



Universitat Autònoma de Barcelona

FACULTAT DE MEDICINA

Departament de Medicina

TESI DOCTORAL

UTILIDAD DE LAS MEDIDAS DE ATROFIA CEREBRAL EN
EL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE LA ESCLEROSIS
MÚLTIPLE

Doctorand

Francisco Carlos Pérez Miralles

Directors

Prof. Dr. Xavier Montalban Gairin Dr. Jaume Sastre Garriga

Programa de Doctorat en Medicina Interna

Barcelona, 2015

Cemcat
Centre d'Esclerosi
Múltiple de Catalunya



*A Ana, por caminar a mi lado todos estos años, por tu amor y
apoyo incondicionales.*

A mos pares, a ma tia, al meu germà, a la mare

*“No deben preocuparnos las arrugas del rostro sino las del
cerebro. Estas no las refleja el espejo, pero las perciben
nuestros amigos, discípulos y lectores...”*

Santiago Ramón-Cajal, El Mundo Visto a los Ochenta Años.

Agradecimientos

A Xavier Montalban, director d'aquesta tesi doctoral, i Cap del servei de Neurologia/Neuroimmunologia, per ensenyar-me el significat de l'excel·lència com a filosofia de vida, pels seus consells i per donar-me l'oportunitat de créixer. El meu pas pel Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya (Cemcat) ha deixat ben profunda la seua empremta en mi.

A Jaume Sastre, també director i ànima d'aquesta tesi doctoral, i Sots-director del Cemcat. Gràcies pels teus consells, les teues correccions i el teu *hard-working*. Tire en falta aquelles vesprades de divendres al Montbau amb el Carlos Nos, Xavier i Manolo.

A mis compañeros del Cemcat: Joaquín Castelló, Álex Horga, Mari Carmen Edo y Anka Vidal, así como a Carlos Nos, Mar Tintoré, Jordi Ríó, Ingrid Galán, Manolo Comabella, Álex Rovira, Cristina Auger, María Jesús Arévalo, Georgina Arrambide, Susana Otero, Carmen Tur, Carmen Espejo, Déborah Pareto, Sunny Malhotra, Héctor Perkal, Marta Sallent, Sílvia Soler, María José Vicente, Rosalía Horno, Nicolás Fissolo, Carme Costa, Marta Fernández, Zoraida Castro, Mireia Castillo, Mila Fraga, Elisabeth Morilla, Ilaria Laganà, Josep Graells, Sergio Vergara, Dúnia Muñoz, Juana Fitó. Fue un placer trabajar con vosotros y compartir esfuerzos y amistad.

A Bonaventura Casanova, a qui considere no només mentor, sinó també gran amic. Fou ell qui em va obrir la porta a la Neuroimmunologia i, més concretament, a l'esclerosi múltiple. Mai no podré estar suficientment agraït per les oportunitats que em dona per treure el millor de mi.

A Isabel Boscá, Carmen Alcalá, y Matilde Escutia, por hacer tan agradable el día a día, por la complicidad y por compartir el entusiasmo en lo que hacemos.

A Francisco Coret, Arantxa Navarré y Ana Bernad, por el tiempo compartido en el Hospital Clínic de Valencia.

A Paqui y Berto, por formar parte de mi vida y por su cariño.

A mis amigos, en especial a Óscar e Inma, por todo el cariño y el apoyo de estos años, y por la ilusión que compartimos y que espero se haga realidad pronto.

Índice de contenidos

Abreviaturas	11
1 Introducción	15
1.1 Generalidades sobre esclerosis múltiple.....	17
1.1.1 Epidemiología de la esclerosis múltiple	17
1.1.2 Formas clínicas e historia natural de la esclerosis múltiple	17
1.1.3 Genética de la esclerosis múltiple.....	19
1.1.4 Factores ambientales para el desarrollo de esclerosis múltiple	20
1.1.5 Inmunopatogenia de la esclerosis múltiple	22
1.2 Diagnóstico de esclerosis múltiple	24
1.2.1 Introducción de los estudios de resonancia magnética en el diagnóstico de esclerosis múltiple.....	27
1.2.2 Criterios diagnósticos actuales de McDonald 2010.....	31
1.3 Terapias inmunomoduladoras en esclerosis múltiple.....	37
1.3.1 El interferón β como terapia inmunomoduladora en esclerosis múltiple.	38
1.3.2 Otras terapias aprobadas en la actualidad para el tratamiento de la esclerosis múltiple y los síndromes clínicos aislados	40
1.3.3 Identificación del fracaso terapéutico	41
1.4 La resonancia magnética en la esclerosis múltiple	44
1.4.1 Semiología radiológica de las lesiones de esclerosis múltiple	44
1.4.2 Disociación clínico-radiológica.....	47

1.5	Técnicas de resonancia magnética para la medición del volumen cerebral en esclerosis múltiple	48
1.5.1	Metodologías de medición de la atrofia cerebral	50
1.6	Justificación del estudio	58
2	Hipótesis.....	61
3	Objetivos.....	65
4	Pacientes y métodos	69
4.1	Pacientes, criterios de selección y evaluaciones clínicas.....	71
4.1.1	Pacientes con síndrome clínico aislado	71
4.1.2	Pacientes con esclerosis múltiple que inician tratamiento con interferón β	72
4.2	Metodología de imagen por resonancia magnética y análisis volumétrico cerebral.....	75
4.3	Análisis estadístico	78
4.3.1	Análisis específicos en la cohorte de pacientes con síndromes clínicos aislados	79
4.3.2	Análisis específicos en la cohorte de pacientes con EM que inician terapia inmunomoduladora con interferón β	79
5	Resultados.....	81
5.1	Resultados del estudio del valor predictivo de las medidas de atrofia global y específica de tejido en los pacientes que desarrollan un síndrome clínico aislado ..	83
5.1.1	Características de la cohorte de estudio.....	83
5.1.2	Cambios en los volúmenes cerebrales	85

5.1.3	Correlación entre las variables de volumetría cerebral y las variables clínicas y radiológicas.....	88
5.1.4	Efecto de las terapias modificadoras del curso de la enfermedad y los corticoesteroides.....	91
5.1.5	El desarrollo de atrofia cerebral en el primer año tras un síndrome clínico aislado como predictor del desarrollo de un segundo brote	94
5.2	Resultados del estudio del valor predictivo de las medidas de atrofia global y específica de tejido en pacientes con EM que inician terapia con interferón- β	98
5.2.1	Características de la cohorte de estudio	98
5.2.2	Evolución clínica tras 2 y 4 años de seguimiento.....	98
5.2.3	Cambios sobre los parámetros de lesiones en el primer año de tratamiento en toda la muestra y según la evolución clínica posterior.....	100
5.2.4	Cambios sobre los volúmenes cerebrales en el primer año de tratamiento en toda la muestra y según la evolución clínica posterior	105
5.2.5	Modelos de predicción del desarrollo de progresión confirmada de discapacidad tras tratamiento con interferón β	107
6	Discusión de los resultados	115
6.1	Importancia de los cambios del volumen cerebral en pacientes con síndromes clínicos aislados	117
6.2	Importancia de los cambios del volumen cerebral en pacientes con esclerosis múltiple que inician terapia con interferón β	122
6.3	Limitaciones y problemas metodológicos.....	127
7	Conclusiones	133
8	Bibliografía.....	137

9	Anexos.....	163
9.1	Pósters en congresos internacionales, publicados en forma de <i>abstract</i>	165
9.2	Comunicaciones orales en congresos, publicadas en forma de <i>abstract</i>	166
9.3	Artículos científicos en revistas indexadas.....	167

Abreviaturas

%cFPC: porcentaje de cambio de la fracción del parénquima cerebral

%cFSG: porcentaje de cambio de la fracción de la sustancia gris

%cFSB: porcentaje de cambio de la fracción de sustancia blanca

%cVPC: porcentaje de cambio del volumen del parénquima cerebral

%cVSB: porcentaje de cambio del volumen de sustancia blanca

%cVSG: porcentaje de cambio del volumen de sustancia gris

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro

BET: herramienta de extracción del cerebro (del inglés, *Brain Extraction Tool*)

BOC: bandas oligoclonales

CEL: lesiones que realzan tras la administración de contraste con gadolinio

Cemcat: Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya

COR: característica operativa del receptor

DE: desviación estándar

EDSS: escala expandida del estado de discapacidad

EM: esclerosis múltiple

EMA: Agencia Europea de Medicamentos

EMCD: esclerosis múltiple clínicamente definida

EMPP: esclerosis múltiple primariamente progresiva

EMRR: esclerosis múltiple remitente recurrente

EMSP: esclerosis múltiple secundariamente progresiva

FMRIB: centro de Oxford para la resonancia magnética funcional del cerebro (del inglés, *Oxford Centre for Functional MRI of the Brain*)

FPC: fracción de parénquima cerebral

FSB: fracción de sustancia blanca

FSG: fracción de sustancia gris

FSL: librería de software de FMRIB

GWAS: estudio de asociación del genoma completo (del inglés *Genome-wide Association Study*)

HLA: complejo mayor de histocompatibilidad (de la denominación previa en inglés *Human Leucocyte Antigen* – Antígeno leucocitario humano)

HR: razón de riesgos (del inglés, *Hazard ratio*)

ICAM-1: molécula de adhesión intercelular – 1

IC95%: intervalo de confianza del 95%

IFN: interferón

IFN β : interferón β

Ig: inmunoglobulina

IL-2: interleucina 2

LCR: líquido cefalorraquídeo

LT2: lesiones en secuencias potenciadas en T2

MAG: glucoproteína asociada a la mielina

MAGNIMS: grupo de investigación de imagen por resonancia magnética en esclerosis múltiple (del inglés, *MAGNetic resonance Imaging in Multiple Sclerosis*)

MPIV: metilprednisolona intravenosa

MSFC: escala funcional compuesta en esclerosis múltiple (del inglés, *Multiple Sclerosis Functional Composite*)

NEDA: sin evidencia de actividad de la enfermedad, del inglés “No Evidence of Disease Activity”

NEX: número de excitaciones.

NLT2: número de lesiones nuevas o que han aumentado de tamaño en secuencias potenciadas en T2

NO: neuritis óptica

PCVC: porcentaje de cambio de volumen cerebral

RM: resonancia magnética

SCA: síndrome clínico aislado

SIENA / SIENAx: Evaluación de la atrofia de imagen estructural, usando normalización (del inglés *Structural Image Evaluation, using Normalisation, of Atrophy*)

SNC: sistema nervioso central

SPM: mapeo paramétrico estadístico (del inglés *Statistical Parametric Mapping*)

SRA: síndrome radiológico aislado

TAB: tasa anual de brotes

TE: tiempo de excitación

TME: terapia modificadora de la evolución de la enfermedad

TR: tiempo de relajación

VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular 1 (del inglés, *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*)

VCN: volumen cerebral normalizado

VLA-4: antígeno 4 muy tardío (del inglés *Very Late Antigen 4*)

VPC: volumen de parénquima cerebral

VPN: valor predictivo negativo

VPP: valor predictivo positivo

VSBL: volumen de sustancia blanca

VSG: volumen de sustancia gris

1 Introducción

1.1 Generalidades sobre esclerosis múltiple

1.1.1 Epidemiología de la esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria crónica desmielinizante del sistema nervioso central (SNC), de inicio más frecuente en el adulto joven (20 a 40 años de edad), con un predominio en el sexo femenino (ratio mujer:hombre de 2:1). Su causa en la actualidad es desconocida y probablemente estén involucrados factores tanto ambientales como genéticos. La prevalencia de EM varía geográficamente, siendo mayor en el norte de Europa, el sur de Australia y en Norteamérica [1, 2]. La prevalencia en Europa varía entre 10 a 188 casos por 100.000 habitantes, con una incidencia anual media de 4 casos por 100.000 habitantes [3], constituyendo la enfermedad neurológica autoinmune crónica más frecuente en países desarrollados, y la primera causa de discapacidad de origen no traumático en esta población [4]. Los estudios epidemiológicos más recientes han mostrado un aumento en la incidencia y prevalencia global de la EM, incluyendo nuestro medio (con niveles de prevalencia en torno a 75 casos por 100.000 habitantes) [5–8], así como un aumento en la proporción mujer:hombre [9].

1.1.2 Formas clínicas e historia natural de la esclerosis múltiple

Aproximadamente un 85% de los pacientes con EM tienen síntomas de déficit focal neurológico de forma aguda / subaguda, lo que se ha venido a denominar como “brotes”, con repetición de episodios en varias localizaciones del SNC a lo largo del tiempo. A esta forma más frecuente de aparición se la

denomina “remitente-recurrente” (EMRR). Clínicamente, los brotes pueden resolverse completamente con *restitutio ad integrum* de los síntomas y déficits neurológicos o bien dejar una secuela irreversible que conduzca a un incremento de discapacidad.

En 10 años, alrededor de la mitad de los pacientes con EMRR pasan a una fase caracterizada por un deterioro neurológico lentamente progresivo independientemente de la actividad inflamatoria previa [10, 11], que se denomina comúnmente como fase “secundariamente progresiva” (EMSP). Aproximadamente un 15% de los pacientes con EM, inician un deterioro lentamente progresivo desde un inicio, curso que se ha llamado “primariamente progresivo” (EMPP). Una cuarta categoría, llamada “progresiva recurrente”, describe a aquéllos que, aunque inicialmente se comportan igual que los pacientes con EMPP, desarrollan algún brote durante la evolución [12]. Recientemente, esta clasificación ha sido revisada y modificada, de forma que desaparece la entidad “progresiva recurrente”, y se definen unos criterios de actividad medidos bien por brotes o actividad en RM, bien por progresión de la discapacidad [13].

En la historia natural de la EM se ha descrito lo que se ha venido a llamar el “fenómeno amnésico” de la enfermedad, por el que una vez los pacientes alcanzan un grado determinado de discapacidad, los factores clínicos iniciales (como el número de brotes previo, localización, etc.) dejan de tener valor predictivo en la progresión de la discapacidad; es decir, como si la enfermedad “olvidase” el periodo inflamatorio inicial cuando inicia la progresión clínica [10]. Este hecho viene matizado por la evidencia de que la enfermedad

se compone de dos fases, una inicial muy variable en la que sí son predictores los factores clínicos iniciales dependientes de la inflamación focal que dura hasta alcanzar una discapacidad inicial, y otra en la que los pacientes progresan desde el nivel inicial de discapacidad al siguiente a una velocidad sorprendentemente uniforme [11], lo que tiene implicaciones terapéuticas, ya que de esto se deriva que un claro objetivo terapéutico es alargar lo máximo posible el tiempo en el que los pacientes alcancen estos niveles de discapacidad.

1.1.3 Genética de la esclerosis múltiple

Existe una predisposición genética al desarrollo de EM, como demuestra el hecho de que la tasa de concordancia entre gemelos monozigotos (25%) es mayor que entre gemelos dizigotos (2 – 5%). Sin embargo, no hay un modo de transmisión hereditaria obvio y homogéneo que haya permitido su estudio con técnicas de estudio genético clásicas. El principal *locus* asociado a la EM es el complejo mayor de histocompatibilidad (HLA, de la denominación previa del inglés *Human Leucocyte Antigen* – Antígeno leucocitario humano) que, en el caso de poblaciones caucásicas, corresponde al haplotipo de clase II HLA-DRB1*15:01 – DQA*01:02 – DQB1*06:02 [14]. Presentar este haplotipo aumenta hasta 4 veces el riesgo de desarrollar EM, y la homocigosis se ha relacionado con un curso más temprano y más agresivo [15, 16].

Fuera del *locus* HLA, se han encontrado otros genes relacionados con la susceptibilidad de desarrollar EM, aunque con *odds ratios* claramente inferiores a las del HLA. Los estudios de asociación del genoma completo (GWAS, del

inglés *Genome-wide Association Study*) han identificado hasta la fecha hasta más de 100 nuevas regiones genéticas asociadas con la EM [17–20]. El estudio más reciente de estas características incluye a 10.756 casos y 10.753 controles, describiendo hasta 7 nuevos loci relacionados con la susceptibilidad a desarrollar EM, seis de ellos relacionados también con otras enfermedades autoinmunes, como la enfermedad celíaca, la tiroiditis autoinmune y la diabetes mellitus tipo 1 [20]. En resumen, las regiones encontradas implican mayoritariamente a genes relacionados con el sistema inmunitario, con muy escasa presencia de genes relacionados con la función neurológica o la mielina.

1.1.4 Factores ambientales para el desarrollo de esclerosis múltiple

Como se ha comentado anteriormente, la genética no explica por completo el desarrollo de EM, como demuestra la relativamente baja prevalencia de la enfermedad en gemelos monozigotos. Por otro lado, también se ha descrito una mayor prevalencia de EM en hermanastros no emparentados que en la población general [21]. Por tanto, se ha postulado que la exposición a ciertos factores durante la infancia o la adolescencia, en interacción con una herencia poligénica favorable, sea la que favorezca la aparición de la enfermedad. Se han descrito varios factores no genéticos, que pueden clasificarse en infecciosos o no infecciosos [22].

Existen evidencias epidemiológicas de los factores infecciosos, en cuanto se han descrito “epidemias” de incidencia de EM, la más famosa la de

las islas Feroe con la ocupación británica durante la Segunda Guerra Mundial [23]. Se ha relacionado a distintos agentes patógenos, tanto víricos (virus de Epstein Barr – VEB, virus del herpes humano tipo 6 – VHH6) y a bacterias, como *Chlamydia pneumoniae* como factores etiológicos [22]. De ellos, el VEB es el más señalado por su elevadísima seropositividad en pacientes con EM y por el aumento del riesgo de desarrollar EM en pacientes con antecedentes de mononucleosis infecciosa respecto a aquéllos que adquirieron el virus de forma asintomática [24]. Otra teoría más reciente, a caballo entre la genética y la infectología, es la de la activación de retrovirus endógenos latentes en el genoma, adquiridos durante el desarrollo de la especie humana, como desencadenantes del fenómeno inmune en pacientes susceptibles. Se ha demostrado una activación del retrovirus endógeno humano (HERV, del inglés *Human Endogenous Retrovirus*) en pacientes con EM con brotes recientes, respecto a pacientes con EM estable y frente a controles sanos [25].

Varios de los factores ambientales no infecciosos se basan en la distribución mundial de la EM, descrita por Kurtzke, en la que se observa un gradiente norte-sur de mayor a menor prevalencia, con un predominio en los países desarrollados e industrializados, en especial en los más septentrionales [26]. Por tanto, a raíz de esto existen varias teorías sobre el aumento de la predisposición a EM. Por un lado, la hipótesis de la “higiene”, postula que la falta de estímulos antigénicos a infecciones de tipo bacteriano o parasítico durante la infancia, induciría una respuesta inmunológica tendente a la autoinmunidad [22]. Por otra parte, la latitud influye en el grado de exposición

solar, y por tanto, en los niveles de vitamina D, que pueden ser un factor protector del desarrollo de EM [27].

Otros factores adicionales no infecciosos son los hábitos de vida, como el consumo de tabaco, que puede aumentar la susceptibilidad a desarrollar EM [28] e incluso acelerar el paso a una forma EMSP una vez desarrollada [29], así como el exceso en el consumo de sal [30], y el sobrepeso durante la infancia/adolescencia [31].

1.1.5 Inmunopatogenia de la esclerosis múltiple

El modelo inmunopatogénico de la EM implica una respuesta compleja, cuyo paso inicial es la activación de linfocitos T autorreactivos por factores a día de hoy desconocidos. Éstos, a través de la integrina VLA-4 dañan la barrera hematoencefálica para atravesarla. Además, inducen en el endotelio vascular adyacente una sobreproducción de moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM-1, selectina-E), favoreciendo el reclutamiento de más células inflamatorias que acceden al parénquima del SNC adyacente al vaso sanguíneo. La activación de la respuesta Th1, con linfocitos T CD4+, promueve una producción de interleucinas IL-2, IFN- γ y TNF- α , que a su vez promueven la activación macrofágica y la fagocitación de la mielina. Por otro lado, puede producirse también una respuesta CD8+ citotóxica, responsable del daño directo sobre el oligodendrocito [32]. Sin embargo, la respuesta inflamatoria no es solo celular, puesto que también existe una expansión oligoclonal de células B, con producción de IgG capaz de fijar complemento, e incluso también se ha

descrito la producción de IgM dirigida contra antígenos neuronales en una subpoblación de pacientes con EM y evolución agresiva [33].

En el estudio histopatológico, la EM se caracteriza por una heterogeneidad de sus lesiones en el SNC, que se han clasificado en cuatro patrones distintos. El patrón I asocia lesiones focales con desmielinización e infiltrados de linfocitos T y macrófagos; el patrón II presenta, además, depósitos de inmunoglobulinas y activación del complemento en los lugares de desmielinización activa. En ambos patrones las lesiones están bien definidas, centradas alrededor de los vasos sanguíneos, y muestran remielinización. El patrón III asocia también inflamación, pero los bordes de las lesiones están mucho peor definidos, y alrededor de los vasos sanguíneos hay mielina respetada; por lo que más se caracteriza este patrón es por una pérdida selectiva de la glucoproteína asociada a la mielina (MAG), fenómeno asociado a la muerte de los oligodendrocitos. Por último, el patrón IV muestra una muerte no apoptótica de los oligodendrocitos en la sustancia blanca de aspecto normal adyacente a las placas. Normalmente, en un mismo sujeto, todas las placas activas corresponden a un mismo patrón, aunque estos patrones pueden ser distintos entre sujetos [34, 35]. Sin embargo, otros estudios no han confirmado este hecho, sugiriendo que, más que interindividual, la heterogeneidad es dependiente del tiempo y del estadio de evolución de las lesiones en un mismo individuo [36, 37].

