01) <i>p</i> = 0.167	-0.04 (-0.1, 0.03) <i>p</i> = 0.246
Interaction term (MRI variable × interval)	0.0005 (-0.002, 0.003) <i>p</i> = 0.701	-0.001 (-0.02, 0.02) <i>p</i> = 0.876	0.0002 (-0.001, 0.001) <i>p</i> = 0.726	0.001 (-0.0003, 0.002) <i>p</i> = 0.169	3.26 (-2.92, 9.44) <i>p</i> = 0.290

(\*) The non-significant associations between these variables and the cognitive test performance indicates that the interval between MRI and cognitive assessment did not contribute to the final results.

GM, grey matter; SDMT, serial addition modalities test; PCC, Partial correlation coefficients; PNAWMF, percentage normal-appearing white matter fraction; HADS, Hospital Anxiety and Depression Scale.



**Figure 1.** Observed vs. predicted overall cognitive performance. This figure shows observed values of overall cognitive performance (as measured by the overall cognitive score) versus the predicted values, using the final regression model (see the text for details).



**Figure 2.** Observed (estimated) vs. predicted decline in verbal IQ. This figure shows observed values of estimated decline in verbal IQ versus the predicted values, using the final regression model (see the text for details).

executive function showed the highest PCC (0.79), when compared with the other associations. In a previous analysis of MRI changes over a follow-up of 5 years in the same cohort of patients, we reported that GM imaging measures showed the highest rate of worsening over time.<sup>13</sup> If this is considered together with the previously reported evidence of the predictive role of GM MTR in respect to executive function and attention/speed of information processing in the same patients,<sup>9</sup> then the results reported here are not unexpected. In fact, it would seem likely that those with reduced GM MTR at baseline would also have impaired executive function 5 years later. Future studies will determine whether early changes in imaging parameters, such as MTR, will identify populations at risk of significant cognitive dysfunction.

GM damage, as measured by MTR, reflects axonal loss<sup>10</sup> and, possibly to a greater extent, demyelination.<sup>31</sup> Recent evidence also suggests that GM lesions may play an important role in determining cognitive dysfunction in RRMS,<sup>32,33</sup> and future investigations will clarify the role of GM lesions in PPMS. We estimated MTR as one single measure incorporating cortical and deep GM, and it is therefore impossible to separate the contributions of these two compartments to cognitive performance in our patients, who are known to have abnormal MTR values compared with controls.<sup>13</sup> Further studies will be designed to separate the contributions of these two GM compartments to cognitive performance.

In addition, NAWM atrophy and T2 lesion load were significantly associated with concurrent dysfunction in other cognitive domains, suggesting that models

used to explain cognitive impairment in PPMS should include a comprehensive MRI assessment of both GM and WM. Therefore, these findings extend those of our previous predictive study performed in the same cohort of patients, which reported that T2 lesion load, GM MTR and loss of WM and GM volume at study entry predicted cognitive performance at 5-year follow-up.<sup>9</sup>

With regard to NAWM volume, which had been previously shown to be significantly lower in this patient cohort when compared with controls,<sup>13</sup> (these controls were different from those who received a neuropsychological assessment), NAWM atrophy showed the strongest, independent association with performance on the SDMT, the only test assessing attention/speed of visual information processing which was significantly impaired in patients compared with controls. This suggests that the axonal loss<sup>34</sup> in the WM commissural and associative fibres plays an important role in determining dysfunction in this cognitive domain. Since patients did not show worse scores on the PASAT test when compared with controls (probably due to practice effects on the PASAT, which had been administered to this patient cohort on several previous occasions),<sup>12</sup> this test was not regressed on the imaging measures. It will be important in future to assess the contribution of the WM fibres that specifically constitute the two major neural systems involved in attention and related tasks, i.e. the ascending reticular activating system, which exerts the 'bottom-up' modulation of cortical areas, and the 'top-down' system, which exerts the regulation of

some other cortical regions.<sup>35</sup> Combining NAWM volume with measures derived from diffusion-based tractography<sup>36</sup> will offer a unique opportunity to address this question.

WM T2 lesion load was most closely correlated with delayed verbal memory performance, extending results of previous investigations which reported an association between lesions and memory dysfunction in PPMS.<sup>1–3,9</sup> Our results suggest that WM lesions, which are known to be located especially in the periventricular WM regions and corpus callosum,<sup>37,38</sup> interrupt WM commissural and associative fibres, with a consequent deleterious influence on memory task performance. It would be interesting to investigate whether an asymmetric distribution of lesions (for example more lesions in the non-dominant hemisphere) has an impact on verbal memory performance.