Clásicamente, se consideraba a la EM como una enfermedad de la sustancia blanca cerebral, siendo el hallazgo principal la presencia de desmielinización focal, con la formación de una cicatriz glial reactiva, y una

relativa preservación de los axones y con escasa afectación de la sustancia gris (p.ej., como se afirma en el artículo de Poser et al. de 1983: “*Gray matter lesions occur rarely enough in MS that they should not be considered in establishing the diagnosis*” [38]). Sin embargo, este paradigma ha cambiado en los últimos años, al demostrarse la presencia de daño axonal no solo en las lesiones de EM [39], sino también en la sustancia blanca aparentemente normal [40, 41]. Además, se ha visto que la existencia de lesiones corticales [42] es un hecho frecuente en EM [41, 43, 44], así como los fenómenos de remielinización [45].

1.2 Diagnóstico de esclerosis múltiple

El diagnóstico de EM se basa fundamentalmente en parámetros clínicos como la historia médica y los hallazgos de la exploración clínica neurológica, y en exploraciones complementarias como la resonancia magnética (RM) y los hallazgos en el examen del líquido cefalorraquídeo (LCR).

Desafortunadamente, están aún por identificar biomarcadores fiables que permitan la predicción de la evolución clínica de la EM desde el comienzo de la enfermedad. Las formas de inicio más típicas se presentan con neuritis óptica unilateral, síndrome del tronco cerebral o mielitis parcial, que son los síntomas iniciales más comunes en la EM. Estas presentaciones son conocidas por varios nombres, como “primer brote”, “síndrome neurológico aislado”, “síndrome desmielinizante aislado” o, de manera más extendida, como “síndrome clínicamente aislado” (SCA) [13].

Los síndromes desmielinizantes pueden comportarse de forma monofocal (neuritis óptica, mielitis transversa parcial, síndrome de tronco del encéfalo) o multifocal (síntomas o signos clínicos solo explicables por la presencia de al menos dos lesiones de SNC localizadas en regiones anatómicas/funcionales distintas – p.ej.: una neuritis óptica con un signo de Babinski), y con el tiempo cursar de forma monofásica, de forma recurrente o de forma progresiva. Muchas entidades patológicas pueden comportarse de la misma manera: vasculares, infecciosas, neoplásicas, congénitas, metabólicas o incluso autoinmunes/inflamatorias [46]. Entre estas últimas, son de especial relevancia la neuromielitis óptica y la encefalomielitis aguda diseminada, cuyos síntomas pueden ser similares o idénticos a los de la EM, pero que presentan una evolución clínica, trasfondo etiopatogénico y tratamiento diferentes [47].

El diagnóstico de EM exige la exclusión de otras entidades que puedan mimetizar los síntomas y signos clínicos, lo que convierte el momento del SCA en un reto diagnóstico para el neurólogo, puesto que la lista que engloba a los diferentes síndromes o enfermedades que configuran el diagnóstico diferencial de la EM es muy extensa [46]. Es por esto que, tradicionalmente, los criterios diagnósticos de EM exigían que para su diagnóstico clínico (EM clínicamente definida [EMCD]) correcto era necesaria la evidencia clínica de dos o más lesiones en el SNC en al menos dos ocasiones [48].

En 1983, estos criterios fueron modificados por Poser et al., incorporando para el diagnóstico los resultados de los exámenes complementarios como los potenciales evocados, los hallazgos de la neuroimagen y el estudio de bandas oligoclonales (BOC) en el LCR [38].

Los criterios de Poser fueron los primeros en permitir el diagnóstico de EM definida tras un SCA de forma muy precoz (bajo el epígrafe de EM definida por laboratorio B2 y B3, tabla 1), aunque las condiciones de diagnóstico eran complicadas, puesto que tanto si la evidencia de dos lesiones de SNC era clínica o paraclínica (hallazgo en los potenciales evocados o hallazgos sin especificar en la neuroimagen), ambas lesiones no podían coincidir en el primer examen, debiendo dejar un mínimo de un mes para demostrar diseminación temporal, además de exigir positividad del LCR (bien por presencia de BOC y/o de alteración del índice de inmunoglobulina G [IgG]). Como los propios autores reconocen, estas arbitrarias reglas diagnósticas se establecen para evitar que un caso de encefalomiелitis aguda diseminada se confunda con EM [38]. Como se verá más adelante, los nuevos criterios diagnósticos no están libres de esta cautela, y establecen sus propias reglas tras la introducción plena de las herramientas de imagen por resonancia magnética para el diagnóstico de EM tras un SCA.

Tabla 1. Categorías diagnósticas de esclerosis múltiple según los criterios de Poser [38].

Categoría	Brotos	Evidencia clínica de lesiones en SNC	Evidencia paraclínica de lesiones en SNC	LCR		
A	Clínicamente definida					
	EMCD A1	2	2			
	EMCD A2	2	1	1		
B	Definida por laboratorio					
	EMDL B1	2	1	o	1	+
	EMDL B2	1	2			+
	EMDL B3	1	1	y	1	+
C	Clínicamente probable					
	EMCP C1	2	1			
	EMCP C2	1	2			
	EMCP C3	1	1	y	1	
D	Probable por laboratorio					
	EMPL D1	2				+

EMCD: esclerosis múltiple clínicamente definida; EMCP: esclerosis múltiple clínicamente probable; EMDL: esclerosis múltiple definida por laboratorio; EMPL: esclerosis múltiple probable apoyada por laboratorio; LCR: presencia de bandas oligoclonales o elevación del índice de inmunoglobulina G en el líquido cefalorraquídeo.

1.2.1 Introducción de los estudios de resonancia magnética en el diagnóstico de esclerosis múltiple

El empleo de los exámenes de RM cerebral ha mostrado ser una de las herramientas diagnósticas más informativas en Neurología en las últimas tres décadas. La RM es capaz de detectar las lesiones de carácter desmielinizante en prácticamente el 100% de los pacientes con EMCD, y en el 50 – 70% de los pacientes con SCA [49], desplazando en sensibilidad al resto de exámenes complementarios como los potenciales evocados o el examen del LCR [50]. La RM es también un arma de doble filo, puesto que puede ser un método para excluir otras enfermedades que puedan simular una EM, que es un paso crítico en el diagnóstico, pero también puede conducir a errores de sobreinterpretación o falsos positivos, en especial cuando no se tiene la

experiencia clínica suficiente con esta enfermedad [51], siendo fácil confundir las hiperintensidades de sustancia blanca en secuencias potenciadas en T2 debidas a enfermedad vascular cerebral (leucoaraiosis) o lesiones por gliosis inespecíficas.

Con la aparición de las técnicas de RM en la década de los 80 y 90, en 1988 Paty y cols. [52] propusieron unos criterios para el diagnóstico de EM en base a los de Poser, en los que la presencia de lesiones en la RM apoya el diagnóstico de EM definida por laboratorio con la presencia de al menos 4 o más lesiones en sustancia blanca, o al menos 3 lesiones si una de ellas está en localización periventricular. Por otro lado y al mismo tiempo, Fazekas et al. propusieron una definición de los criterios que discriminase las lesiones desmielinizantes típicas de EM de las lesiones de sustancia blanca vasculares del adulto anciano [53], consistente en presentar tres o más lesiones con al menos dos de las siguientes características: 1) localización periventricular; 2) localización infratentorial; y 3) tamaño mayor o igual a 6 mm. Aunque ambos criterios han mostrado una alta sensibilidad para el diagnóstico retrospectivo de EM [54], cuando fueron evaluados de forma prospectiva en una cohorte de pacientes con SCA, aunque con una elevada sensibilidad, mostraron una especificidad relativamente baja para detectar a aquellos pacientes que desarrollarían EMCD [55, 56].

En 1997, se publicó un estudio multicéntrico observacional de pacientes que habían desarrollado un primer brote desmielinizante, comparando los criterios de RM antes mencionados con los desarrollados en base a un modelo estadístico basado en la localización (yuxtacortical, infratentorial o

periventricular), en las características (realce tras administración de gadolinio) de las lesiones y en el número de las lesiones [57]. Estos nuevos criterios predecían con mayor precisión el desarrollo de EMCD que los criterios de Paty o Fazekas. Los criterios de Barkhof fueron modificados en el estudio de Tintoré et al. [56], en el que el criterio de presentar al menos una lesión con realce tras gadolinio podía ser sustituido por la presencia de 9 o más lesiones hiperintensas en secuencias potenciadas en T2, y se introdujo el punto de corte de tener al menos tres de cuatro criterios de Barkhof. Con esto, los nuevos criterios de Barkhof-Tintoré consiguieron tener una mayor precisión y un mejor balance de sensibilidad y especificidad para predecir conversión a EMCD tras un primer brote.

En 2001, un panel internacional de expertos publicó unas nuevas guías para el diagnóstico de EM [58]. Al igual que con los criterios de Poser, estos criterios (comúnmente denominados “criterios de McDonald” en reconocimiento al presidente del panel, W. Ian McDonald) se basan en evidenciar objetivamente la diseminación en espacio y tiempo de las lesiones en el SNC, con la novedad de poder utilizar los hallazgos de RM para este fin. De esta manera, los criterios de McDonald permiten el poder obtener el diagnóstico de la enfermedad en fases más tempranas, incluyendo las presentaciones monosintomáticas, ya que se admite la posibilidad de establecer el diagnóstico de EM en pacientes con un único episodio clínico cuando se demuestra por RM la presencia de lesiones desmielinizantes en el SNC diseminadas espacial y temporalmente. Estos criterios, a diferencia de los de Poser, establecen solo dos niveles de certeza (EM o EM posible), simplificando las categorías

diagnósticas y evitando términos confusos y difíciles de interpretar en la práctica clínica diaria como *clínicamente probable*, *probable por laboratorio*, etc. Por otro lado, separa claramente los criterios diagnósticos de las formas que se inician a brotes (EMRR) de las formas EMPP, reconociendo las peculiaridades clínicas y las dificultades en el diagnóstico de esta última entidad. No obstante, estos nuevos criterios no deben verse como una ruptura con los anteriores, puesto que al igual que en los criterios de Poser, y a pesar de otorgar un peso relevante a los hallazgos de la neuroimagen, se mantiene la importancia de la clínica y ésta es condición *sine quan non* para poder llegar al diagnóstico de EM.

Estos criterios fueron posteriormente actualizados en 2005 [59], realizando cambios respecto a los hallazgos de neuroimagen por RM para cumplir diseminación espacial y temporal (figuras 1 y 2) y a la obligatoriedad de la positividad del LCR para el diagnóstico de EMPP, en base a las nuevas evidencias que fueron surgiendo sobre la utilidad de la RM, buscando simplificar y clarificar conceptos, acelerar el proceso diagnóstico y mejorar la precisión diagnóstica.

En un estudio del grupo MAGNIMS (*MAGNetic resonance Imaging in Multiple Sclerosis*), se demostró que los criterios de McDonald 2005 incrementan la sensibilidad (60 frente a 47%, respectivamente), manteniendo una buena especificidad (88 frente a 91%, respectivamente) frente a los de 2001 [60]. En resumen, la revisión de 2005 de los criterios de McDonald mantuvo las características principales de los criterios originales de 2001, su énfasis de buscar hallazgos clínicos objetivos,

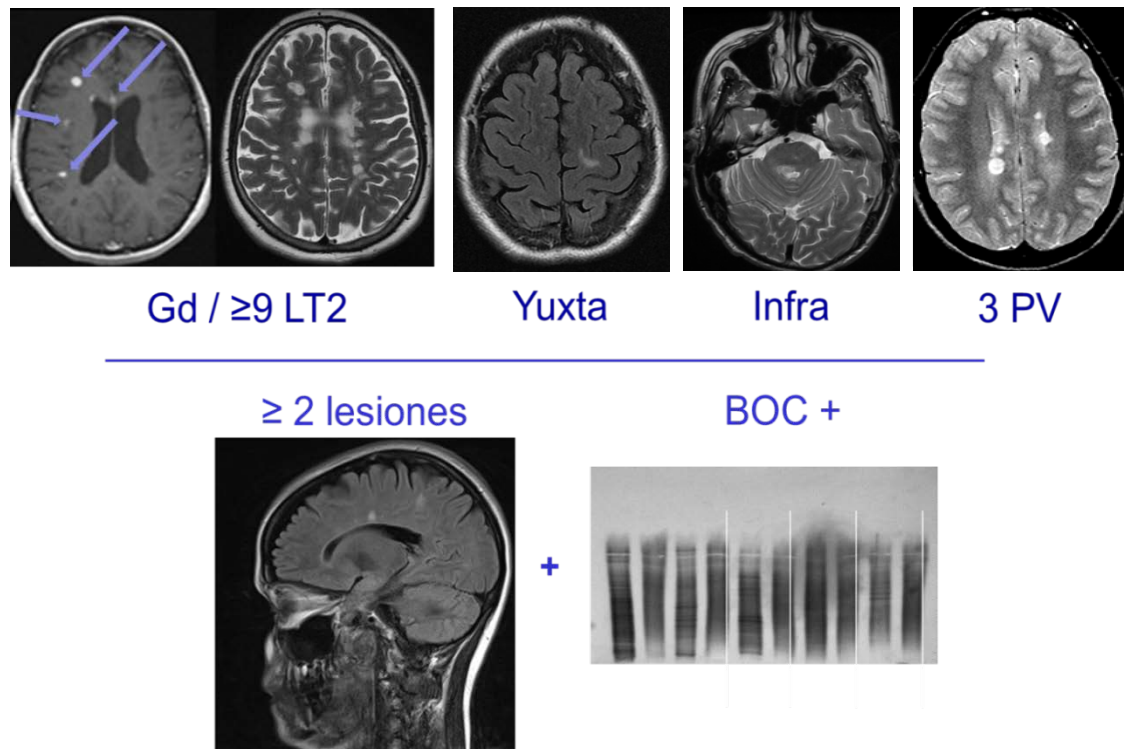
la necesidad de demostrar diseminación temporal y espacial para el diagnóstico definitivo, y el uso de exámenes complementarios de apoyo con el fin de acelerar el proceso diagnóstico, y para mejorar la precisión diagnóstica.

1.2.2 Criterios diagnósticos actuales de McDonald 2010

Desde la publicación de los criterios de McDonald de 2005, aparecieron varias propuestas para su modificación, ya que se consideró a dichos criterios como demasiado rigurosos y complejos en su aplicación [61]. Además, aunque altamente específico, el punto de corte de 3 de 4 criterios de diseminación espacial de Barkhof-Tintoré fue considerado como demasiado restrictivo [62].

De hecho, los criterios de Barkhof-Tintoré no fueron estrictamente definidos como de diseminación espacial, ya que ninguno de los estudios en los que se evaluó su precisión diagnóstica aborda realmente esta cuestión, sino la capacidad de predecir el desarrollo de EMCD a partir de una sola RM realizada tras un SCA [56, 57]. Por otro lado, en los criterios de McDonald 2001 y 2005, una lesión que realce tras administración de contraste con gadolinio se puede considerar tanto para diseminación espacial como temporal; sin embargo, las lesiones que presentan realce tras gadolinio representan más una evidencia de diseminación temporal que de diseminación a lo largo del neuroeje.

Figura 1. Criterios de diseminación espacial por resonancia magnética para el diagnóstico de esclerosis múltiple según los criterios de McDonald 2001/2005.

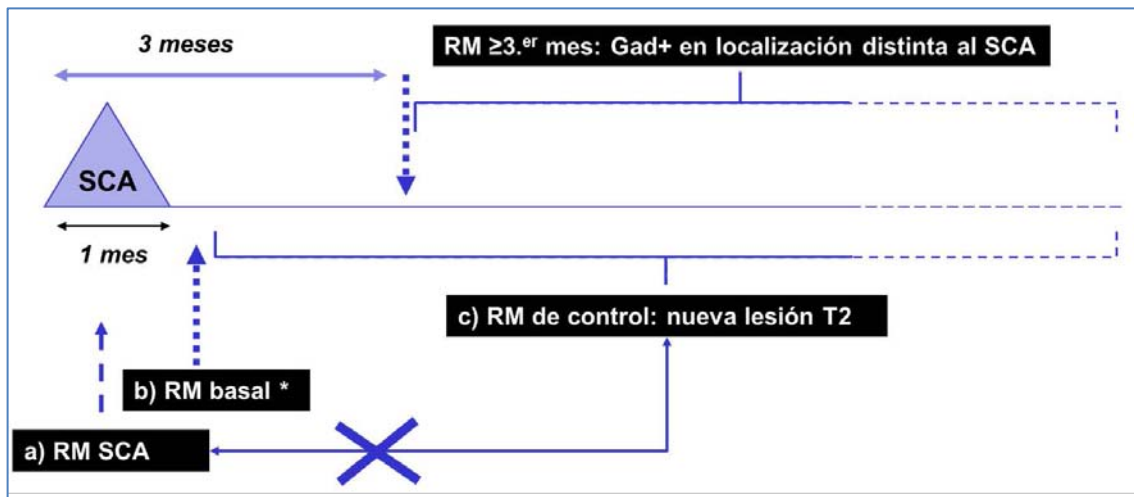


3 PV: tener al menos 3 lesiones periventriculares; BOC: positividad de bandas oligoclonales o índice de inmunoglobulina G elevado en el líquido cefalorraquídeo; Gd: lesiones que realzan tras administración de contraste con gadolinio; Infra: lesiones infratentoriales; LT2: lesiones en secuencias potenciadas en T2; Yuxta: lesiones yuxtacorticales. En la parte superior se representan los criterios de Barkhof-Tintoré, siendo preciso cumplir 3 de los 4 criterios. En la parte inferior, se presenta la alternativa de presentar al menos dos lesiones cerebrales junto con la positividad del LCR. Las lesiones medulares cuentan junto con las cerebrales para alcanzar el criterio de Barkhof-Tintoré de tener 9 o más lesiones. En los criterios de McDonald de 2005, además, una lesión de médula espinal contribuye como una lesión cerebral infratentorial, pero no como una periventricular o yuxtacortical y una lesión de médula espinal que presente realce tras administración de contraste sirve como criterio de diseminación espacial al igual que una lesión cerebral que presente realce.

Además, los criterios de diseminación temporal por RM fueron considerados también demasiado complejos (figura 2), y precisaban de al menos 2 controles de RM obtenidos tras el SCA, con la restricción añadida de no poder usar las imágenes obtenidas durante los 30 primeros días tras el SCA como referencia para el diagnóstico de diseminación temporal. Dado que en la práctica real la mayoría de pacientes suelen tener su primer examen de RM

durante el primer mes desde el inicio de los síntomas del SCA, se consideró que sería muy útil permitir que estos exámenes pudiesen ser utilizados como referencia para el diagnóstico de diseminación temporal.

Figura 2. Modos de detectar diseminación temporal por resonancia magnética tras un síndrome clínico aislado según criterios de McDonald de 2005.



RM: resonancia magnética; SCA: síndrome clínico aislado. La diseminación temporal por resonancia magnética en los criterios de McDonald de 2005 se puede obtener de dos maneras: 1) al igual que en los criterios de 2001, por observar al menos una lesión que realza tras contraste en una localización distinta a la sintomática del SCA, en un control de RM realizado al menos 3 meses tras el inicio del primer síntoma del SCA; 2) cuando se advierte cualquier nueva lesión T2 en un control de RM realizado en cualquier momento (c), en comparación con una RM realizada al menos 30 días después del inicio de los síntomas del SCA (b). Adviértase que una RM realizada durante el primer mes tras el inicio del SCA puede ser utilizada para detectar diseminación en espacio, pero no como referencia para diseminación en tiempo (a).

En 2006, Swanton y colaboradores, del grupo del hospital Queen Square de Londres, propusieron unos nuevos criterios de imagen para el diagnóstico de EM, tanto para diseminación espacial como temporal [63], simplificando y reduciendo al mínimo el número de lesiones y de regiones necesarias para cumplir diseminación espacial y proponiendo que para la diseminación temporal, solo contasen las nuevas lesiones en secuencias potenciadas en T2, prescindiendo de la opción de incluir las lesiones que realzan tras contraste

como evidencia de diseminación temporal, ya que esto no parecía afectar a la precisión diagnóstica [64, 65].

Estos criterios requerían ≥ 1 nueva lesión T2 a los 3 meses del inicio del SCA, independientemente de cuándo se hubiese tomado la RM de referencia (esto es, eliminando la restricción de que la RM de referencia debía realizarse al menos 30 días después del inicio de los síntomas del SCA). La precisión de estos nuevos criterios fue probada por el grupo MAGNIMS, observando una especificidad parecida para el diagnóstico de EMCD usando los criterios del grupo del hospital Queen Square en comparación con los criterios de McDonald 2005 y 2001 (87%, 88% y 91%, respectivamente), y mejorando la sensibilidad (72%, 60% y 47%, respectivamente) [60].

Sin embargo, estos criterios siguen precisando de un segundo control de RM para el diagnóstico, lo que conlleva un retraso diagnóstico. Si bien el realizar un segundo control puede prevenir un diagnóstico incorrecto, la evidencia de presentar lesiones que realzan tras contraste junto con otras que no lo hacen en una misma exploración de RM, ya es indicativo de que existe un proceso desmielinizante previo con actividad actual, y podría ser suficiente para establecer la diseminación temporal, debido a que esta combinación de lesiones activas y no activas está describiendo a lesiones en distintos estadios de evolución. El estudio de Rovira et al. [66] demostró que las propiedades diagnósticas de un examen de RM para predecir EMCD son las mismas independientemente del momento de su realización; en concreto, el presentar 3 de 4 criterios de Barkhof junto con lesiones que realzan tras gadolinio independientemente de cuándo esté realizado el estudio de RM, tiene una alta

especificidad (86%), aunque una baja sensibilidad (45%). La recomendación de aplicación de los criterios de Rovira es, pues, solamente en pacientes con SCA típicos entre los 14 a 50 años de edad, con el fin de evitar errores diagnósticos con otras entidades como la encefalomiелitis aguda diseminada o la patología vascular cerebral.

Con toda esta nueva información disponible, el grupo MAGNIMS propuso una actualización diagnóstica de los criterios de EM [67], que condujo finalmente a la versión actual de 2010 de los criterios de McDonald [68], en los que los criterios de diseminación espacial son los propuestos por Swanton en 2006 [63] y el concepto de diseminación temporal se modifica para eliminar las restricciones a la hora de comparar el número de lesiones entre controles de RM, tal y como han propuesto varios autores [63–65], y para introducir el concepto de Rovira de lesiones activas y no activas en un mismo control de RM [66]. Aparte de estos cambios, ya de por sí significativos, se diluye el papel diagnóstico de los hallazgos del LCR, manteniéndolos como criterio de apoyo de diagnóstico de la forma EMPP, pero desapareciendo su uso como criterio de apoyo para diseminación espacial en las formas EMRR, aunque persiste la recomendación de su uso durante el proceso diagnóstico [68]. En la tabla 2 se expone a modo de resumen la evolución de los criterios de diseminación espacial y temporal de los criterios diagnósticos de McDonald.

Tabla 2. Evolución de los criterios de McDonald para alcanzar diseminación radiológica en espacio y tiempo para el diagnóstico de esclerosis múltiple remitente-recurrente.

	2001	2005	2010
DE	<p>1) 3 de 4 criterios: - ≥ 9 LT2 o ≥ 1 Gd - ≥ 3 PV - ≥ 1 YC - ≥ 1 IT</p> <p>Una lesión en médula espinal puede sustituir a una lesión cerebral</p> <p>2) Presencia de ≥ 2 LT2 junto con la presencia de BOC en LCR.</p>	<p>1) 3 de 4 criterios: - ≥ 9 LT2 o ≥ 1 Gd - ≥ 3 PV - ≥ 1 YC - ≥ 1 IT (o ME)</p> <p>Las lesiones de médula espinal pueden contarse en el recuento total de lesiones para cumplir el criterio de ≥ 9 LT2 o ≥ 1 Gd.</p> <p>2) Presencia de ≥ 2 LT2 junto con la presencia de BOC en LCR.</p>	<p>1) ≥ 1 lesión en ≥ 2 localizaciones típicas: - PV - YC - IT - ME</p> <p>Las lesiones sintomáticas en síndromes de tronco o médula no deben contar para la determinación de DE.</p> <p>2) Los hallazgos de LCR no se consideran.</p>
DT	<p>≥ 1 Gd en una RM realizada ≥ 3 meses tras el inicio del SCA, que no coincida con la región sintomática del SCA.</p> <p>2) Aparición de ≥ 1 nueva LT2 en RM obtenida al menos 3 meses tras</p>	<p>1) ≥ 1 Gd en una RM realizada ≥ 3 meses tras el inicio del SCA, que no coincida con la región sintomática del SCA.</p> <p>2) Aparición de ≥ 1 nueva LT2 en comparación a una RM de referencia obtenida al menos ≥ 30 días tras el inicio del SCA</p>	<p>1) Presencia simultánea de lesiones en distinto estadio evolutivo (Gd+ y Gd-), en cualquier control de RM.</p> <p>2) Aparición de ≥ 1 nueva LT2 en comparación con cualquier control de RM.</p>

BOC: presencia de bandas oligoclonales o de elevación del índice de inmunoglobulina G en el LCR; DE: diseminación espacial; DT: diseminación temporal; Gd: lesiones que realzan tras administración de gadolinio; IT: infratentorial (tronco del encéfalo y cerebelo); LCR: líquido cefalorraquídeo; LT2: lesiones en secuencias potenciadas en T2; ME: médula espinal; PV: periventricular; RM: resonancia magnética; YC: yuxtacortical.

1.3 Terapias inmunomoduladoras en esclerosis múltiple

Los estudios de neuropatología señalan con insistencia el fenómeno de degeneración axonal que se desarrolla de forma precoz en las lesiones desmielinizantes agudas [39]. Por evolución natural de la enfermedad, un porcentaje elevado de pacientes desarrollará una discapacidad neurológica en los siguientes años del diagnóstico [69]. Los estudios de historia natural han mostrado que existen factores pronósticos presentes en los estadios iniciales de la enfermedad [70], que pueden ayudar a predecir la evolución hacia la forma EMSP, o predecir la posibilidad de alcanzar una discapacidad en la escala EDSS de 4,0. Por tanto, es un objetivo clave el administrar tratamientos de forma precoz que permitan mejorar el pronóstico de la enfermedad.

Afortunadamente, con el tiempo se han ido desarrollando fármacos que pueden, al menos en el corto plazo, modificar la historia natural de la enfermedad (terapias modificadoras de la enfermedad, TME), abandonando así progresivamente una época de nihilismo terapéutico [71]. Actualmente, contamos con varias opciones de TME, con distintos grados de eficacia y perfil de reacciones adversas [72–84], lo que hace que en la práctica en nuestro medio existan recomendaciones específicas de uso para cada uno de ellos, basadas en consensos científicos [85]. En el momento actual, se consideran en el marco de la Unión Europea y de los países que siguen las recomendaciones de la Agencia Europea del Medicamento (EMA – European Medicines Agency) como terapias autorizadas al interferón β (IFN β), al acetato de glatirámico

(antes conocido como copolímero I), a la teriflunomida, al dimetilfumarato (también conocido como BG-12), al fingolimod, al natalizumab y al alemtuzumab.

1.3.1 El interferón β como terapia inmunomoduladora en esclerosis múltiple

Los interferones (IFN) son una familia de glucoproteínas, clasificadas como citocinas, que son producidas por los linfocitos y otras células del tejido conectivo como los fibroblastos. Los IFN han demostrado efectos antivirales, antiproliferativos e inmunomoduladores [86] y tienen un lugar privilegiado en la historia de los tratamientos en EM [87].

Cuando los primeros resultados de los estudios abiertos con IFN γ en pacientes con EM mostraron que precipitaba la aparición de nuevos brotes [88, 89], las miras se posaron en su contraparte, los interferones de tipo I (IFN α e IFN β), que inhiben la acción del receptor de IFN γ . De ambos, se prefirió el IFN β por su mejor tolerancia [90].

Aún hoy, el mecanismo de acción de IFN β sobre la modulación del sistema inmune en EM no se conoce por completo, actuando probablemente sobre la presentación antigénica, los linfocitos T y B, el balance de citocinas y otros factores tisulares como la expresión de proteínas de adhesión y de metaloproteasa-9 en el endotelio o la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) [86, 91]. Existen dos formulaciones de IFN β , obtenidas mediante tecnología de ADN recombinante: IFN β 1a, que es idéntico al IFN β natural y tiene varias posologías y vías de administración (22/44 μ g subcutáneo

3 veces por semana [92] o 30 µg intramuscular semanal [93]), y el IFNβ1b [94, 95], que difiere del natural en que no está glicosilado, tiene un aminoácido menos y la cisteína en posición 17 está sustituida por serina [91], y tiene una posología única (250 µg subcutáneo a días alternos).

El primer ensayo con IFNβ se publicó en 1993 con IFNβ1b [72]. Desde entonces, varios estudios han demostrado que el IFNβ, en sus dos formas, disminuye la tasa anualizada de brotes aproximadamente un 30% y el acúmulo de nuevas lesiones detectadas en la RM [72–74]. Debido a la visión cortoplacista de los ensayos clínicos, no existen evidencias suficientes de su acción sobre la discapacidad a largo plazo [96–98], y las que hay no siempre son consistentes [99, 100]. Recientemente se ha mostrado que los pacientes que iniciaron tratamiento en el brazo activo de IFNβ1b en su ensayo principal presentaron una mayor supervivencia a largo plazo que los que recibieron placebo inicialmente [101], y varios estudios observacionales en práctica clínica habitual también han mostrado un beneficio del tratamiento temprano sobre la discapacidad a largo plazo [102, 103].

Con la evidencia de la existencia del daño neuroaxonal que ocurre en relación con el fenómeno inflamatorio de la EM ya desde estadios muy iniciales [39, 104], cabría preguntarse si el tratamiento precoz con TME mejoraría el pronóstico de los pacientes [105]. En los pacientes que desarrollan un SCA, el IFNβ empezó su recorrido con el ensayo clínico *Early Treatment Of MS* (ETOMS), con IFNβ1a 22 µg subcutáneo semanal, que mostró no solo que la proporción de pacientes que convirtieron a EMCD fue significativamente menor en el grupo tratado (34%) que en el placebo (45%) en la duración del ensayo,

sino que los pacientes tratados tardaban prácticamente el doble que el grupo placebo en desarrollar EMCD [106]. Le siguió el *Controlled High-Risk Subjects Avonex Multiple Sclerosis Prevention Study* (CHAMPS), que mostró que el IFN β 1a 30 μ g intramuscular semanal fue eficaz en la prevención de nuevos brotes, así como en la reducción de la carga de lesiones en la RM [107]. El ensayo *Betaferon[®]/Betaseron[®] in Newly Emerging multiple sclerosis For Initial Treatment* (BENEFIT), demostró que el IFN β 1b a la dosis estándar utilizada en EMCD (250 mg a días alternos subcutánea) redujo un 50% el riesgo de desarrollar EMCD a los 2 años respecto al grupo placebo (un 45% de los pacientes en el brazo de aleatorización a placebo desarrolló EMCD frente al 28% del brazo tratado con IFN β); además, la conversión a EMCD en estos pacientes se veía retrasada prácticamente un año respecto a los pacientes del grupo placebo [108]. Más tarde, el ensayo *REbif FLEXible dosing in early MS* (REFLEX) encontró que tanto IFN β 1a 44 μ g subcutáneo semanal como 3 veces por semana retrasó el desarrollo de EM tanto por la aparición de un segundo brote como por cumplir criterios de McDonald [109].

1.3.2 Otras terapias aprobadas en la actualidad para el tratamiento de la esclerosis múltiple y los síndromes clínicos aislados

Existen en la actualidad varias opciones para el tratamiento a largo plazo de la EMRR y de los pacientes con SCA. En ambas entidades, el IFN β y el acetato de glatirámico [110, 111] son los tratamientos de primera línea aprobados. Otras terapias recientes de primera línea aprobadas para el

tratamiento de la EMRR son la teriflunomida [112] y el dimetilfumarato [113], ambas de administración oral, con la ventaja de la comodidad de la forma de administración. El anticuerpo monoclonal natalizumab está indicado fundamentalmente como terapia de segunda línea, y reservado para formas EMRR tras fracaso terapéutico tras iniciar fármacos de primera línea, aunque también está autorizado como de primera elección en formas definidas como “de elevada actividad” [114]. El fingolimod es un antagonista del receptor de esfingosina-1, aprobado en los estados miembros de la Unión Europea con las mismas indicaciones dadas por la EMA que natalizumab [115]. Por último, se ha aprobado recientemente alemtuzumab, otro anticuerpo monoclonal de efecto inmunosupresor para su uso en formas de EM con actividad clínica o demostrada por RM [116].

1.3.3 Identificación del fracaso terapéutico

El inicio de la terapia con IFN β ha sido y sigue siendo el primer paso en el tratamiento de muchos pacientes con EM. Sin embargo, la respuesta de los pacientes a dicha medicación es variable y muchos presentan respuestas subóptimas que pueden conducir a un incremento irreversible de discapacidad antes de que se pueda decidir un cambio a otros agentes terapéuticos [117]. Además, el mantener una terapia ineficiente debido al fracaso terapéutico tiene implicaciones sobre los costes de salud que deben tenerse en cuenta [118].

La persistencia de la actividad biológica de la enfermedad a pesar del tratamiento se manifiesta por la aparición de nueva actividad clínica (nuevos

brotos y/o progresión de la discapacidad) y de nueva actividad en la RM (presencia de nuevas lesiones o lesiones que realzan con gadolinio) [119].

En la actualidad no disponemos de biomarcadores que puedan predecir con precisión y a priori qué pacientes tendrán una buena respuesta a los TME, por lo que se hace necesaria la detección precoz del fracaso terapéutico [120].

No existe un consenso establecido sobre los criterios de fracaso terapéutico, existiendo varias propuestas y definiciones, basadas bien en criterios de expertos (como los criterios canadienses) [121–123], o basados en estudios observacionales de cohortes prospectivas que incluyen variables clínicas y radiológicas (criterios de Río, y criterios modificados de Río por Sormani) [117, 124–127].

1.3.3.1 Criterios de Río de fracaso terapéutico

Teniendo en cuenta variables exclusivamente clínicas, el trabajo de Río et al. mostró que la confirmación de un empeoramiento de la discapacidad detectado durante los dos primeros años tras el inicio de tratamiento con IFN β predice el estado de discapacidad a los 4 años de seguimiento [125]. Posteriormente, analizando hasta 10 definiciones exclusivamente clínicas de respuesta terapéutica, se observó que una definición que incluya la aparición de nuevos brotes y de progresión de discapacidad es superior para detectar progresión tras el inicio de IFN β que la aparición sola de brotes [124]. Por otro lado, la incorporación de las variables de RM como herramienta de seguimiento de la efectividad del tratamiento [128], en concreto la aparición de nuevas lesiones (≥ 3) durante el seguimiento tan pronto como un año tras el inicio de

IFN β se ha mostrado como marcador subrogado de progresión clínica durante el seguimiento de estos pacientes [126]. Por tanto, para la monitorización de los pacientes con EM en tratamiento con IFN β se plantea un modelo basado en tres pilares: la aparición de actividad clínica definida en nuevos brotes, la progresión de discapacidad y la actividad radiológica, definida como la presencia de ≥ 3 nuevas lesiones durante un periodo de un año tras el inicio del TME [117].

1.3.3.2 Concepto de permanecer “sin evidencia de actividad” de EM (NEDA)

Con la aparición de fármacos de alta eficacia como natalizumab [81], eficaces incluso en pacientes con alta actividad inflamatoria [129], el objetivo de reducir el número de brotes y retrasar la progresión de la enfermedad empezó a verse como insuficiente. En 2009, un estudio post-hoc de Havrdova et al. del ensayo AFFIRM de natalizumab describía por primera vez una proporción de pacientes tratados con un TME que quedaban “libres de actividad de la enfermedad”, entendida como la ausencia de nuevos brotes, de progresión de la discapacidad y de nuevas lesiones en la RM [130]. Dado que la “actividad de la enfermedad” abarca muchos más aspectos que la actividad clínica (presencia de nuevos brotes y/o progresión de la EDSS) y la aparición focal de nuevas lesiones, este término se ha cambiado por el de “sin evidencia de actividad” (NEDA, del inglés “*No Evidence of Disease Activity*”). Aunque el concepto NEDA puede ser un indicador comparativo indirecto de eficacia entre las distintas TME, se está buscando su valor, no sólo como objetivo terapéutico, sino como indicador de fracaso terapéutico en caso de no

alcanzarlo, e incluso se plantea ampliar el concepto NEDA con la valoración de otros parámetros, como los cambios en el volumen cerebral, el estado cognitivo, la fatiga y medidas de calidad de vida [131].

1.4 La resonancia magnética en la esclerosis múltiple

La alta sensibilidad de la RM para la detección de las lesiones (placas) de desmielinización típicas de la EM, ha permitido una mayor comprensión de la historia natural, y supone una herramienta útil diagnóstica, pronóstica e incluso de monitorización de la respuesta al tratamiento [132].

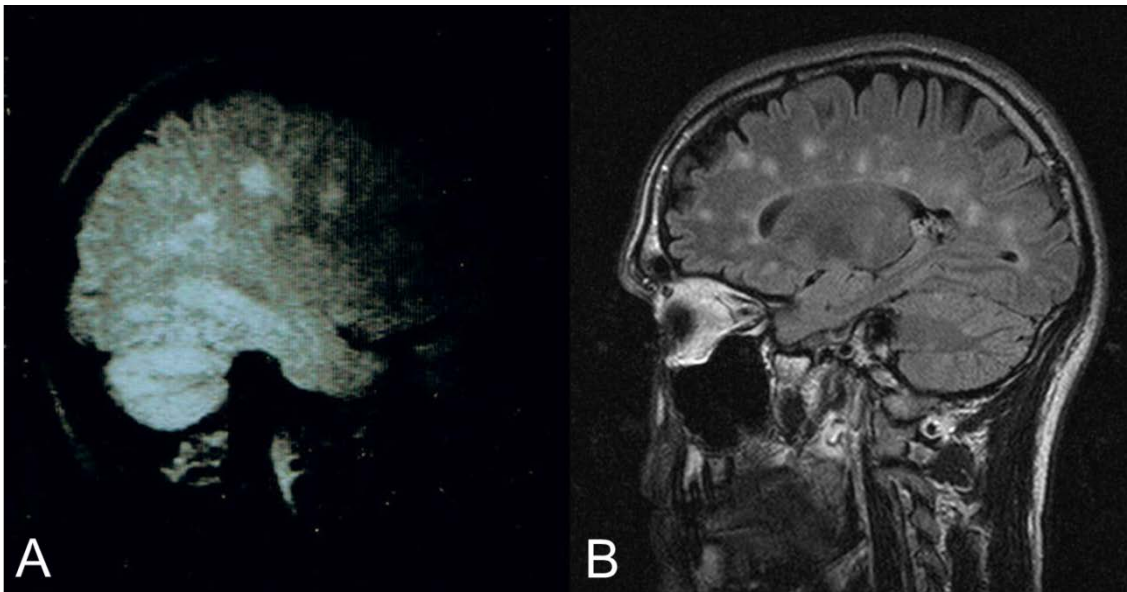
1.4.1 Semiología radiológica de las lesiones de esclerosis múltiple

Todas las lesiones desmielinizantes, independientemente de su fase evolutiva, se muestran hiperintensas en secuencias basadas en T2 y densidad protónica, lo que no las distingue de la mayor parte de afecciones del parénquima del SNC. La hiperintensidad es, por sí misma, muy poco específica, y no refleja la patogenia de la lesión. No obstante, la disposición de las lesiones y su morfología sí permite establecer unas lesiones típicas de EM [133]. Las lesiones suelen tener una morfología nodular, con un eje mayor perpendicular al eje anteroposterior de los hemisferios cerebrales en las lesiones supratentoriales periventriculares (dedos de Dawson), que otorgan un aspecto a la superficie de los ventrículos de “sierra” o de “quema de rastrojos” [134]. Las lesiones yuxtacorticales se encuentran pegadas a la corteza y suelen afectar a las fibras en U. Esta disposición se explica anatómicamente por la

preferencia de las placas desmielinizantes a desarrollarse alrededor de las vénulas (figura 3), guardando relación con la mayor preferencia de aparición en determinadas áreas anatómicas del SNC: periventriculares, cuerpo calloso, sustancia blanca yuxtacortical y parénquima infratentorial (incluyendo médula espinal) [135].

Las lesiones identificadas en secuencias ponderadas en T1 se muestran hipointensas, y corresponden entre un 10 a un 20% de las lesiones visibles en secuencias T2 o densidad protónica. Su significado puede ser heterogéneo, puesto que pueden ser transitorias, en relación con un proceso inflamatorio agudo, pero cuando se presentan de forma crónica reflejan pérdida tisular dentro de la placa desmielinizante. Las lesiones hipointensas crónicas son poco frecuentes en parénquima infratentorial y medular por causas no bien conocidas, siendo más frecuentes en parénquima supratentorial. Son mucho más abundantes en formas evolucionadas de EM o formas secundariamente progresivas (EMSP) [133].

Figura 3. Aspecto de las lesiones desmielinizantes en secuencias potenciadas en T2.