An interesting observation based on the reported PCC is that the associations between GM MTR metrics and cognitive tests are stronger than those between years of education and the same cognitive tests, suggesting that education has a substantial impact on cognition that is, however, not stronger than the predictive value of the MTR. Nevertheless, the association between T2 lesion load and verbal memory is weaker than that between years of education and verbal memory, highlighting the importance of taking into account education when investigating the imaging correlates of cognition.

Studies comparing the pattern and severity of cognitive impairment in different MS subtypes have reported more severe impairment in patients with progressive forms of MS than in those with RRMS,<sup>39,40</sup> but few differences between those with PPMS and SPMS.<sup>41</sup> In respect to the mechanisms leading to cognitive dysfunction, GM damage in RRMS, as reflected by cortical thinning, GM lesions and atrophy, seems to play a significant role in determining cognitive impairment,<sup>42,43</sup> although NAWM damage and lesion load may also contribute.<sup>6</sup> Similarly, in the present study, we have demonstrated that GM damage is important in PPMS, possibly beyond and above the contribution of WM pathology.<sup>3</sup> Since RRMS and PPMS are similar in respect to the characteristics of cortical lesion<sup>44</sup> and hippocampal volume,<sup>45</sup> we hypothesize that the factors responsible for differences in both the severity and type of the cognitive impairment between these two forms of MS are either their different disease duration, i.e. patients with PPMS generally have longer disease duration when they are studied than patients with RRMS, their different regional patterns of GM atrophy, or the functional changes occurring in response to tissue damage, involving also the default-mode network, which are known to change according to clinical phenotype.<sup>46–48</sup> Further studies are needed to clarify these important issues.

A limitation of this study is the variable interval between the MRI scan and the neuropsychological assessment. We have tried to explore the impact of this variable and to control for its effects on the associations between imaging and cognitive variables by using stringent statistical methods, and we feel confident that our findings cannot be explained as a result of the variable length of this interval. Reassuringly, a post-hoc analysis performed with the subgroup of patients whose interval between the cognitive assessment and the MRI performance was, at the longest, of 180 days or 90 days, confirmed the results observed in the whole cohort. In addition, the statistical models used in this study were built to be optimal, hence we obtained very significant findings, which need to be validated in new cohorts.

In conclusion, the principal associations with GM MTR, NAWM volume and T2 lesion load suggest that models that predict cognitive impairment in PPMS should include a comprehensive MRI assessment of both GM and WM. GM MTR shows the strongest, independent relationship with overall cognitive dysfunction, suggesting that it makes a crucial contribution to cognitive dysfunction in PPMS.

#### Conflict of interest statement

C Tur was funded by the Multiple Sclerosis International Federation (McDonald Fellowship) and has received honoraria and support for travel from Serono Foundation and Sanofi-Aventis. S Penny and Z Khaleeli were supported by a grant from the Multiple Sclerosis Society of Great Britain and Northern Ireland. This grant also provided funds for scanning and related expenses. DR Altmann reports no conflicts of interest. L Cipolletti and M Ron are staff members of University College London, Institute of Neurology where the research was undertaken. AJ Thompson has received honoraria and support for travel for consultancy, serving on advisory boards, or speaking from Novartis, Eisai, Weleda/Society for Clinical Research, Hoffman La Roche, UCB Pharma, Serono Foundation, Sanofi-Aventis, and the MS Society of GB. He is editor-in-chief of *Multiple Sclerosis* for which he receives an honorarium from Sage Publications. He is also staff member of University College London, Institute of Neurology where the research was undertaken. O Ciccarelli was funded by the Wellcome Trust and receives an honorarium for work as Clinical Editor of *Current Medical Literature – Multiple Sclerosis*.

#### Funding

The MS NMR Research Unit is supported by the MS Society of Great Britain and Northern Ireland. This work was undertaken at UCLH/UCL who received a proportion of funding from the Department of Health's NIHR Biomedical Research Centres funding scheme. C Tur is funded by the Multiple Sclerosis International Federation.

### Acknowledgements

The authors thank the subjects for kindly agreeing to take part in this study. C Tur also thanks Prof Montalban, head of the Multiple Sclerosis Centre of Catalonia (CEM-Cat), Barcelona, Spain, for his help and support.