Las imágenes pertenecen a un mismo paciente con esclerosis múltiple remitente recurrente de evolución benigna, obtenidas con 21 años de diferencia. A. Secuencia T2 sagital de una RM de bajo campo (0,5 T), que muestra lesiones de aspecto ovoideo en la sustancia blanca, con eje perpendicular a los ventrículos laterales, realizada en 1986. B. Secuencia de inversión-recuperación y atenuación del líquido (FLAIR) sagital de una RM actual (1,5 T) realizada en 2007, en la que se muestra con mayor definición las lesiones de aspecto desmielinizante con eje perpendicular a los ventrículos laterales, siguiendo los trayectos venulares (dedos de Dawson), con patrón de “sierra o quema de rastrojos”. Debe señalarse que, a pesar de la aparente gran carga de lesiones desmielinizantes, la exploración del paciente es normal (EDSS de 0,0) tras más de 20 años de evolución.

La combinación del uso de secuencias potenciadas en T1 con la inyección endovenosa de contraste paramagnético (gadolinio) es capaz de detectar específicamente las lesiones activas inflamatorias, induciendo un acortamiento de los tiempos de relajación longitudinal, que se traducen en una hiperintensidad [136]. En condiciones normales, el gadolinio es incapaz de cruzar la barrera hematoencefálica, pero cuando existe un aumento de la permeabilidad de ésta, el gadolinio la atraviesa y difunde en el parénquima adyacente. Las lesiones activas suelen realizarse tras la administración de

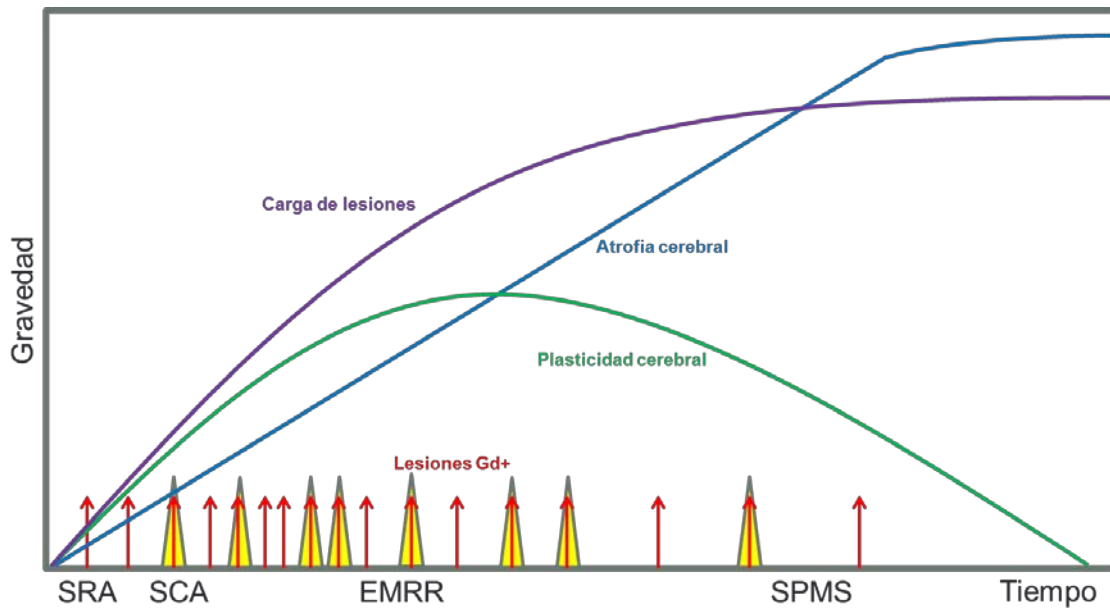
contraste con gadolinio no más de un mes, tiempo similar al de la duración espontánea de los episodios de brotes clínicos [133].

1.4.2 Disociación clínico-radiológica

Aunque se asume que el acúmulo de lesiones tiene una influencia negativa sobre la función neurológica, la correlación entre éstas y el desarrollo de discapacidad permanente es, por lo general, únicamente moderada (figura 3) [137–140].

Esto puede deberse, en parte, a las imperfecciones de las escalas clínicas utilizadas en EM, como la escala expandida del estado de discapacidad (EDSS, de *Expanded Disability Status Scale*) [141] y la escala funcional compuesta de esclerosis múltiple (MSFC, de *Multiple Sclerosis Functional Composite*) [142], que o bien no son lineales y presentan sesgos de observador (la EDSS en especial), o no abarcan todos los sistemas funcionales neurológicos. Por otro lado, aunque las lesiones causen destrucción irreversible del parénquima cerebral, los cambios pueden ser compensados por mecanismos de plasticidad cortical (figura 4) [140, 143]. Por último, la discapacidad clínica puede deberse, no solo a las lesiones, sino también a cambios concurrentes en el tejido cerebral aparentemente (al menos radiológicamente) normal [144].

Figura 4. Representación esquemática de la evolución natural de la esclerosis múltiple



Los triángulos amarillos representan los brotes clínicos, y las flechas rojas, la aparición de lesiones que presentan realce tras gadolinio. Brevemente, se diferencian dos etapas en la evolución de la enfermedad: una en la que predomina el fenómeno inflamatorio, en la que se acumulan lesiones en la RM, solo en moderada relación con el acúmulo de discapacidad, en gran medida por los mecanismos de reorganización cortical (plasticidad cerebral); y otra en la que, a pesar de que el fenómeno inflamatorio es menor o incluso inexistente, la discapacidad va progresando de forma independiente al fenómeno inflamatorio anterior (fenómeno amnésico) [11]. Lo que es común en ambas etapas es el desarrollo constante de atrofia cerebral. EMRR: esclerosis múltiple remitente recurrente; EMSP: esclerosis múltiple secundariamente progresiva; SCA: síndrome clínico aislado; SRA: síndrome radiológico aislado.

1.5 Técnicas de resonancia magnética para la medición del volumen cerebral en esclerosis múltiple

La pérdida de volumen cerebral se ha propuesto como una potencial herramienta para predecir el pronóstico en EM, ya que, como se ha comentado anteriormente, la cuantificación de las lesiones no refleja totalmente la patología clínicamente relevante. El daño neuroaxonal producido tanto en las

lesiones como en el tejido cerebral aparentemente normal conduce a una reducción en el volumen cerebral y es probablemente una de las causas subyacentes de discapacidad permanente [145, 146].

Algunos estudios, muestran que la atrofia cerebral comienza desde las etapas más tempranas de la enfermedad, y progresa con una tasa aproximada de 1% por año [147], considerablemente mayor que la pérdida anual de 0,18 – 0,3% de los controles sanos [148, 149].

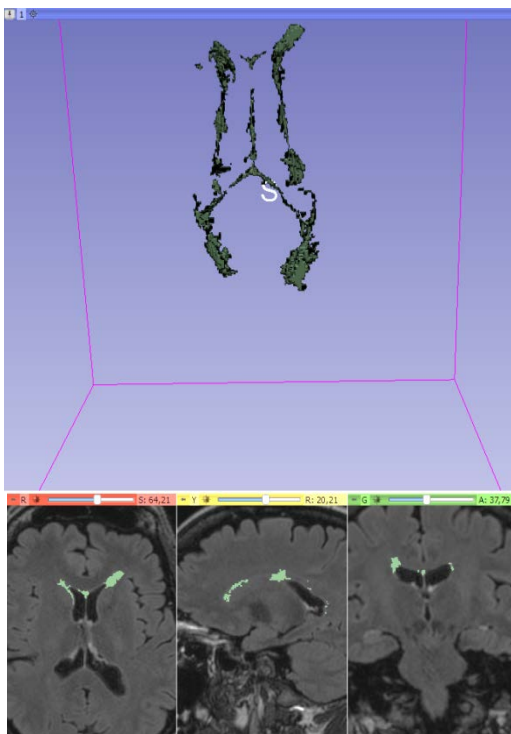
Las medidas de atrofia por imagen pueden presentar ventajas sobre el recuento de lesiones y otras técnicas de RM no convencionales (como, por ejemplo la espectroscopia [150, 151]) que miden los componentes moleculares del tejido nervioso. La atrofia cerebral refleja pérdida tisular, que incluye el daño neuroaxonal en el tejido cerebral aparentemente normal, mientras que el conteo de lesiones solo tiene en cuenta el daño focal de la enfermedad. Por otro lado, el volumen cerebral es relativamente fácil de medir mediante imágenes de RM convencionales, habiéndose desarrollado métodos de cálculo suficientemente sensibles y reproducibles, lo que hace que pueda utilizarse de forma más extendida que con medidas de RM no convencional. No obstante, debe tenerse en cuenta que las distintas técnicas que miden los volúmenes tisulares cerebrales no solo miden el daño neuroaxonal, sino también el resto de cambios bien fisiológicos (estado de hidratación), bien debidos a la EM (gliosis reactiva, desmielinización, procesos de remielinización, edema causado por la inflamación aguda), o bien provocados por efecto de las TME (citotoxicidad, resolución del edema producido por las lesiones). Por tanto, hay que distinguir la atrofia, o pérdida irreversible de parénquima, de la

pseudoatrofia, o disminución transitoria del volumen cerebral debido a pérdida de agua en algún compartimento tisular [152, 147].

1.5.1 Metodologías de medición de la atrofia cerebral

La atrofia puede observarse cualitativamente *de visu* revisando las imágenes de RM de un paciente, al observar los surcos cerebrales y las folias cerebelosas más marcados o el aumento de la talla ventricular [153]. De forma cuantitativa, podemos dividir los métodos de medición en manuales y automatizados.

Figura 5. Ejemplo de medida manual del volumen de las lesiones desmielinizantes en un paciente con esclerosis múltiple.



Los métodos manuales, que dependen de un observador/operador, suelen basarse en la medición lineal de una distancia entre una estructura y otra, o del cálculo del volumen a partir de determinar superficies en un número de cortes de imagen cerebral. La medición de la anchura del III ventrículo o del ventrículo lateral [154] y el conteo del número y volumen de las lesiones desmielinizantes (figura 5) son ejemplos [152]. Aunque representan el patrón oro

frente al que se comparan los métodos automatizados, suelen ocupar mucho tiempo (sobre todo con la medición de volúmenes), y pueden presentar una

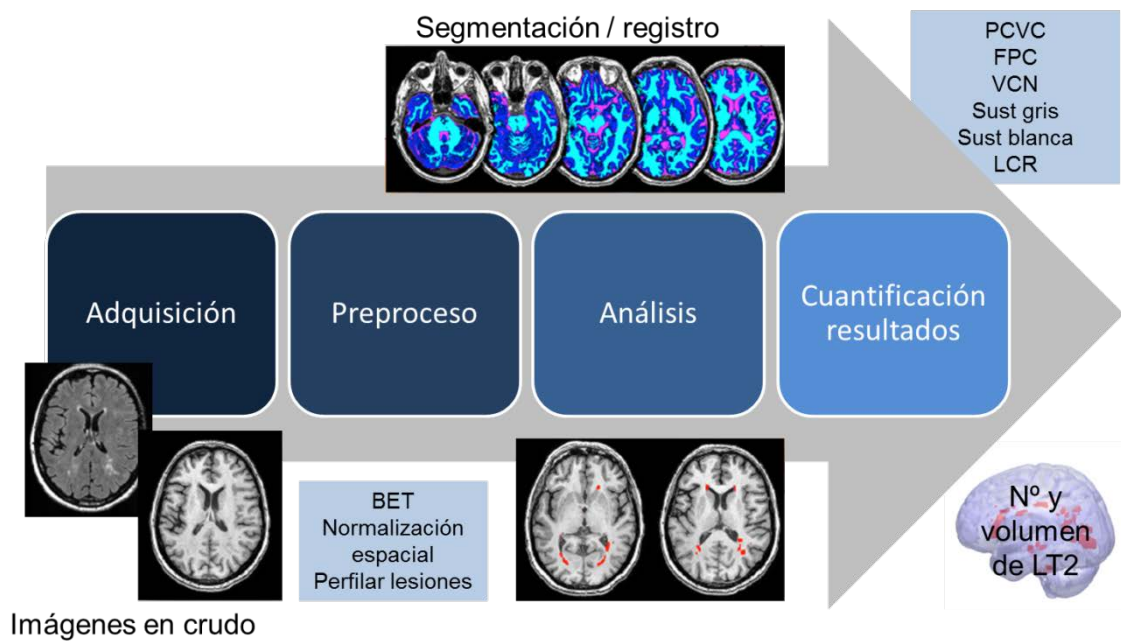
cierta variabilidad inter e intraobservador, corregible con la experiencia del operador.

Los métodos automatizados tienen las ventajas de ser completamente reproducibles, apenas precisan de la asistencia de un operador y, por tanto, son menos costosos en tiempo. Sin embargo, cabe mencionar que no existe ningún “atajo” metodológico por el que desde la adquisición de la imagen se obtengan directamente datos precisos de la volumetría cerebral, sino que ésta se basa en metodología de postproceso de imagen, dentro de un flujo de trabajo sistematizado (figura 6), en el que un error inicial (p. ej. mala adquisición de la imagen, artefactos de diversa índole), va a arrastrarse e incluso magnificarse durante el proceso. Por otro lado, existe una multitud de distintas técnicas/softwarees para la medición del volumen cerebral, no siempre comparables entre ellos [152].

En líneas generales, podemos subdividir los métodos automatizados en métodos basados en la segmentación y en métodos basados en el registro [146, 155].

Introducción

Figura 6. Esquema del flujo de trabajo de una metodología automatizada de obtención de parámetros de atrofia cerebral o determinación del conteaje y volumen de lesiones.



Adquisición: obtención de las imágenes originales (en crudo), con las que se trabajará para la obtención de volúmenes. **Preproceso:** conjunto de técnicas de proceso de imagen necesarias para preparar las imágenes en crudo antes de su análisis. Suele incluir entre otros 1) BET: la herramienta de extracción cerebral (Brain Extraction Tool), es un programa que separa la imagen cerebral del resto de tejidos del cráneo. 2) Normalización espacial: proceso por el que el sistema de coordenadas de las imágenes originales se adapta (normaliza) a un atlas anatómico preespecificado (habitualmente espacio Talairach o atlas MNI152). 3) Perfilar lesiones: proceso en el que bien un operador manual, un programa semi-automatizado o automatizado determina el contorno de las lesiones desmielinizantes y crea una máscara de lesiones (imagen que puede superponerse a la original). **Análisis:** obtención de un conjunto de vóxeles etiquetados como sustancia gris, sustancia blanca o líquido cefalorraquídeo (LCR) en las técnicas de segmentación, o a superficies de crecimiento o decrecimiento en las técnicas de registro. **Cuantificación resultados:** se trata del cálculo de los valores de los parámetros de interés; entre otros: 1) PCVC: porcentaje de cambio del volumen cerebral, 2) FPC: fracción de parénquima cerebral, 3) VCN: volumen cerebral normalizado, 4) sus equivalentes regionales (sustancia gris y blanca, líquido cefalorraquídeo), 5) número y volumen de las lesiones en T2 (LT2).

1.5.1.1 Técnicas de segmentación

La segmentación es una técnica de procesamiento de imágenes que se define como la partición de una imagen en regiones constituyentes no solapadas y que son homogéneas con respecto a alguna característica,

habitualmente una intensidad de gris o una textura. Por tanto, “etiquetan” cada unidad de volumen (vóxel) en función de la probabilidad de que corresponda a un tejido (sustancia gris, blanca o LCR) según la intensidad de señal y la localización del vóxel.

Las medida más común es la de la fracción de parénquima cerebral (FPC), inicialmente descrita por Rudick et al. [156]. Con esta técnica, el tejido cerebral es segmentado (diferenciado del resto del cráneo), y se calcula su volumen, el cual se divide entre el volumen total de la cavidad intracraneal, obtenido también durante el proceso. Se obtiene así la fracción del volumen total contenido dentro de la cavidad craneal, como medida normalizada de la atrofia. Las técnicas de segmentación suelen usarse en estudios transversales, como medida puntual del valor del volumen cerebral.

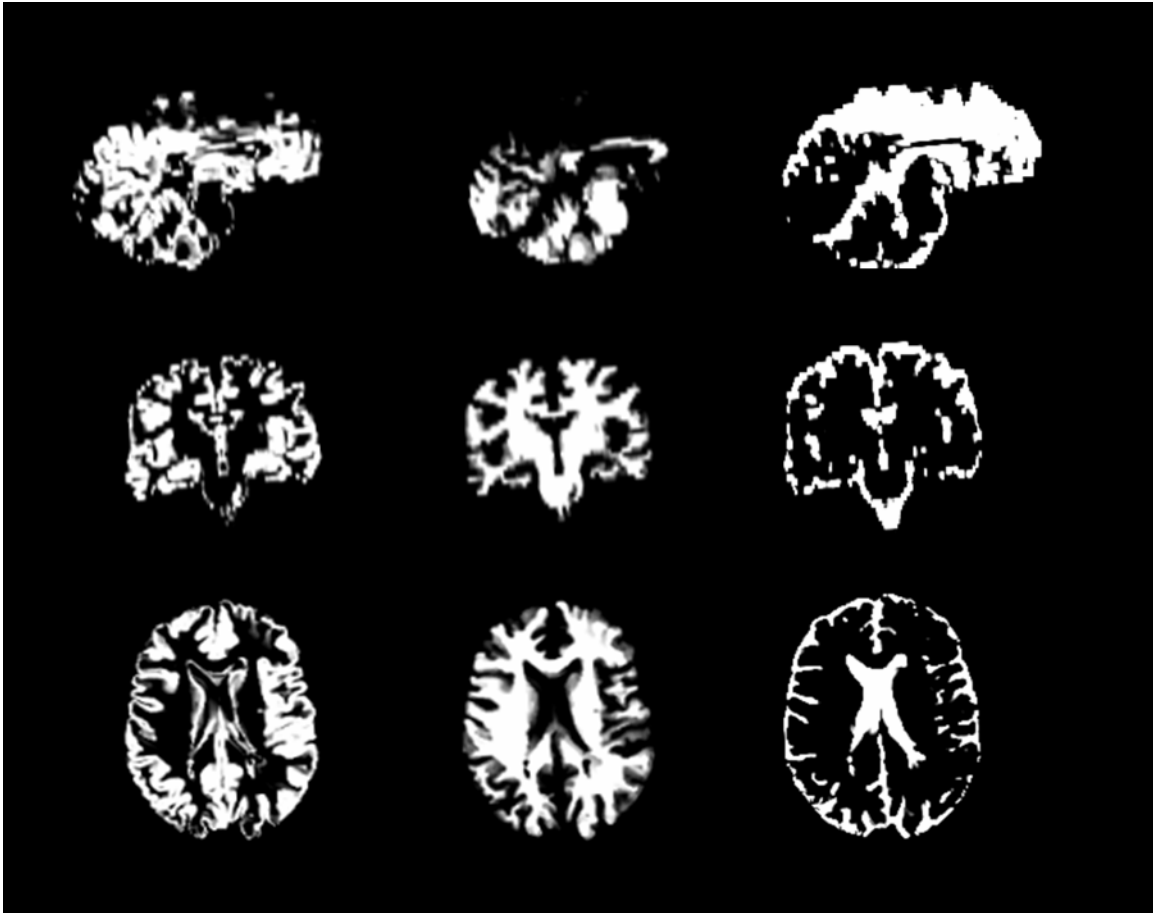
Las dos técnicas de segmentación de código abierto y de libre disposición para la comunidad científica más extendidas son el software *Statistical Parametric Mapping* (SPM) y la herramienta SIENAx, dentro de *FMRIB Software Library* (FSL).

SPM fue desarrollado inicialmente por el Departamento de Neurología Cognitiva de la *University College* de Londres (UCL), Reino Unido, para su aplicación en el análisis de las imágenes de tomografía por emisión de positrones. SPM realiza la segmentación del parénquima cerebral en LCR, sustancia gris y sustancia blanca (figura 7), usando para ello la intensidad del vóxel y su localización gracias a normalizar el espacio original (nativo) a un atlas estándar, el espacio MNI152 (*Montreal Neurological Institute*, que es un espacio obtenido de la superposición de 152 imágenes de RM de otros tantos

cerebros de voluntarios) [157]. Sus versiones SPM5 y SPM8 fueron desarrollados por el *Wellcome Trust Centre for Neuroimaging* del UCL, y recientemente ya se dispone de la versión SPM12.

FSL es una biblioteca completa de herramientas de análisis de imagen por RM, tanto estructural, como funcional, y para estudios de tractografía, desarrollado en colaboración por los grupos del departamento de Ciencias Neurológicas y del Comportamiento de la Universidad de Siena en Italia y el Centro Universitario de RM funcional cerebral (FMRIB) del departamento de Neurología Clínica de la Universidad de Oxford en Reino Unido. Entre sus herramientas se encuentra SIENAx (Evaluación de la atrofia de imagen estructural, usando normalización, del inglés *Structural Image Evaluation, using Normalisation, of Atrophy*) [158] que determina el volumen del parénquima cerebral (incluyendo opcionalmente la determinación de los volúmenes de sustancia gris, sustancia blanca y LCR) de una imagen de RM, normalizado para el tamaño del cráneo. En este aspecto, el parámetro que da como resultado no es la FPC, sino el volumen cerebral normalizado (VCN).

Figura 7. Ejemplo de segmentación del parénquima cerebral con Statistical Parametric Mapping (SPM).



De columna izquierda a derecha: máscaras de sustancia gris, blanca y líquido cefalorraquídeo. De fila superior a inferior: plano sagital, coronal y transversal. El algoritmo de segmentación cerebral de SPM genera un mapa que representa la probabilidad de que un vóxel en concreto pertenezca a cada uno de los tipos de tejido (sustancia gris, blanca o líquido cefalorraquídeo). La estimación del volumen se realiza en base al número de vóxeles en cada máscara multiplicado por el tamaño del vóxel. Las máscaras de tejido y el volumen se calculan según los siguientes pasos: 1) excluyendo los vóxeles que están dentro de la máscara de lesiones previamente creada, 2) excluyendo los vóxeles que tienen una probabilidad por debajo del umbral establecido de pertenecer a sustancia gris, blanca o líquido cefalorraquídeo, 3) clasificando el resto de vóxeles al tipo de tejido con la máxima probabilidad, y 4) calculando el volumen de sustancia gris, blanca, líquido cefalorraquídeo y de lesiones multiplicando el número de vóxeles por el tamaño del vóxel en milímetros. La metodología de SPM puede encontrarse explicada de manera más detallada en: <http://www.nmrgroup.ion.ucl.ac.uk/atrophy/method.html>.

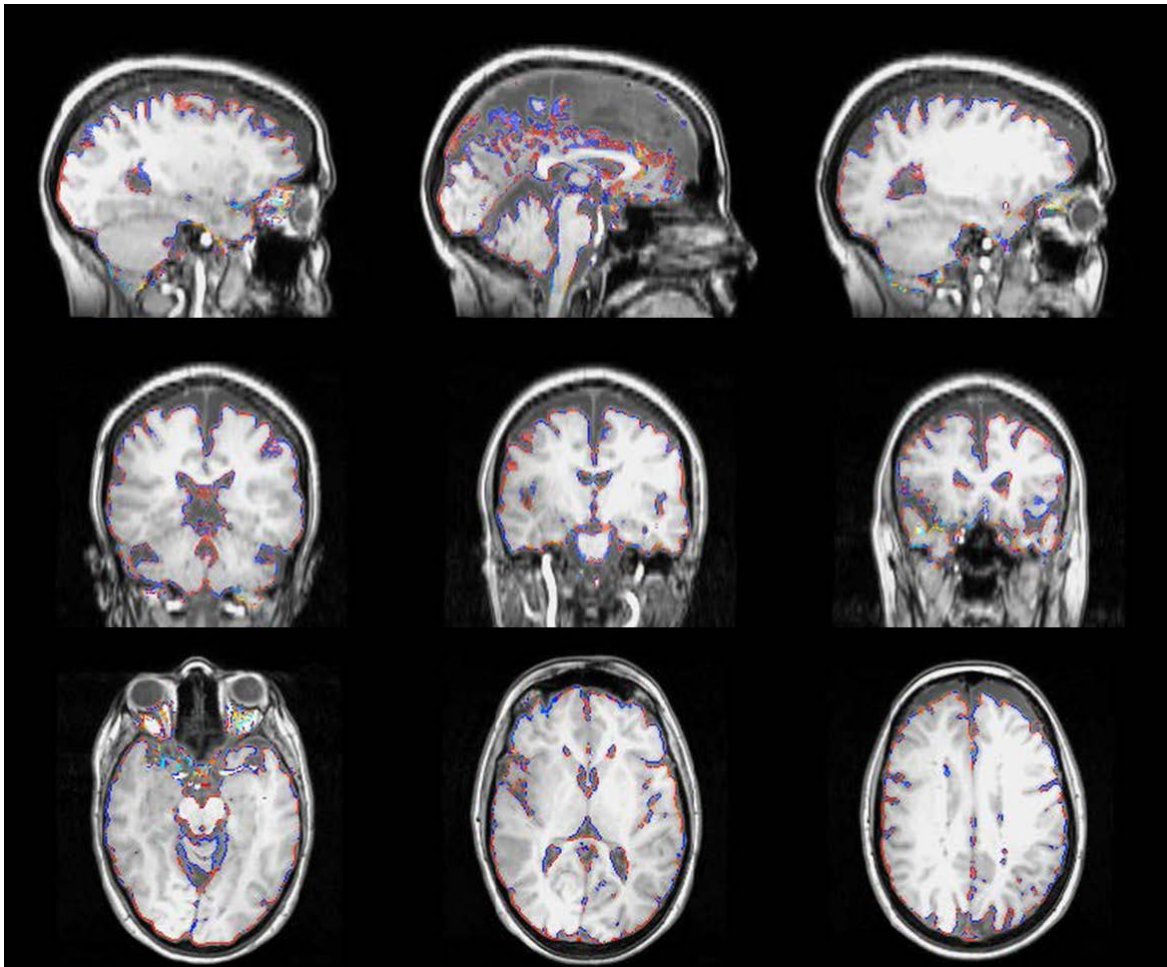
1.5.1.2 Técnicas de registro

El registro de imágenes es el proceso de superposición de dos o más imágenes que comparten un mismo sistema de coordenadas, y puede ser especialmente útil para determinar el crecimiento o decrecimiento de una estructura, mediante la cuantificación directa de los cambios de volumen por la sustracción de imágenes emparejadas [155], o para alinear en un mismo espacio dos técnicas distintas (p.ej. imágenes de tomografía por emisión de positrones con la tomografía computerizada o PET-TAC).

Una de las herramientas más extendidas y más usadas para estudios longitudinales es SIENA (Evaluación de la atrofia de imagen estructural, usando normalización, del inglés *Structural Image Evaluation, using Normalisation, of Atrophy*) [159] (figura 8). SIENA tiene una buena reproducibilidad, con un error de 0,1 – 0,2% de adquisición – readquisición. El parámetro que se obtiene de las técnicas de registro es el porcentaje de cambio del volumen cerebral (PCVC).

Figura 8. Ejemplo del cálculo del porcentaje de cambio del volumen cerebral mediante técnica de registro con SIENA (Structural Image Evaluation, using Normalization, of Atrophy).

atrofia  0  crecimiento



La herramienta SIENA empieza separando las imágenes del cerebro y el cráneo de las dos imágenes de RM obtenidas en dos momentos del tiempo diferentes. Luego, las imágenes del cerebro se alinean, usando las imágenes del cráneo como referencia de límites. Ambas imágenes se redimensionan al espacio a mitad de camino entre las dos. Se realiza una segmentación del parénquima cerebral para encontrar los bordes entre vóxeles de cerebro/no cerebro, y se determina el eje de desplazamiento perpendicular entre ambas imágenes en estos bordes. Finalmente, este eje medio de desplazamiento se convierte en una estimación del porcentaje de cambio del volumen cerebral (PCVC) entre ambos puntos. En el ejemplo que se muestra, la separación temporal entre ambos estudios de RM fue de 3 meses, siendo el PCVC de -0,05%. La metodología de SIENA puede encontrarse explicada de manera más detallada en <http://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslwiki/SIENA>.

1.6 Justificación del estudio

En los pacientes con EM, el daño en el SNC acumulado de forma constante conduce finalmente a discapacidad clínica cuando afecta a componentes clave del SNC. Para valorar la evolución de los pacientes con EM, en la práctica habitual se suelen utilizar escalas de exploración clínicas como la EDSS. Ya que la progresión de la enfermedad es generalmente lenta y difícil de medir objetivamente, para cuando se detectan cambios clínicos, el acúmulo de daño irreversible en el SNC ya se ha producido. La progresión clínica puede, por tanto, representar solo la “punta del iceberg” de los cambios patológicos de la enfermedad.

En este contexto, es prioritaria la búsqueda de nuevas medidas pronósticas de la enfermedad más sensibles, precoces, y con mayor relación con la patogenia subyacente a la progresión clínica. De momento, la RM es la mejor herramienta paraclínica que cuenta el neurólogo para ver y medir las lesiones patogénicas *in vivo*. Sin embargo, la visualización de las lesiones desmielinizantes en la RM no abarca todo el fenómeno patogénico de la EM, lo que implica cierta limitación en el pronóstico de discapacidad en las formas tempranas de la enfermedad, y en la respuesta a las distintas terapias.

Actualmente, disponemos de programas informáticos específicos para la medición del volumen cerebral, que no implican realizar secuencias especiales de RM y son aplicables incluso de forma retrospectiva en el histórico de RM de los pacientes. Su medición podría aportar una valiosa información sobre la

evolución de los mecanismos de neurodegeneración subyacentes al inicio de la enfermedad y al comenzar un tratamiento.

2 Hipótesis

La hipótesis de la presente tesis doctoral se basa en la utilidad en la práctica clínica de las medidas de atrofia cerebral determinadas mediante RM en pacientes con EM, tanto en los pacientes con formas tempranas de la enfermedad, tales como los pacientes que desarrollan un primer brote o SCA, en los que pueden predecir el desarrollo de EMCD y su discapacidad futura, así como en los pacientes con formas de EMCD no tratados previamente que inician por primera vez terapia inmunomoduladora con IFN β , en los que pueden ayudar a predecir la evolución bajo tratamiento.

3 Objetivos

En pacientes con SCA

1. Medir los cambios de volumen cerebral que se producen en el primer año de evolución tanto de forma global como específica de tejido (sustancia gris, sustancia blanca).
2. Investigar la asociación del desarrollo de atrofia global y específica de tejido con la discapacidad medida con la escala EDSS.
3. Investigar la asociación del desarrollo de atrofia global y específica de tejido, con el desarrollo de una EM clínicamente definida.

En pacientes con EM que inician terapia con IFN β

1. Medir los cambios de volumen cerebral que se producen de forma precoz tanto de forma global como específica de tejido (sustancia gris, sustancia blanca).
2. Investigar la asociación del desarrollo de atrofia global y específica de tejido (sustancia gris, sustancia blanca) con la evolución de los parámetros clínicos (presencia de nuevos brotes, aumento de discapacidad irreversible medida con la escala EDSS).
3. Calcular, si existen, puntos de corte específicos del grado de atrofia global o específica de tejido a partir de los cuales el grado de atrofia permita predecir de forma más precisa la evolución de la enfermedad.

4 Pacientes y métodos

4.1 Pacientes, criterios de selección y evaluaciones clínicas

4.1.1 Pacientes con síndrome clínico aislado

De un total de 368 pacientes diagnosticados de SCA y seguidos de manera prospectiva en un estudio longitudinal llevado a cabo en el Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya (Cemcat) desde 2001, se seleccionó una muestra según los siguientes criterios:

- a) pacientes menores de 50 años de edad;
- b) menos de 12 semanas desde el primer síntoma sugerente de SCA hasta la primera evaluación clínica;
- c) un tiempo de seguimiento de más de 24 meses desde el primer episodio clínico desmielinizante;
- d) disponibilidad de las imágenes de RM craneales realizadas a los 3 y 12 meses desde el SCA.

Según estos criterios, 133 pacientes fueron excluidos debido a un tiempo de seguimiento inferior a 24 meses, y 59 pacientes debido a incumplir el protocolo de imagen por RM (no obtención de RM en los plazos fijados) y/o por una calidad subóptima de obtención de imágenes. Finalmente, se incluyó para el análisis a 176 pacientes con SCA (cohorte SCA).

Todos los pacientes fueron seguidos trimestralmente o semestralmente; en cada visita clínica se calculó la EDSS y se evaluó la presencia de nuevos brotes clínicos. El diagnóstico de EM se basó en los criterios de McDonald

2005 [59]. De acuerdo a los criterios diagnósticos usados, todos los análisis posteriores se realizaron, bien en la totalidad de la muestra (n=176), o en cada uno de los siguientes 3 subgrupos, mutuamente excluyentes:

- a) pacientes que desarrollan un segundo brote durante el seguimiento, es decir, que pueden ser catalogados como EM clínicamente definida (*EMCD*, n=76);
- b) pacientes que cumplen durante el seguimiento criterios de McDonald 2005 de diseminación en tiempo y espacio solo en términos radiológicos, es decir, sin haber sufrido un segundo brote (*EM radiológica*, n=32);
- c) pacientes que no cumplen criterios de EM por McDonald 2005 ni han desarrollado un 2º brote en la última observación (*SCA no EM*, n=68).

Las imágenes por resonancia magnética se realizaron en cada paciente a los 3 meses después del primer síntoma de SCA (RM basal), y después de 1 año (RM de seguimiento). Las imágenes de las RM de seguimiento se compararon con los estudios basales, para evaluar la presencia de diseminación radiológica en espacio y tiempo [59]. Las imágenes de RM se tomaron al menos 30 días tras la última dosis de corticoesteroides, si fuese el caso.

4.1.2 Pacientes con esclerosis múltiple que inician tratamiento con interferón β

Un total de 123 pacientes con EM que iniciaron tratamiento con IFN β (cohorte TME) fueron seleccionados de un estudio longitudinal a largo plazo

llevado a cabo en el Cemcat desde 2001 (figura 9), de acuerdo a los siguientes criterios:

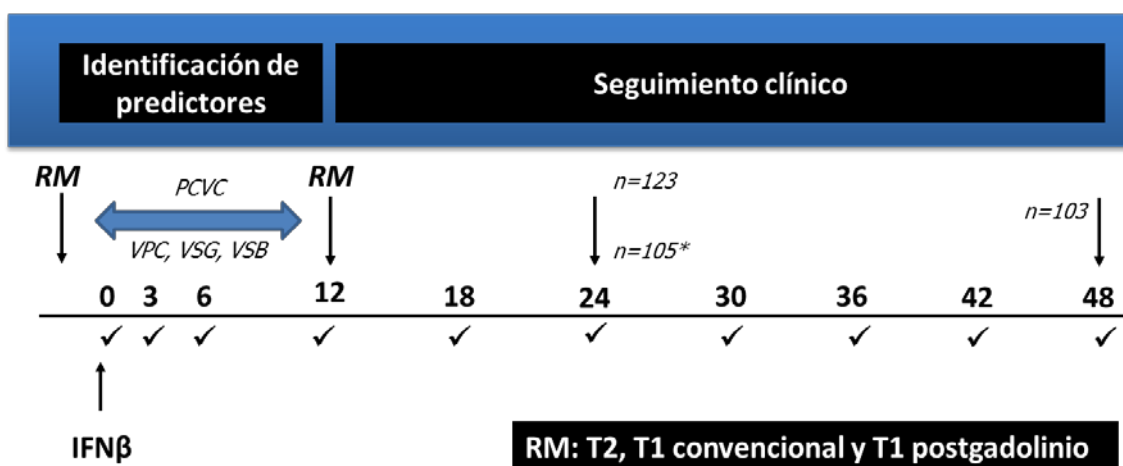
- a) terapia ininterrumpida con IFN β más de 48 meses;
- b) no haber recibido previamente ningún medicamento inmunosupresor o inmunomodulador;
- c) tener disponibilidad de las imágenes de RM cerebral realizadas en los tres meses previos al inicio de IFN β y a los 12 meses después de iniciar IFN β .

Dieciocho de los 123 pacientes fueron excluidos debido a incumplir el protocolo de imagen por RM (no obtención de RM en los plazos fijados) y/o por una calidad subóptima de obtención de imágenes. La muestra a los 24 meses estuvo compuesta, por tanto, de 105 pacientes, y a los 48 meses por 103 (se perdieron en el seguimiento 2 pacientes entre los 24 – 48 meses, figura 10).

Durante el periodo de observación del estudio, la única terapia de segunda línea aprobada era la mitoxantrona; ninguno de los pacientes recibió ninguno de los fármacos de segunda línea aprobados en la actualidad, o inmunosupresores, durante el periodo de observación. Todos los pacientes fueron seguidos trimestralmente o semestralmente; en cada visita clínica se calculó la EDSS y se evaluó la presencia de nuevos brotes clínicos. El diagnóstico de EM se realizó según los criterios de McDonald 2001 [58].

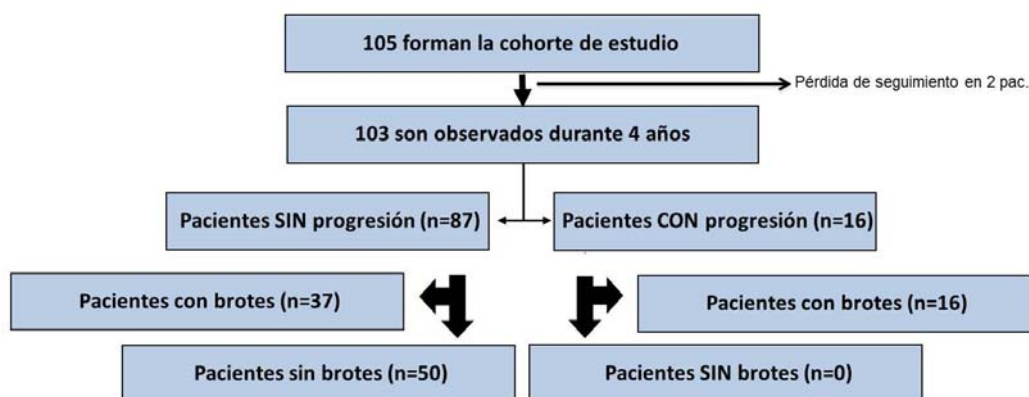
Se calculó la tasa anualizada de brotes (TAB) previa al inicio del tratamiento como la media de brotes de los dos años anteriores al inicio del tratamiento con IFN β . Se definió como progresión de discapacidad al incremento de la EDSS (1 punto si la EDSS previa era de 5,0 o menos; 0,5 puntos si la EDSS era de 5,5 o superior), confirmado en una visita posterior con una separación de al menos 6 meses.

Figura 9. Resumen del protocolo de estudio observacional de respuesta a interferón β .



Las flechas indican puntos en el tiempo (meses) en el que se valoran las mediciones; *: 18 pacientes fueron excluidos por no seguir el protocolo de imagen; PCVC: porcentaje de cambio del volumen cerebral; RM: resonancia magnética; VPC: volumen de parénquima cerebral total (suma de los volúmenes de sustancia gris y blanca); VSB: volumen de sustancia blanca; VSG: volumen de sustancia gris.

Figura 10. Clasificación de los pacientes observados durante 4 años



4.2 Metodología de imagen por resonancia magnética y análisis volumétrico cerebral

Las imágenes por RM se obtuvieron en un equipo con un imán de 1,5 T, con una bobina de cabeza estándar. Se incluyeron las siguientes secuencias: densidad de protones transversal y *fast spin-eco* potenciada en T2 (tiempo de repetición [TR] 3,000 ms / tiempo de excitación [TE] 14 a 85 ms / número de excitaciones [NEX] 2) y en T1 *spin-eco* (TR 600 / TE 15 / NEX 2) sin contraste y tras administrar contraste paramagnético (gadobutrol 0,1 mmol/kg; retraso en adquisición de imagen, 5 min). Todas las secuencias fueron obtenidas con 3 mm de grosor de corte, sin una separación entre cortes. El mencionado protocolo de imagen, se ajusta a las recomendaciones actuales de la Sociedad Española de Neurología para la correcta interpretación de los estudios de RM en pacientes con EM [160].

Se determinó el número de lesiones en secuencias potenciadas en T2 (LT2), así como el número de lesiones que presentaban realce tras la

administración de contraste (CEL) en las RM basal y de seguimiento en ambas cohortes.

Las máscaras de lesiones de EM fueron creadas en condiciones apropiadas de reproducibilidad, con el objetivo de evitar errores de clasificación de las lesiones focales de la sustancia blanca como sustancia gris. El porcentaje de cambio de volumen cerebral (PCVC) se calculó comparando las imágenes de RM basales y de seguimiento mediante el programa SIENA [158, 161]. Los resultados del post-proceso de las imágenes fueron evaluados *de visu* para detectar errores en la segmentación.

En la cohorte con SCA, los resultados de la RM basal se definieron como normal / anormal (definido como ausencia / presencia de lesiones cerebrales focales subclínicas características de EM), y se determinó el número de criterios de Barkhof-Tintoré. Las imágenes de RM basales y de seguimiento de cada paciente fueron analizadas para calcular la fracción de parénquima cerebral (FPC), la fracción de sustancia gris (FSG) y la fracción de sustancia blanca (FSB), mediante un algoritmo semiautomatizado (spm_segment de Jon Jackson, disponible en www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/ext/#spm_segment), implementado en *Statistical Parametrical Mapping* versión 5 (SPM5, Wellcome Department of Cognitive Neurology, University College of London, Reino Unido) y mediante MRlcro (Chris Rorden, *University of Nottingham*, Reino Unido). Los porcentajes de cambio en las fracciones tisulares se obtuvieron por la sustracción de las fracciones basales de las fracciones obtenidas en la RM de seguimiento, y dividiendo el resultado por las fracciones basales y luego multiplicando por 100. Se obtuvieron así los porcentajes de cambio de la

fracción de parénquima cerebral (%cFPC), de la fracción de sustancia gris (%cFSG) y de la fracción de sustancia blanca (%cFSB).