### References

- Camp SJ, Stevenson VL, Thompson AJ, Miller DH, Borrás C, Auriacombe S, et al. Cognitive function in primary progressive and transitional progressive multiple sclerosis a controlled study with MRI correlates. *Brain* 1999; 122: 1341–1348.
- Camp SJ, Stevenson VL, Thompson AJ, Ingle GT, Miller DH, Borrás C, et al. A longitudinal study of cognition in primary progressive multiple sclerosis. *Brain* 2005; 128: 2891–2898.
- Ukkonen M, Vahvelainen T, Hamalainen P, Dastidar P and Elovaara I. Cognitive dysfunction in primary progressive multiple sclerosis a neuropsychological and MRI study. *Mult Scler* 2009; 15: 1055–1061.
- Wachowius U, Talley M, Silver N, Heinze HJ and Sailer M. Cognitive impairment in primary and secondary progressive multiple sclerosis. *J Clin Exp Neuropsychol* 2005; 27: 65–77.
- Roosendaal SD, Geurts JJ, Vrenken H, Hulst HE, Cover KS, Castelijns JA, et al. Regional DTI differences in multiple sclerosis patients. *Neuroimage* 2009; 44: 1397–1403.
- Summers M, Fisniku L, Anderson V, Miller D, Cipelotti L and Ron M. Cognitive impairment in relapsing-remitting multiple sclerosis can be predicted by imaging performed several years earlier. *Mult Scler* 2008; 14: 197–204.
- Amato MP, Portaccio E, Goretti B, Zipoli V, Battaolini M, Bartolozzi ML, et al. Association of neocortical volume changes with cognitive deterioration in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2007; 64: 1157–1161.
- Sastre-Garriga J, Arevalo MJ, Renom M, Alonso J, Gonzalez I, Galan I, et al. Brain volumetry counterparts of cognitive impairment in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2009; 282: 120–124.
- Penny S, Khaleeli Z, Cipelotti L, Thompson A and Ron M. Early imaging predicts later cognitive impairment in primary progressive multiple sclerosis. *Neurology* 2010; 74: 545–552.
- van Waesberghe JH, Kamphorst W, De Groot CJ, van Walderveen MA, Castelijns JA, Ravid R, et al. Axonal loss in multiple sclerosis lesions magnetic resonance imaging insights into substrates of disability. *Ann Neurol* 1999; 46: 747–754.
- Thompson AJ, Montalban X, Barkhof F, Brochet B, Filippi M, Miller DH, et al. Diagnostic criteria for primary progressive multiple sclerosis a position paper. *Ann Neurol* 2000; 47: 831–835.
- Khaleeli Z, Altmann DR, Cercignani M, Ciccarelli O, Miller DH and Thompson AJ. Magnetization transfer ratio in gray matter a potential surrogate marker for progression in early primary progressive multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2008; 65: 1454–1459.
- Tur C, Khaleeli Z, Ciccarelli O, Altmann DR, Cercignani M, Miller DH, et al. Complementary roles of grey matter MTR and T2 lesions in predicting progression in early PPMS. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011; 82: 423–428.
- Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983; 33: 1444–1452.
- Cutter GR, Baier ML, Rudick RA, Cookfair DL, Fischer JS, Petkau J, et al. Development of a multiple sclerosis functional composite as a clinical trial outcome measure. *Brain* 1999; 122: 871–882.
- Summers M, Swanton J, Fernando K, Dalton C, Miller DH, Cipelotti L, et al. Cognitive impairment in multiple sclerosis can be predicted by imaging early in the disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; 79: 955–958.
- Nelson HE. *The National Adult Reading Test*. Windsor, Berks: NFER-Nelson, 1982.
- Wechsler DA. *Wechsler Adult Intelligence Test-Revised*. London, 1981.
- Coughlan AK and Hollows AK. *The Adult Memory and Information Processing Battery*. Leeds, 1985.
- Rao SM, Leo GJ, Houghton VM, St. Aubin-Faubert P and Bernardin L. Correlation of magnetic resonance imaging with neuropsychological testing in multiple sclerosis. *Neurology* 1989; 39: 161–166.
- Smith A. *Symbol Digit Modalities Test (SDMT) Manual (Revised)*. Los Angeles: Western Psychological Services, 1982.
- Burgess PW and Shallice T. *The Hayling and Brixton Tests*. Bury St Edmunds, UK: Thames Valley Test Company, 1997.
- Strauss E, Sherman EMS and Spreen O. *A Compendium of Neuropsychological Tests: Administration, Norms, and Commentary*, 2nd ed. USA, 2006.
- Snaith RP and Zigmond AS. The hospital anxiety and depression scale. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1986; 292: 344.
- Khaleeli Z, Sastre-Garriga J, Ciccarelli O, Miller DH and Thompson AJ. Magnetisation transfer ratio in the normal-appearing white matter predicts progression of disability over 1 year in early primary progressive multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78: 1076–1082.
- Barker GJ, Tofts PS and Gass A. An interleaved sequence for accurate and reproducible clinical measurement of magnetization transfer ratio. *Magn Reson Imaging* 1996; 14: 403–411.
- Plummer DL. Dispimage: Un mezzo di analisi e presentazione per iconografia medica (Dispimage a display and analysis tool for medical images). *Riv Neuroradiol* 1992; 5: 1715–1720.
- Kendall MG and Stuart A. *The Advanced Theory of Statistics*, 3rd ed. London: Griffin, 1973.
- Houtchens MK, Benedict RH, Killiany R, Sharma J, Jaisani Z, Singh B, et al. Thalamic atrophy and cognition in multiple sclerosis. *Neurology* 2007; 69: 1213–1223.
- Lazeron RH, Boringa JB, Schouten M, Uitdehaag BM, Bergers E, Lindeboom J, et al. Brain atrophy and lesion