En la cohorte TME, las imágenes de RM basales y de seguimiento de cada paciente fueron analizadas para el cálculo de los volúmenes de parénquima cerebral (VPC), de sustancia gris (VSG) y sustancia blanca (VSB), mediante un algoritmo semiautomatizado propio implementado en *Statistical Parametrical Mapping* versión 8 (SPM8, Wellcome Department of Cognitive Neurology, University College of London, Reino Unido) y mediante MRICro (Chris Rorden, University of Nottingham, Reino Unido). Se determinaron los cambios desde la exploración basal a la de seguimiento para cada volumen. Los porcentajes de cambio en los volúmenes tisulares se obtuvieron por la sustracción de los volúmenes basales de los volúmenes de la RM de seguimiento, y dividiendo el resultado por los volúmenes basales, y luego multiplicando por 100. Se calcularon de esta forma los porcentajes de cambio del volumen de parénquima cerebral (%cVPC), del volumen de sustancia gris (%cVSG) y del volumen de sustancia blanca (%cVSB). Finalmente, se consideró para el análisis todos los valores obtenidos de PCVC (n=105), mientras que para el análisis de las variables dependientes de SPM8 (VPC, VSG, VSB) solo se consideraron los valores obtenidos de 84 pacientes, debido a errores de segmentación producidos durante la determinación de los volúmenes cerebrales específicos de tejido.

4.3 Análisis estadístico

El análisis se realizó mediante los programas SPSS v17.0 y v19.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*, Chicago, IL, EEUU), GraphPad Prism v5.01 (La Jolla, CA, EEUU) y la aplicación web *Cutoff finder* de libre acceso basada en el lenguaje estadístico R, del Departamento de Patología Molecular del Hospital Universitario de la Charité de Berlín, Alemania (<http://molpath.charite.de/cutoff>) [162].

Para evaluar si las variables continuas seguían una distribución normal, se usó el test de Kolmogorov-Smirnoff, excepto si $n < 30$, en cuyo caso se usó el test de Shapiro-Wilk. En los casos de no asunción de una distribución normal, se prefirió usar los test no paramétricos sobre los paramétricos para detectar diferencias entre grupos.

Se empleó el coeficiente de correlación de Pearson para detectar la presencia de asociaciones lineales entre PCVC, el porcentaje de cambio en fracciones (%cFPC, %cFSG, %cFSB) o volúmenes (%cVPC, %cVSG, %cVSB) tisulares y las variables clínicas y radiológicas, excepto por el EDSS, en el que se prefirió usar el test de rangos de Spearman.

Se consideraron significativos los valores de $P < 0,05$, sin corrección por comparaciones múltiples, con el fin de evitar errores de tipo II [163].

4.3.1 Análisis específicos en la cohorte de pacientes con síndromes clínicos aislados

En la cohorte SCA, se determinaron las curvas de supervivencia de tiempo a un segundo brote para cada quintil de PCVC, %cFPC, %cFSG y %cFSB, y se compararon mediante el test log-rank (Mantel-Cox). El modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox se usó para ajustar los cambios en el volumen cerebral/fracciones específicas de tejido por la edad, sexo y uso de corticoesteroides en el primer brote o SCA. Para investigar el valor predictivo añadido de la atrofia, junto con el ajuste de todas las variables anteriormente mencionadas, se evaluaron dos modelos, cada uno incluyendo un set de parámetros de RM diferente, como sigue:

- a) número de LT2 en la RM basal, presencia de CEL tanto en RM basal como de seguimiento;
- b) número de criterios de Barkhof-Tintoré.

4.3.2 Análisis específicos en la cohorte de pacientes con EM que inician terapia inmunomoduladora con interferón β

En la cohorte TME, se calcularon los puntos de corte para aquellas variables relacionadas con la atrofia cerebral global o específica de tejido (VSG, VSB) que mostrasen una asociación estadísticamente significativa para predecir la progresión de discapacidad a 4 años en el análisis univariante. Para ello, se calculó una curva de característica operativa del receptor (COR) y el índice de Youden (punto de mayor sensibilidad y especificidad) para determinar

el punto a partir del cual el valor de los descensos de volumen cerebral predecía con mayor sensibilidad y especificidad el desarrollo de progresión de discapacidad. Los pacientes fueron distribuidos de forma dicotómica de acuerdo a los valores de los puntos de corte. Se determinaron las curvas de supervivencia de tiempo a desarrollo de progresión de discapacidad confirmada a 6 meses a 4 años para cada grupo, y se compararon mediante el test log-rank (Mantel-Cox). El modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox se usó para ajustar los cambios en el volumen cerebral global o específico de tejido (VSG, VSB) por la edad, sexo, tiempo desde el primer síntoma de EM a inicio de terapia con IFN β , TAB previa al tratamiento con IFN β , presencia de nuevos brotes durante el primer año de tratamiento con IFN β , número de lesiones nuevas o que han aumentado de tamaño en secuencias potenciadas en T2 (NLT2) tras 12 meses de terapia ininterrumpida con IFN β , presencia de CEL tanto en RM basal como de seguimiento y los valores del volumen basal.

5 Resultados

Se presentan en primer lugar los resultados del estudio del valor predictivo de las medidas de atrofia en pacientes que desarrollan un SCA y, en segundo lugar, los resultados del estudio del valor predictivo de las medidas de atrofia en pacientes con EM que inician terapia con IFN β , de acorde a los distintos objetivos de esta tesis.

5.1 Resultados del estudio del valor predictivo de las medidas de atrofia global y específica de tejido en los pacientes que desarrollan un síndrome clínico aislado

5.1.1 Características de la cohorte de estudio

Los datos demográficos y las características clínicas de los pacientes incluidos en el análisis y de los pacientes excluidos por incumplimiento en la obtención de la RM craneal o por una calidad subóptima de la imagen médica se muestran en la tabla 3. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de pacientes, excepto por una mayor frecuencia de haber recibido tratamiento con corticoesteroides intravenosos en la muestra incluida en el estudio en comparación con los pacientes excluidos ($p=0,045$).

Un 27% de las RM basales de los pacientes presentaron CEL, con una media de 5,6 lesiones con realce tras contraste (desviación estándar [DE] 7,5). Igualmente, aunque no necesariamente en los mismos pacientes, un 27% de las RM de seguimiento mostraron actividad inflamatoria en forma de CEL, con

Resultados

una media de 2,5 lesiones (DE 2,3). El tiempo medio entre el SCA y la RM basal fue de 3,5 meses (DE 1,02). El tiempo medio entre la RM basal y de seguimiento fue de 8,4 meses (DE 1,8).

Tabla 3. Características demográficas y clínico-radiológicas de la muestra de pacientes con un síndrome clínico aislado, divididas en pacientes analizados y pacientes excluidos.

	Muestra analizada (n=176)	Pacientes excluidos* (n=59)	p
Sexo (% mujeres)	70,5	76,3	0,246
Edad media (DE)	30,9 (8,3)	31,2 (8,2)	0,767
Localización del SCA (% NO / Otros)	33,5 / 66,5	37,3 / 62,7	0,354
Tratamiento con MPIV tras SCA, n (%)	86 (49,4)	21 (35,6)	0,045
BOC presentes en LCR, n (%)	86 (59,3)	32 (74,4)	0,051
Meses de seguimiento, media (DE)	53 (16,8)	47,9 (19,3)	0,054
Desarrollo de un 2.º brote, n (%)	76 (43,2)	22 (38,6)	0,326
Meses a un 2.º brote, media (DE)	22,4 (19,7)	20 (20,3)	0,620
Uso de TME, n (%)	70 (40,2)	24 (40,7)	0,535
Evolución a EM por McDonald, n (%)	103 (58,5)	31 (56,4)	0,448
Presencia de lesiones en RM basal, n (%)	130 (77,8)	39 (71)	0,193
3/4 criterios de B-T en RM basal, n (%)	83 (50,3)	19 (38)	0,086

*Pacientes excluidos debido a incumplir el protocolo de imagen por RM (no obtención de RM en los plazos fijados) y/o por una calidad subóptima de obtención de imágenes. B-T: Barkhof-Tintoré; BOC: bandas oligoclonales de IgG; DE: desviación estándar; EM: esclerosis múltiple; LCR: líquido cefalorraquídeo; NO: neuritis óptica; MPIV: metilprednisolona intravenosa; RM: resonancia magnética; SCA: síndrome clínico aislado; TME: terapias modificadoras de enfermedad. Los valores de p significativos se destacan en negrita.

5.1.2 Cambios en los volúmenes cerebrales

Los cambios en los volúmenes cerebrales en toda la muestra y en los distintos grupos se muestran en la tabla 4. A modo de resumen:

- 1) en el total de pacientes del estudio se encontraron descensos significativos en el PCVC y en el %cFSG;
- 2) en los pacientes que desarrollan EM durante el seguimiento (n = 108), se encontraron descensos significativos en las medidas de atrofia global (PCVC, %cFPC) y en sustancia gris, pero no en sustancia blanca.
- 3) en los pacientes que desarrollaron un 2º brote, se encontraron descensos en las medidas de atrofia global (PCVC, %cFPC) y en sustancia gris, pero no en sustancia blanca;
- 4) en los pacientes que desarrollaron *EM radiológica* pero no clínica, se encontró un descenso significativo en el %cFSG, pero no en los parámetros de atrofia global (PCVC, %cFPC) o en sustancia blanca;
- 5) en los pacientes que no desarrollaron EM durante el periodo de observación (*SCA no EM*) no se encontraron descensos significativos del volumen cerebral global o específico de tejido.

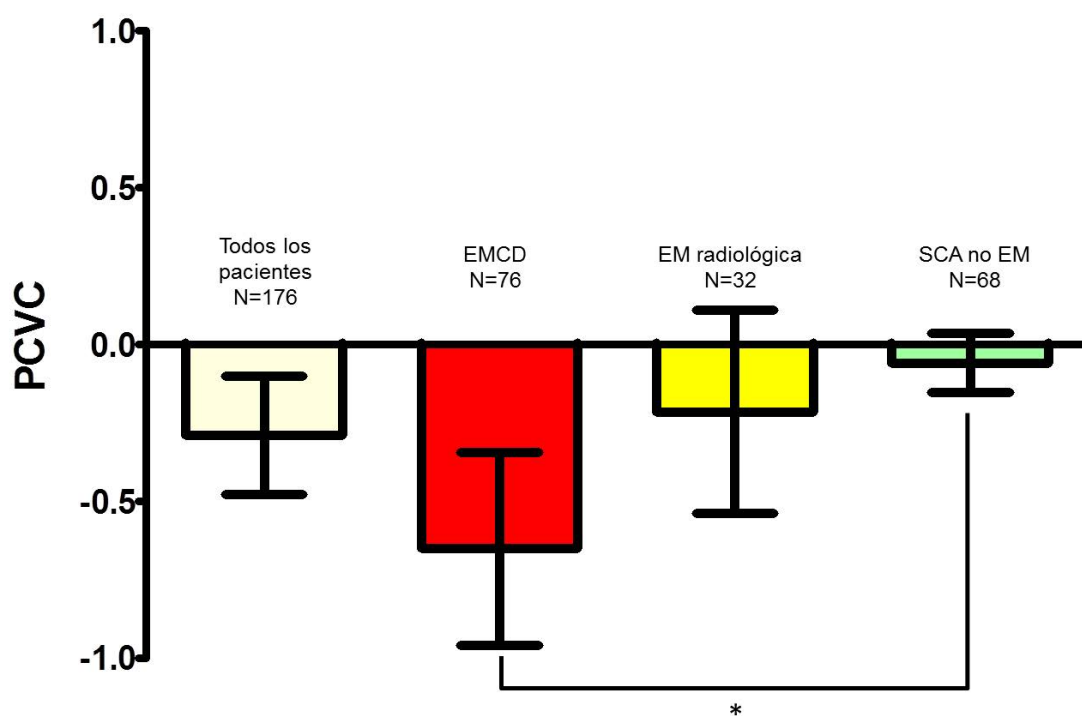
Tabla 4. Comparación de los cambios en los volúmenes cerebrales globales y específicos de tejidos entre los distintos grupos de pacientes.

	Tot. muestra (n=176)		EM (n=108)		EMCD (n=76)		EM radiológica (n=32)		SCA no EM (n=68)		Comp. EM-no EM		ANOVA p [^]
	Media (DE)	p*	Media (DE)	p*	Media (DE)	p*	Media (DE)	p*	Media (DE)	p*	p		
PCVC	-0,29 (1,28)	<0,001	-0,52 (1,24)	<0,001	-0,65 (1,35)	<0,0001	-0,22 (0,90)	0,186	+0,059 (1,28)	0,707	0,003	0,0034	
%cFPC	-0,19 (1,58)	0,102	-0,34 (1,66)	0,037	-0,46 (1,79)	0,028	-0,04 (1,26)	0,852	+0,02 (1,45)	0,895	0,143	0,154	
%cFSG	-0,54 (2,10)	0,001	-0,68 (2,15)	0,001	-0,68 (2,32)	0,013	-0,70 (1,74)	0,031	-0,34 (2,21)	0,209	0,312	0,600	
%cFSB	+0,39 (3,82)	0,175	+0,23 (3,85)	0,541	-0,07 (4,19)	0,881	+0,94 (2,81)	0,068	+0,695 (3,84)	0,139	0,432	0,338	

* prueba t para muestra única para $\mu_0 = 0$; ^Test de análisis de la varianza (ANOVA) entre los grupos EMCD, EM radiológica y SCA no EM; %cFPC: porcentaje de cambio de la fracción de parénquima cerebral; %cFSB: porcentaje de cambio de la fracción de sustancia blanca; %cFSG: porcentaje de cambio de la fracción de sustancia gris; Comp. EM – no EM: comparativa entre las medias de los cambios del volumen (prueba t de Student para muestras independientes) entre pacientes que desarrollan EM durante el seguimiento (n=108) y los pacientes que no cumplen criterios de EM por McDonald 2005 en la última observación; EM: pacientes que desarrollan esclerosis múltiple durante el seguimiento, bien por desarrollar un segundo brote, bien por cumplir criterios de McDonald 2005 solo en términos radiológicos; EMCD: pacientes que desarrollan un segundo brote (esclerosis múltiple clínicamente definida) durante el seguimiento; DE: desviación estándar; EM radiológica: pacientes que cumplen durante el seguimiento criterios de diseminación en tiempo y espacio por McDonald 2005 de esclerosis múltiple solo en términos radiológicos; PCVC: porcentaje de cambio de volumen cerebral; SCA no EM: pacientes que no cumplen criterios de EM por McDonald 2005 en la última observación. Los valores de p estadísticamente significativos se destacan en negrita.

Tanto el análisis entre pacientes EM frente a no EM, como el análisis de la varianza (ANOVA) entre los tres grupos, mostraron diferencias significativas para el PCVC. El test *post hoc* de Bonferroni (figura 11) detectó que las diferencias eran significativas ($p < 0,001$) entre los pacientes que habían desarrollado *EMCD* y los pacientes *SCA no EM*. No se detectaron otras diferencias entre las medias del %cFPC, %cFSG o %cFSB de los distintos grupos.

Figura 11. Porcentaje de cambio del volumen cerebral (media con intervalo de confianza del 95%).



* Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$) en el test post-hoc de Bonferroni. EMCD: pacientes que desarrollan un segundo brote (esclerosis múltiple clínicamente definida) durante el seguimiento; EM radiológica: pacientes que cumplen durante el seguimiento criterios de diseminación en tiempo y espacio por McDonald 2005 de esclerosis múltiple solo en términos radiológicos; PCVC: porcentaje de cambio de volumen cerebral; SCA no EM: pacientes que no cumplen criterios de EM por McDonald 2005 en la última observación.

5.1.3 Correlación entre las variables de volumetría cerebral y las variables clínicas y radiológicas

La tabla 5 muestra la totalidad de las correlaciones bivariadas entre los parámetros volumétricos y las variables clínicas y radiológicas. A modo de resumen:

Toda la muestra (n = 176). Mayores descensos de volumen cerebral global en se asocian a un mayor número de CEL en la RM basal (PCVC, %cFPC), a un mayor número de LT2 en la RM basal (PCVC), a una mayor puntuación EDSS en el primer año (PCVC) y a un incremento en la EDSS entre 0 – 12 meses (PCVC) y 0 – 24 meses (%cFPC). Un mayor descenso en el %cFSG mostró una correlación con un incremento en la EDSS entre 0 – 24 meses. No se observaron correlaciones significativas del %cFSB y el resto de variables clínicas y/o radiológicas.

Pacientes con EM (n = 108). Mayores descensos de volumen cerebral global se asociaron a una mayor edad en la visita basal (%cFPC), a un mayor número de CEL en la RM basal (PCVC), a un mayor número de LT2 en la RM basal (PCVC), a un incremento en el número de LT2 en la RM de seguimiento (PCVC), a una mayor puntuación EDSS en el primer año (PCVC) y a un incremento en la EDSS entre 0 – 12 meses (PCVC, %cFPC) y 0 – 24 meses (PCVC, %cFPC). Un incremento en el %cFSG se asoció a un mayor número de CEL en la RM de seguimiento. No se observaron correlaciones significativas entre el %cFSB y el resto de variables clínicas y/o radiológicas.

Pacientes con EMCD (n = 76). Mayores descensos de volumen cerebral global se asociaron a un mayor número de CEL en la RM basal (PCVC) y a un mayor número de LT2 en la RM basal (PCVC, %cFPC). No se observaron otras correlaciones entre los cambios de volumen cerebral global o específico de tejido (%cFSG, %cFSB) y las variables clínicas y/o radiológicas.

Pacientes con EM radiológica (n = 32). No se encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre los cambios en el volumen cerebral global medido por PCVC y las variables clínicas o de RM. Un mayor descenso en el %cFPC se asoció a una mayor edad en la visita basal, y a una mayor puntuación en el EDSS a los 12 y 24 meses de seguimiento. Un mayor descenso en el %cFSG se asoció a una mayor puntuación en el EDSS a los 24 meses de seguimiento, y los incrementos en el %FSG se asociaron a un incremento en el número de LT2 en la RM de seguimiento. No se observaron correlaciones significativas entre el %cFSB y el resto de variables clínicas y/o radiológicas.

Pacientes SCA no EM (n = 68). No se observaron correlaciones estadísticamente significativas entre los cambios de volumen cerebral global o específico de tejido (%cFSG, %cFSB) y las variables clínicas y/o radiológicas, con la excepción de la edad con el %cFPC y el %cFSG.

Tabla 5. Correlaciones clínico-radiológicas

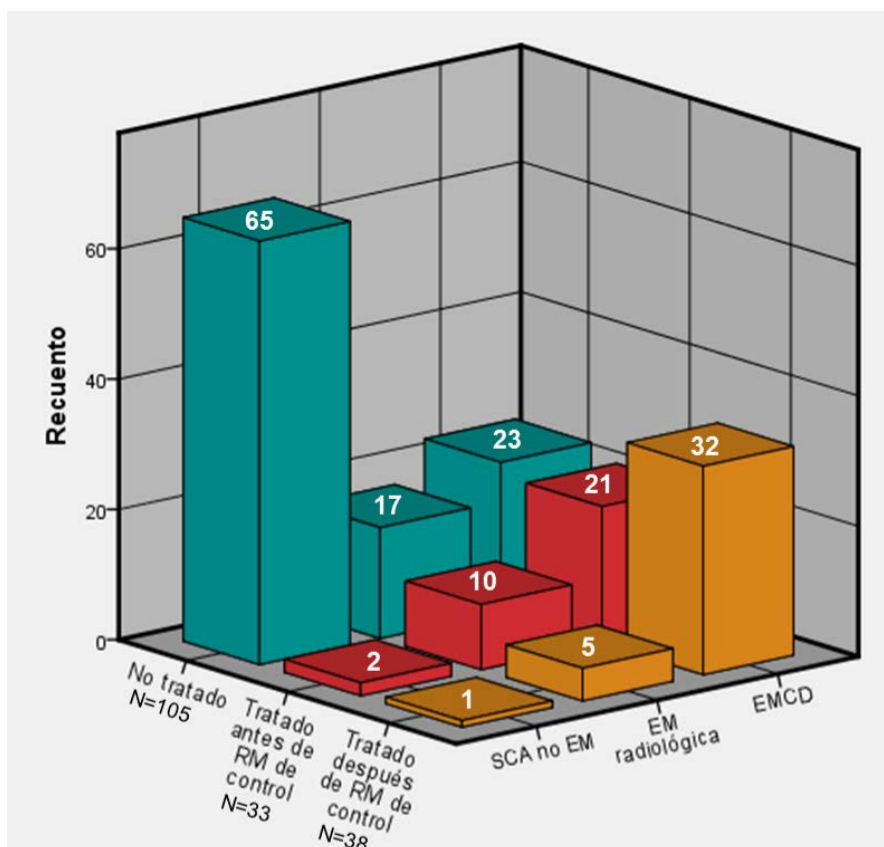
	Toda la muestra (n=176)			EM (n=108)			EMCD (n=76)			EM radiológica (n=32)			SCA no EM (n=68)		
	Var.	r/rho	p	Var.	r/rho	p	Var.	r/rho	p	Var.	r/rho	p	Var.	r/rho	p
Edad		NC		FPC	-0,20	0,040		NC		FPC	-0,40	0,023	FPC FSG	+0,28 +0,24	0,021 0,048
CEL-bas	PCVC FPC	-0,21 -0,16	0,005 0,036	PCVC	-0,21	0,031	PCVC	-0,24	0,041	NC	NC	NC	NC	NC	NC
CEL-seg		NC		FSG	+0,23	0,021		NC			NC			NC	NC
LT2-bas	PCVC	-0,28	<0,001	PCVC	-0,24	0,016	PCVC FPC	-0,29 -0,32	0,013 0,007		NC			NC	NC
NLT2*		NC		PCVC	-0,21	0,035		NC		FSG	+0,44	0,012		NC	NC
EDSS*															
12 m	PCVC	-0,20	0,009	PCVC	-0,19	0,047		NC		FPC	-0,38	0,040		NC	NC
24 m		NC			NC			NC		FPC FSG	-0,37 -0,45	0,047 0,016		NC	NC
Cambio 0-12 m	PCVC	-0,20	0,011	PCVC FPC	-0,24 -0,19	0,014 0,050		NC			NC			NC	NC
Cambio 0-24 m	FPC FSG	-0,19 -0,18	0,017 0,025	PCVC FPC	-0,20 -0,20	0,047 0,040		NC			NC			NC	NC

*: test de rangos de Spearman; Cambio 0 – 12 m y 0 – 24 m: cambios en la EDSS entre 0 – 12 y 0 – 24 meses respectivamente; CEL-bas: número de lesiones que presentaban realce tras la administración de contraste en las imágenes de resonancia magnética basales; CEL-seg: número de lesiones que presentaban realce tras la administración de contraste en las imágenes de resonancia magnética de seguimiento; EDSS: escala expandida del estado de discapacidad (Expanded Disability Status Scale); EM: pacientes que desarrollan esclerosis múltiple durante el seguimiento, bien por desarrollar un segundo brote, bien por cumplir criterios de McDonald 2005 solo en términos radiológicos; EMCD: pacientes que desarrollan un segundo brote (esclerosis múltiple clínicamente definida) durante el seguimiento; EM radiológica: pacientes que cumplen durante el seguimiento criterios de diseminación en tiempo y espacio por McDonald 2005 de esclerosis múltiple solo en términos radiológicos; FPC: fracción de parénquima cerebral; FSB: fracción de sustancia blanca; FSG: fracción de sustancia gris; LT2-bas: número de lesiones hiperintensas en secuencias potenciadas en T2 en las imágenes de resonancia magnética basales; NC: no se hallaron correlaciones significativas entre los cambios de volumen cerebral global o específicos de tejido; NLT2: cambios en el número de lesiones en T2 entre las imágenes de resonancia magnética basales y de seguimiento; PCVC: porcentaje de cambio de volumen cerebral; SCA no EM: pacientes que no cumplen criterios de EM por McDonald 2005 en la última observación; Var: parámetros de cambios de volumen cerebral. FPC, FSB y FSG se refieren al porcentaje de cambio entre los valores basales y de seguimiento.

5.1.4 Efecto de las terapias modificadoras del curso de la enfermedad y los corticoesteroides

De los 71 pacientes que recibieron TME, 33 (18,75% del total) lo hicieron durante el periodo desde la aparición del SCA hasta la RM de control. La distribución de los pacientes tratados antes/después de la RM de control y los no tratados respecto a la evolución clínica (*SCA no EM*, *EM radiológica*, *EMCD*), se muestra en la figura 12.

Figura 12. Distribución de los pacientes según si fueron tratados de forma precoz, tardía o no tratados y según la evolución clínica posterior.



El número que aparece dentro de cada columna representa el número de pacientes. EMCD: pacientes que desarrollan un segundo brote (esclerosis múltiple clínicamente definida) durante el seguimiento; EM radiológica: pacientes que cumplen durante el seguimiento criterios de diseminación en tiempo y espacio por McDonald 2005 de esclerosis múltiple solo en términos radiológicos; SCA no EM: pacientes que no cumplen criterios de EM por McDonald 2005 en la última observación; RM: resonancia magnética.

El tratamiento con TME se asoció de forma estadísticamente significativa con mayores tasas de atrofia cerebral global detectada por SIENA (PCVC media en los pacientes que iniciaron TME de $-0,67\%$, frente a $-0,13\%$ en los que permanecieron sin tratamiento; $p = 0,001$) y con una tendencia estadística a tener una mayor tasa de atrofia cerebral global medida por SPM5 (%cFPC en los pacientes con TME de $-0,5\%$, frente a $-0,07\%$ en los que no recibieron tratamiento; $p = 0,059$), pero no con las variables volumétricas específicas de tejido (%cFSG, %cFSB). En los pacientes que iniciaron TME previamente a la RM de control, estas tasas de atrofia fueron especialmente altas respecto a los que no iniciaron TME o frente a aquellos que iniciaron TME después de la RM de control (tabla 6).

Sin embargo, existe una estrecha relación, como es lógico en los pacientes tras haber sufrido un SCA, entre iniciar una TME y desarrollar EM ($\chi^2 = 61,414$; $p = 4,626 \cdot 10^{-15}$), por lo que existe una alta colinealidad entre ambas variables. La colinealidad puede demostrarse realizando una regresión lineal para predecir el PCVC a partir de ambas variables (“desarrollo de EM por McDonald 2005” y “uso de TME”), mediante análisis univariado y luego multivariado (tabla 7). Por este motivo, el uso de TME no fue añadido al análisis multivariante, aunque se decidió crear un modelo alternativo excluyendo a los pacientes tratados con TME antes de la RM de control.

No se halló ninguna asociación entre las variables de atrofia cerebral global (PCVC, %cFPC) o específica de tejido (%cFSG, %cFSB) y el haber recibido tratamiento con corticoesteroides durante el primer brote o SCA.

Tabla 6. Comparación de los cambios en los volúmenes cerebrales globales y específicos de tejidos entre los distintos grupos de pacientes, separados en pacientes que han recibido terapia modificadora de la evolución de la enfermedad antes de la resonancia magnética de control anual, después, y en aquellos que no han recibido terapia modificadora de la evolución de la enfermedad.

	Muestra sin IFNβ precoz (n=143)		IFNβ precoz (n=33)		IFNβ post (n=38)		No TME (n=105)		ANOVA		Comp. TME precoz - resto	
	Media (DE)	p*	Media (DE)	p*	Media (DE)	p*	Media (DE)	p*	p [^]	B	p	p
PCVC	-0,14 (1,11)	0,141	-0,99 (1,73)	0,002	-0,37 (0,77)	0,006	-0,06 (1,20)	0,641	0,001	TME precoz – No TME	0,010	
%cFPC	+0,00 (1,43)	0,989	-1,06 (1,93)	0,003	-0,02 (1,41)	0,928	+0,01 (1,44)	0,946	0,002	TME precoz – TME post TME precoz – No TME	0,005	
%cFSG	-0,32 (2,12)	0,072	-1,55 (2,19)	<0,001	-0,13 (2,27)	0,722	-0,39 (2,06)	0,057	0,011	ns	0,003	
%cFSB	+0,56 (3,74)	0,074	-0,27 (4,23)	0,720	+0,17 (3,22)	0,750	+0,71 (3,91)	0,067	0,408	ns	0,264	

* prueba t para muestra única para $\mu_0 = 0$; ^TTest de análisis de la varianza (ANOVA) entre los grupos IFNβ precoz, IFNβ post y No TME; %cFPC: porcentaje de cambio de la fracción de parénquima cerebral; %cFSB: porcentaje de cambio de la fracción de sustancia blanca; %cFSG: porcentaje de cambio de la fracción de sustancia gris; B: comparativas de grupos con diferencias estadísticamente significativas en el análisis post-hoc de Bonferroni ($\alpha=0,0167$); Comp. TME precoz – resto: comparativa entre las medias de los cambios del volumen (prueba t de Student para muestras independientes) entre pacientes que recibieron terapia con interferón β antes de la resonancia magnética de control anual y el resto de pacientes; IFN β post: pacientes que recibieron terapia con interferón β después de la resonancia magnética de control anual; IFN β precoz: pacientes que recibieron terapia con interferón β antes de la resonancia magnética de control anual; TME: terapia modificadora de la evolución de la enfermedad. Los valores de p estadísticamente significativos se destacan en negrita.

Tabla 7. Demostración de la colinealidad entre el uso de terapias modificadoras de la evolución de la enfermedad con el diagnóstico de esclerosis múltiple según criterios de McDonald 2005 mediante regresión lineal para la predicción del porcentaje de cambio del volumen cerebral.

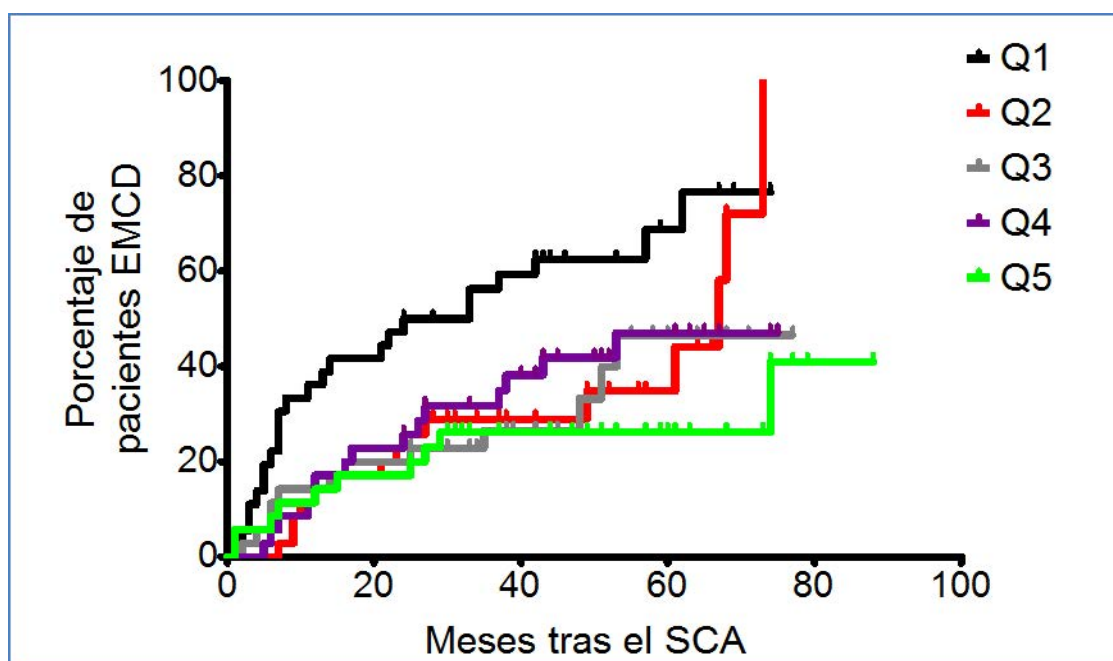
Modelos	Coef. reg.	Error típ.	t	p
Univariante				
(Constante)	0,083	0,146	0,571	0,569
McDonald	-0,651	0,191	-3,409	0,001
(Constante)	-0,133	0,105	-1,262	0,209
TME	-0,538	0,166	-3,242	0,001
Multivariante				
(Constante)	-0,016	0,126	-0,125	0,901
McDonald	-0,338	0,204	-1,654	0,100
TME	-0,336	0,205	-1,639	0,103

Coef. reg.: coeficiente de regresión; constante: valor de la ordenada en el origen ($x=0$) de la recta de regresión lineal; error típ.: error típico o estándar; McDonald: diagnóstico de esclerosis múltiple por criterios de McDonald 2005; t: test de Wald (división de cada coeficiente de regresión por su respectivo error estándar); TME: uso de terapias modificadoras de la evolución de la enfermedad.

5.1.5 El desarrollo de atrofia cerebral en el primer año tras un síndrome clínico aislado como predictor del desarrollo de un segundo brote

Los pacientes fueron agrupados en quintiles de PCVC, siendo el primer quintil el de mayor grado de atrofia medida con PCVC y el quinto el de menor (figura 13). Los pacientes agrupados en el primer quintil ($PCVC \leq -0,8715\%$) presentaron con mayor frecuencia un segundo brote durante el seguimiento que el resto de quintiles ($p = 0,003$).

Figura 13. Comparación de las curvas de supervivencia en base al PCVC dividido en quintiles.



El 1.^{er} quintil (Q1, PCVC de $-0,817\%$ o inferior) se muestra como una línea negra; el 2.^o quintil (Q2, PCVC entre $-0,817\%$ y $-0,413\%$) se muestra como una línea roja; el 3.^{er} quintil (Q3, PCVC entre $-0,413\%$ y $-0,085\%$) se muestra como una línea gris; el 4.^o quintil (Q4, PCVC entre $-0,085\%$ y $0,360\%$) se muestra como una línea púrpura; el 5.^o quintil (Q5, PCVC de $+0,360\%$ o superior) se muestra como una línea verde. Los casos censurados se muestran como marcas verticales sobre las líneas. EMCD: pacientes que desarrollan un segundo brote (esclerosis múltiple clínicamente definida) durante el seguimiento; PCVC: porcentaje de cambio del volumen cerebral.

Se calcularon dos modelos de regresión de riesgos proporcionales de Cox (tabla 8), como se menciona en la sección 5.3.1 de Pacientes y métodos. Las variables comunes a ambos modelos son: PCVC (agrupado en quintiles, con los intervalos descritos en la figura 13), haber recibido tratamiento con corticoesteroides para el SCA y la edad (agrupada en tener 30 años o menos, frente a ser mayor de 30 años de edad). El modelo 1 muestra que pertenecer al 1.^{er} quintil de PCVC y tener en la RM basal más de 9 lesiones hiperintensas en T2 y CEL son factores predictores independientes de un segundo brote

(EMCD). El modelo 2 muestra que pertenecer al 1.^{er} quintil de PCVC y el número de criterios de Barkhof-Tintoré en la RM basal (agrupados en 0 criterios frente a tener 1 – 2 o frente a 3 – 4) fueron factores predictores independientes de un segundo brote (EMCD). No se encontró que los cambios en la FPC, FSG y FSB fuesen predictores del desarrollo de un segundo brote tras un SCA durante el seguimiento, tanto en análisis univariante como en multivariante según los modelos antes expuestos.

Se repitió el análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox en el subgrupo de pacientes que queda al excluir los pacientes que iniciaron terapia con IFN β antes de la RM de control anual, como se menciona en el apartado 6.1.4 (tabla 8).

Tabla 8. Modelos de regresión de riesgos proporcionales de Cox de predicción de desarrollar un segundo brote tras un síndrome clínico aislado (toda la muestra, n=176)

PCVC	Toda la muestra (n=176)				Muestra sin IFN β precoz (n=143)			
	HR	p	IC95%		HR	p	IC95%	
			Inferior	Superior			Inferior	Superior
1. ^{er} quintil	¹ 2,376	0,031	1,080	5,225	¹ 3,501	0,007	1,399	8,762
	² 3,108	0,003	1,467	6,588	² 4,306	0,001	1,779	10,420
2. ^o quintil	-	ns	-	-	-	ns	-	-
3. ^{er} quintil	-	ns	-	-	-	ns	-	-
4. ^o quintil	-	ns	-	-	-	ns	-	-
Edad \leq 30 años	-	ns	-	-	-	ns	-	-
Sexo femenino	-	ns	-	-	-	ns	-	-
MPIV tras SCA	-	ns	-	-	² 2,219	0,034	1,060	4,643
MPIV tras SCA	-	ns	-	-	-	ns	-	-
MODELO NÚMERO 1¹								
CEL en RM basal	2,316	0,004	1,318	4,070	-	ns	-	-
CEL en RM control	-	ns	-	-	2,128	0,030	1,074	4,214
LT2 en RM basal								
1-9 lesiones	-	ns	-	-	-	ns	-	-
>9 lesiones	3,841	0,021	1,223	12,060	-	ns	-	-
MODELO NÚMERO 2²								
Número B-T								
1-2 criterios	5,545	0,001	1,982	15,509	6,066	0,002	1,965	18,732
3-4 criterios	7,256	<0,001	2,827	18,626	7,846	<0,001	2,695	22,842

¹Modelo que incluye la presencia de lesiones con realce tras gadolinio en la RM basal, presencia de lesiones con realce tras gadolinio en RM de seguimiento y el número de lesiones hiperintensas en secuencias potenciadas en T2 en la RM basal categorizadas en tres grupos: 0 lesiones, 1 – 9 lesiones y >9 lesiones. ²Modelo que incluye el número de criterios de diseminación espacial de las lesiones de esclerosis múltiple de Barkhof-Tintoré, categorizados en tres grupos: 0 criterios, 1 – 2 criterios y 3 – 4 criterios. Las variables comunes a ambos modelos^{1,2} fueron: PCVC categorizada en quintiles (intervalos mostrados en figura 4), edad categorizada en \leq 30 años o $>$ 30 años, sexo y haber recibido tratamiento con corticoesteroides intravenosos durante el síndrome clínico aislado. No se muestran los resultados del 5.^o quintil de PCVC (\geq 0,360%), no presentar ninguna lesión T2 en la RM basal y no cumplir ningún criterio de Barkhof-Tintoré, ya que son los grupos definidos como referencia para el análisis de regresión de Cox. B-T: criterios de Barkhof-Tintoré de diseminación espacial de las lesiones de esclerosis múltiple en resonancia magnética; CEL: lesiones que presentan realce tras la administración de contraste; IC95%: intervalo de confianza del 95%; LT2: número de lesiones hiperintensas en secuencias potenciadas en T2; MPIV: metilprednisolona intravenosa; PCVC: porcentaje de cambio del volumen cerebral; HR: razón de riesgos; SCA: síndrome clínico aislado.

5.2 Resultados del estudio del valor predictivo de las medidas de atrofia global y específica de tejido en pacientes con EM que inician terapia con interferón β

5.2.1 Características de la cohorte de estudio

Las características basales demográficas, clínicas y de volumetría cerebral de los pacientes incluidos en el estudio, se presentan en la tabla 9.

5.2.2 Evolución clínica tras 2 y 4 años de seguimiento

Se observó un decremento estadísticamente significativo en el valor de la TAB de los dos años previos al tratamiento (tabla 9) comparada con la de los 2 primeros años en seguimiento y con la de los años 3^o y 4^o (media de brotes de EM en el 1.^{er} y 2.^o año postratamiento de 0,27 [DE 0,47], $p < 0,001$; media de brotes de EM en el 3.^{er} y 4.^o año postratamiento de 0,27 [DE 0,42], $p < 0,001$; prueba de los rangos con signo de Wilcoxon). El porcentaje de pacientes sin nuevos brotes de EM a los 2 años fue de 63,8% (67 pacientes), y a los 4 años de 48,5% (50 pacientes). La EDSS mediana se mantuvo estable durante el seguimiento en toda la cohorte de estudio (EDSS mediana a los 24 y 48 meses de 1,5 [RIC 1,5]), sin diferencias estadísticamente significativas en ambos puntos temporales.

Tabla 9. Características demográficas, clínicas y de volumetría cerebral de los pacientes incluidos.

	Pacientes incluidos (n=105)	
Años de edad, media (DE)	34,30 (9,05)	
Sexo femenino, n (%)	83 (79,00)	
Años desde el 1.^{er} brote hasta inicio de IFNβ, media (DE)	4.47 (4,16)	
Presencia de BOC en LCR (n=30), n (%)	29 (96,70)	
	Media (DE)	Mediana (RIC)
Brotos antes del tratamiento		
Año -2 (-2 a)	2,05 (0,78)	2,0 (3,0)
Año -1 (-1 a)	1,5 (0,67)	1,0 (3,0)
Tasa anualizada de brotes = (-2 a + -1 a) / 2	1,78 (0,65)	1,5 (2,5)
EDSS basal, mediana (RIC)	1,5 (1,0)	
Tratamiento inicial		
IFN β -1b sc - n (%)	21 (20)	
IFN β -1a im - n (%)	38 (36,2)	
IFN β -1a sc - n (%)	46 (43,8)	
Tratamiento final		
Sigue con el mismo, n (%)	86 (81,9)	
Cambia a otra TME, n (%)	11 (10,5)	
Retirada, n (%)	8 (7,6)	
	Media (DE)	Mediana (RIC)
Volúmenes tisulares en RM (n=84)		
Cerebral total (ml)	1072,63 (110,57)	1073,17 (146,29)
Sustancia gris (ml)	588,15 (69,74)	585,29 (96,26)
Sustancia blanca (ml)	482,02 (62,76)	484,06 (76,41)

BOC: bandas oligoclonales; DE: desviación estándar; EDSS: escala expandida del estado de discapacidad (Expanded Disability Status Scale); IFN β : interferón β ; im: intramuscular; LCR: líquido cefalorraquídeo; RIC: rango intercuartílico; sc: subcutáneo; TME: terapia modificadora de la evolución de la enfermedad. El número de pacientes es 105 en todas las mediciones si no se indica lo contrario.

5.2.3 Cambios sobre los parámetros de lesiones en el primer año de tratamiento en toda la muestra y según la evolución clínica posterior

Toda la muestra. Se observó un descenso estadísticamente significativo para todos los recuentos y volúmenes de lesiones, excepto para el recuento de LT2, que mostró un ligero incremento (tabla 10).

Tabla 10. Número y volumen de las lesiones de la RM del momento basal y de seguimiento anual.