- load as explaining parameters for cognitive impairment in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2005; 11: 524–531.
31. Schmierer K, Scaravilli F, Altmann DR, Barker GJ and Miller DH. Magnetization transfer ratio and myelin in postmortem multiple sclerosis brain. *Ann Neurol* 2004; 56: 407–415.
  32. Calabrese M, Agosta F, Rinaldi F, Mattisi I, Grossi P, Favaretto A, et al. Cortical lesions and atrophy associated with cognitive impairment in relapsing–remitting multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2009; 66: 1144–1150.
  33. Roosendaal SD, Moraal B, Pouwels PJ, Vrenken H, Castelijns JA, Barkhof F, et al. Accumulation of cortical lesions in MS relation with cognitive impairment. *Mult Scler* 2009; 15: 708–714.
  34. Miller DH, Barkhof F, Frank JA, Parker GJ and Thompson AJ. Measurement of atrophy in multiple sclerosis pathological basis, methodological aspects and clinical relevance. *Brain* 2002; 125: 1676–1695.
  35. Hodges J. *Cognitive assessment for clinicians*, 2nd ed. New York: OUP, 2007.
  36. Ciccarelli O, Werring DJ, Wheeler-Kingshott CA, Barker GJ, Parker GJ, Thompson AJ, et al. Investigation of MS normal-appearing brain using diffusion tensor MRI with clinical correlations. *Neurology* 2001; 56: 926–933.
  37. Miller DH and Leary SM. Primary-progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2007; 6: 903–912.
  38. Thompson AJ, Kermode AG, MacManus DG, Kendall BE, Kingsley DP and Moseley IF. Patterns of disease activity in multiple sclerosis: Clinical and magnetic resonance imaging study. *Br Med J* 1990; 300: 631–634.
  39. Huijbregts SC, Kalkers NF, de Sonneville LM, de Groot V, Reuling IE and Polman CH. Differences in cognitive impairment of relapsing remitting, secondary, and primary progressive MS. *Neurology* 2004; 63: 335–339.
  40. Huijbregts SC, Kalkers NF, de Sonneville LM, de Groot V and Polman CH. Cognitive impairment and decline in different MS subtypes. *J Neurol Sci* 2006; 245: 187–194.
  41. Foong J, Rozewicz L, Chong WK, Thompson AJ, Miller DH and Ron MA. A comparison of neuropsychological deficits in primary and secondary progressive multiple sclerosis. *J Neurol* 2000; 247: 97–101.
  42. Calabrese M, Agosta F, Rinaldi F, Mattisi I, Grossi P, Favaretto A, et al. Cortical lesions and atrophy associated with cognitive impairment in relapsing–remitting multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2009; 66: 1144–1150.
  43. Calabrese M, Rinaldi F, Mattisi I, Grossi P, Favaretto A, Atzori M, et al. Widespread cortical thinning characterizes patients with MS with mild cognitive impairment. *Neurology* 2010; 74: 321–328.
  44. Calabrese M, Battaglini M, Giorgio A, Atzori M, Bernardi V, Mattisi I, et al. Imaging distribution and frequency of cortical lesions in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 2010; 75: 1234–1240.
  45. Anderson V, Fisniku L, Khaleeli Z, Summers M, Penny S, Altmann D, et al. Hippocampal atrophy in relapsing–remitting and primary progressive MS: A comparative study. *Mult Scler* 2010; 16: 1083–1090.
  46. Riccitelli G, Rocca MA, Pagani E, Rodegher ME, Rossi P, Falini A, et al. Cognitive impairment in multiple sclerosis is associated to different patterns of gray matter atrophy according to clinical phenotype. *Hum Brain Mapp* 2010; Epub ahead of print.
  47. Rocca MA, Colombo B, Falini A, Ghezzi A, Martinelli V, Scotti G, et al. Cortical adaptation in patients with MS a cross-sectional functional MRI study of disease phenotypes. *Lancet Neurol* 2005; 4: 618–626.
  48. Rocca MA, Valsasina P, Absinta M, Riccitelli G, Rodegher ME, Misci P, et al. Default-mode network dysfunction and cognitive impairment in progressive MS. *Neurology* 2010; 74: 1252–1259.