N = 105	RM BASAL		RM SEGUIMIENTO		p
	Media (DE)	Mediana (RIC)	Media (DE)	Mediana (RIC)	
Recuento de lesiones					
LT2	68,08 (58,66)	54 (55,0)	70,39 (58,79)	55 (56,5)	0,019*
CEL	2,94 (7,82)	1,0 (3,0)	0,4 (0,94)	0 (0,0)	<0,001*
Volúmenes de lesiones (ml)					
LT2	7,94 (8,77)	5,04 (7,35)	6,92 (7,30)	4,29 (6,90)	<0,001*
CEL	0,45 (1,36)	0,05 (0,27)	0,05 (0,15)	0 (0,0)	<0,001*
	N	%	N	%	p
Presencia de CEL	62	59	21	20	<0,001[^]

*: prueba de los rangos con signo de Wilcoxon; ^: test de McNemar; CEL: lesiones que presentan realce tras la administración de contraste; DE: desviación estándar; LT2: lesiones hiperintensas en secuencias potenciadas en T2; RIC: rango intercuartílico; RM: resonancia magnética.

Según la presencia de nuevos brotes de EM. Los pacientes libres de brotes a los 4 años (n = 50) presentaron reducciones estadísticamente significativas en el número de CEL y en el volumen de LT2 y CEL, así como una menor proporción de pacientes que presentaban CEL en la RM anual en comparación con la basal. Los pacientes que tuvieron nuevos brotes (n = 53) tras 4 años de seguimiento presentaron un incremento estadísticamente significativo en el número de LT2 en la RM anual en comparación con la basal, y reducciones estadísticamente significativas en el número de CEL y en el volumen de LT2 y CEL en la RM anual en comparación con la basal. Al comparar los pacientes con brotes (n = 53) con los que no presentaron brotes (n = 50), no se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar entre las RM basales, pero sí entre las RM de seguimiento tras un año de terapia con IFN β , encontrando un mayor volumen de las LT2 y un mayor número y volumen de las CEL en el grupo de pacientes que presentaron nuevos brotes de EM a pesar del tratamiento. No obstante, no se alcanzó una significación estadística en los cambios entre la RM basal y de seguimiento en el conteo de LT2/CEL y el volumen de LT2/CEL (tabla 11).

Según la presencia de progresión de discapacidad confirmada. Los pacientes que no tuvieron un incremento confirmado de la EDSS (n = 87) presentaron reducciones estadísticamente significativas en el número de CEL y en el volumen de LT2 y CEL, así como una menor proporción de pacientes que presentaban CEL en la RM anual en comparación con la basal. Los pacientes con incremento confirmado de la EDSS (n = 16) presentaron un incremento estadísticamente significativo en el número de LT2 en la RM anual en

comparación con la basal, y reducciones estadísticamente significativas en el número de CEL y en el volumen de CEL en la RM anual en comparación con la basal. Al comparar ambos grupos, los pacientes que tuvieron un incremento confirmado de la EDSS tuvieron un mayor recuento y un mayor volumen de LT2 basal que aquellos que no. En la RM de seguimiento, todos los parámetros de lesiones (número y volumen de LT2 y CEL) fueron menores de forma estadísticamente significativa en los pacientes sin progresión continuada de la discapacidad frente a los que sí progresaron. Cuando se compararon los cambios en dichas variables, se detectó únicamente un mayor número de nuevas LT2 en los pacientes con progresión confirmada que en aquellos cuya EDSS permaneció estable (tabla 12).

Tabla 11. Comparativa de los parámetros obtenidos de las RM basal y anual entre los subgrupos de pacientes según la presencia de nuevos brotes de esclerosis múltiple durante los 4 años de seguimiento. Los valores de p estadísticamente significativos aparecen en negrita.

	Pacientes libres de brotes a 4 años (n=50)				Pacientes con nuevos brotes a 4 años (n=53)				Comp. RM anual		Comp. RM anual cambios		
	RM basal	RM anual	Δ	p	RM basal	RM anual	Δ	p	RM basal	p+	RM anual	p+	p+
Número de lesiones													
LT2	54.06 (38,21)	56.16 (38,86)	+2,10 (12,27)	0,264*	79.81 (70,62)	82.55 (70,77)	+2,74 (12,14)	0,027*	0,076	0,059	0,340		
CEL	2.02 (3,22)	0,16 (0,51)	-1,86 (3,25)	<0,001*	3,91 (10,51)	0,64 (1,18)	-3,26 (9,98)	<0,001*	0,665	0,010	0,291		
Vol. de lesiones (ml)													
LT2	6,41 (6,48)	5,22 (4,76)	-1,19 (3,17)	0,001*	9,29 (10,38)	8,39 (8,80)	-0,90 (3,14)	0,041*	0,215	0,043	0,409		
CEL	0,26 (0,52)	0,01 (0,03)	-0,25 (0,51)	<0,001*	0,65 (1,85)	0,10 (0,21)	-0,55 (1,76)	0,008*	0,364	0,005	0,103		
Pres. de CEL, n (%)	34 (68)	5 (10)	N/A	<0,001^	27 (50,94)	16 (30,19)	N/A	0,019^	0,170\$	0,145\$	N/A		
PCVC				<0,001‡				<0,001‡					0,488
Vol. cerebral (ml)				%cambio				%cambio					
VPC	1077,32 (118,99)	1071,85 (119,46)	-0,539 (1,432)	0,022*	1068,05 (109,44)	1063,99 (112,87)	-0,413 (1,302)	0,038*	0,904	0,963	0,590		
VSG	596,39 (73,03)	591,18 (73,41)	-0,874 (1,974)	0,019*	582,31 (68,11)	579,40 (67,36)	-0,475 (2,186)	0,105*	0,583	0,662	0,403		
VSB	476,89 (60,22)	479,38 (62,25)	-0,0091 (2,63)	0,482*	482,55 (65,85)	481,41 (68,17)	-0,281 (2,630)	0,793*	0,652	0,724	0,649		

Todos los valores se muestran como media (DE); *: prueba de los rangos con signo de Wilcoxon; ^: test de McNemar; +: test de U de Mann-Whitney; \$: test X²; ‡: prueba t para muestra única para $\mu_0 = 0$; Δ: diferencia entre los valores de la RM de seguimiento y basal; CEL: lesiones que presentan realce tras la administración de contraste; DE: desviación estándar; LT2: lesiones hiperintensas en secuencias potenciadas en T2; N/A: no aplica; PCVC: porcentaje de cambio del volumen cerebral; Pres: presencia; Vol: volumen; VPC: volumen cerebral total; VSB: volumen de sustancia blanca; VSG: volumen de sustancia gris.

Tabla 12. Comparativa de los parámetros obtenidos de las RM basal y anual entre los subgrupos de pacientes según la presencia de progresión de discapacidad debida a esclerosis múltiple durante los 4 años de seguimiento. Los valores de p estadísticamente significativos aparecen en negrita.

	Pacientes libres de progresión a 4 años (n=87)				Pacientes que presentan progresión a 4 años (n=16)				Comp. RM basal		Comp. RM anual		Comp. cambios	
	RM basal	RM anual	Δ	p	RM basal	RM anual	Δ	p	p+	p+	p+	p+	p+	p+
Número de lesiones														
LT2	59,45 (46,12)	60,59 (43,88)	1,14 (11,99)	0,183*	110,06 (93,23)	119,50 (96,56)	9,44 (10,80)	0,004*	0,020	0,007	0,007	0,018		
CEL	1,98 (3,63)	0,29 (0,76)	-1,69 (3,45)	<0,001*	8,50 (17,57)	1,06 (1,48)	-7,44 (16,89)	0,031*	0,243	0,007	0,007	0,466		
Vol. de lesiones (ml)														
LT2	6,57 (6,22)	5,64 (4,95)	-0,93 (2,62)	<0,001*	15,07 (15,43)	13,39 (12,84)	-1,68 (5,22)	0,469*	0,029	0,006	0,006	0,483		
CEL	0,31 (0,97)	0,05 (0,16)	-0,27 (0,92)	<0,001*	1,27 (2,59)	0,10 (0,17)	-1,17 (2,48)	0,028*	0,294	0,016	0,016	0,417		
Pres. de CEL, n (%)	52 (59,77)	14 (16,09)	N/A	<0,001[^]	9 (56,25)	7 (43,75)	N/A	0,727 [^]	0,564\$	0,042\$	0,042\$	N/A		
PCVC														
Vol. cerebral (ml)														
VPC	1076,06 (108,41)	1072,13 (111,86)	-0,396 (1,400)	0,018*	1050,64 (133,80)	1041,41 (136,21)	-0,915 (1,000)	0,023*	0,582	0,503	0,503	0,233		
VSG	591 (71,41)	587,07 (70,76)	-0,743 (2,074)	0,008*	572,80 (64,21)	571,98 (67,07)	-0,171 (2,192)	0,347*	0,471	0,471	0,471	0,512		
VSB	481,19 (58,13)	483,25 (60,38)	0,126 (2,505)	0,323	472,57 (89,14)	464,24 (89,46)	-1,791 (2,776)	0,099*	0,906	0,665	0,665	0,032		

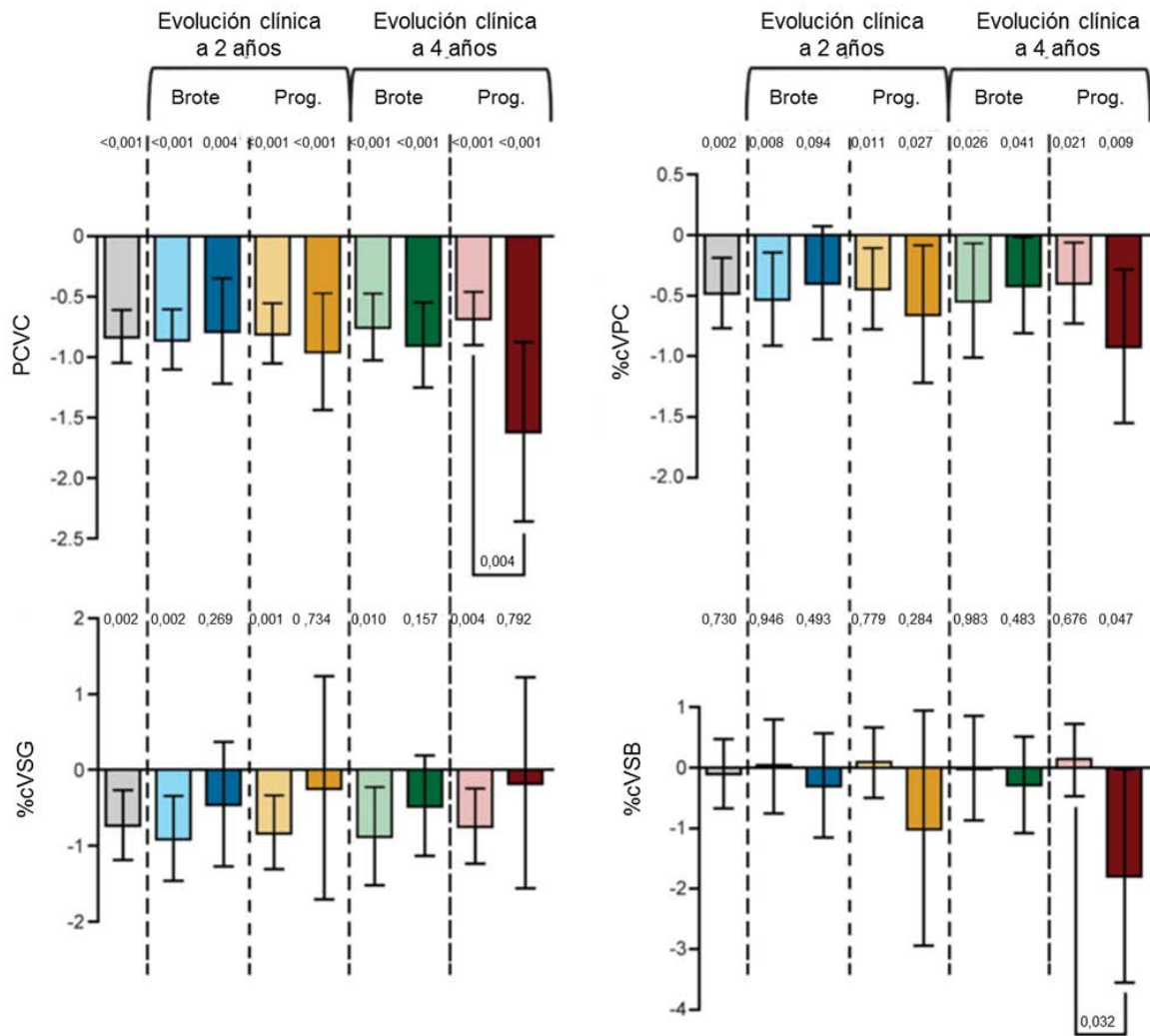
Todos los valores se muestran como media (DE); *: prueba de los rangos con signo de Wilcoxon; [^]: test de McNemar; +: test de U de Mann-Whitney; \$: test χ^2 ; †: prueba t para muestra única para $\mu_0 = 0$; Δ: diferencia entre los valores de la RM de seguimiento y basal; CEL: lesiones que presentan realce tras la administración de contraste; DE: desviación estándar; LT2: lesiones hiperintensas en secuencias potenciadas en T2; N/A: no aplica; PCVC: porcentaje de cambio del volumen cerebral; Pres: presencia; Vol: volumen; VPC: volumen cerebral total; VSB: volumen de sustancia blanca; VSG: volumen de sustancia gris.

5.2.4 Cambios sobre los volúmenes cerebrales en el primer año de tratamiento en toda la muestra y según la evolución clínica posterior

Toda la muestra (figura 14). Se observó un descenso del PCVC (n = 105; media – 0,829%, DE 1,128, p < 0,001). Los parámetros de volumen específico de tejido (n = 84) mostraron un decremento en el porcentaje de cambio del VPC (%cVPC; media – 0,476%, DE 1,340, p = 0,002) y en el porcentaje de cambio del VSG (%cVSG; media – 0,727%, DE 2,123, p = 0,002), pero no en el porcentaje de cambio del VSB (%cVSB; media – 0,099%, DE 2,623, p = 0,730).

Resumen de los cambios sobre los volúmenes cerebrales en el primer año de tratamiento según la evolución clínica posterior. No se observaron diferencias significativas en ningún parámetro de volumetría cerebral global (PCVC, %cVPC) o específica de tejido (%cVSG, %cVSB) entre los pacientes que presentaron nuevos brotes o los que no, a los 2 o 4 años de seguimiento (figura 14, tabla 11), ni tampoco entre los que presentaron incremento confirmado de la EDSS y los que permanecieron con EDSS estables a los 2 años de seguimiento. Sin embargo, se encontró un mayor descenso de PCVC y del %cVSB en los pacientes con progresión confirmada de discapacidad a los 4 años de seguimiento, no así con el %cVPC, %cVSG (figura 14, tabla 12).

Figura 14. Tasas de cambios en los volúmenes cerebrales globales y específicos de tejido (media con intervalo de confianza del 95%)



%c: porcentaje de cambio; PCVC: porcentaje de cambio del volumen cerebral; Prog: incremento confirmado de discapacidad; VPC: volumen cerebral total; VSB: volumen de sustancia blanca; VSG: volumen de sustancia gris. El valor p derivado de la prueba t para muestra única para una $\mu_0 = 0$ se muestra encima de cada barra. Las diferencias estadísticamente significativas en la comparativa entre grupos se muestran con líneas enlazadas, con el valor de p por encima. Las barras grises representan los resultados de toda la muestra. Las barras de color claro representan a aquellos pacientes sin la característica indicada encima (presencia de nuevos brotes o de incremento confirmado de la escala expandida de discapacidad [EDSS] durante el periodo citado sobre el corchete). Las barras de color oscuro representan a aquellos pacientes con las características anteriormente mencionadas. Los porcentajes de cambios se calcularon como sigue: $\%cambio = 100 \times \frac{(Volumen\ anual - Volumen\ basal)}{Volumen\ basal}$

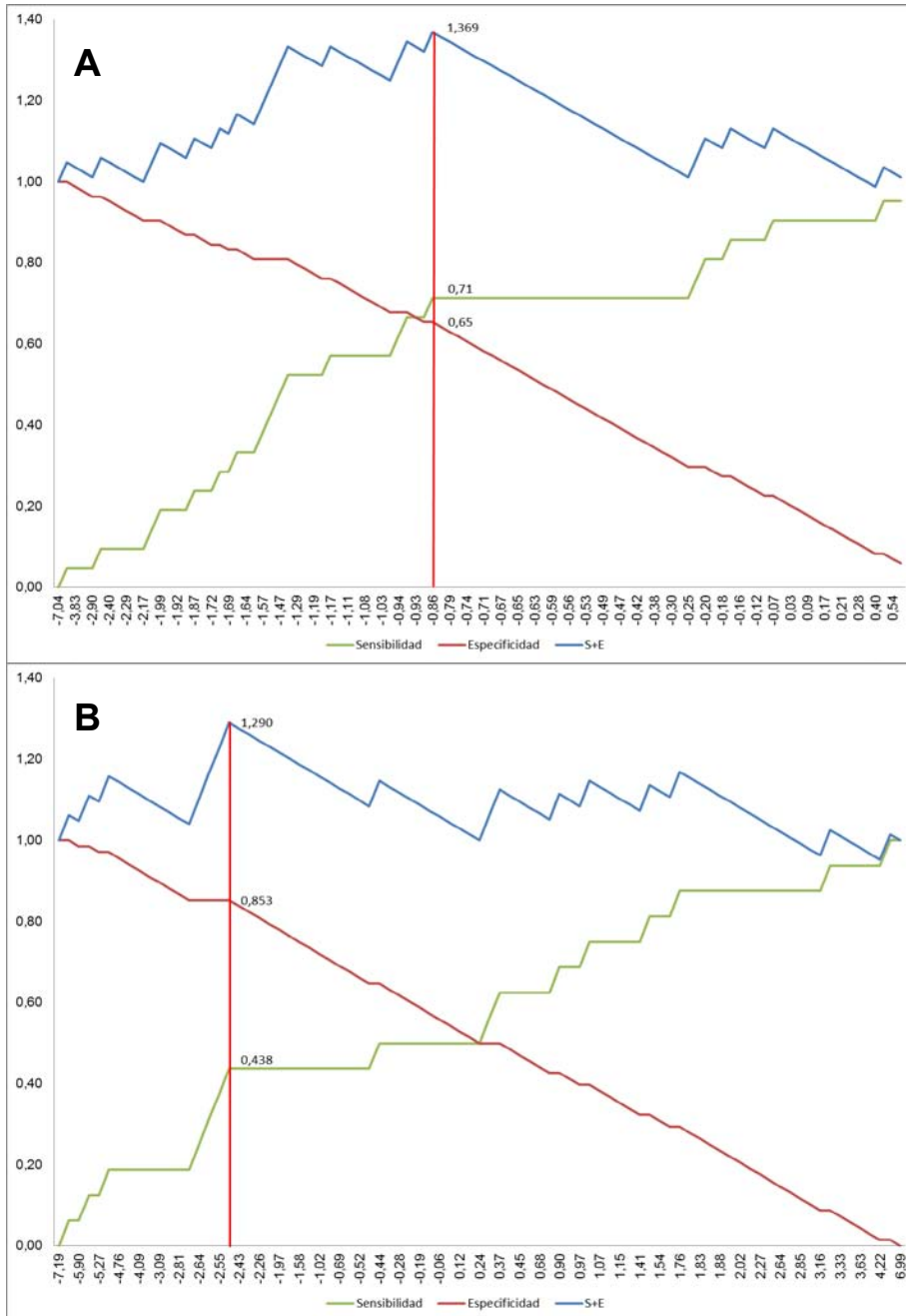
5.2.5 Modelos de predicción del desarrollo de progresión confirmada de discapacidad tras tratamiento con interferón β .

Selección de puntos de corte de los porcentajes de cambio de las medidas de volumen cerebral. Mediante el análisis de la curva COR se seleccionaron aquellos puntos de corte de las medidas de volumen cerebral global (PCVC, %cVPC) o específicas de tejido (%cVSG, %cVSB) que se asociaron en el análisis univariante con el desarrollo de progresión confirmada de discapacidad (PCVC y %cVSB), que fueron los siguientes (figuras 15 y 16): punto de corte para PCVC = $-0,86\%$ (área bajo la curva = 0,730, $p = 0,004$; sensibilidad 71,4%, intervalo de confianza del 95% [IC95%] 50% – 86,2%; especificidad 65,5%, IC95% 54,8% – 74,8%) y punto de corte para el %cVSB = $-2,49\%$ (área bajo la curva = 0,694, $p = 0,032$; sensibilidad 85,3%, IC95% 75% – 91,8%; especificidad 43,8%, IC95% 23,1% – 66,8%).

Análisis de supervivencia. Para el PCVC, las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier a 4 años (figura 17) mostraron una separación temprana de las líneas libres de eventos. Los pacientes cuyo PCVC descendió por debajo del umbral de $-0,86\%$ desarrollaron más frecuentemente progresión confirmada de discapacidad a los 4 años de seguimiento (HR sin ajustar de 3,875; IC95% 1,5 – 10,0; $p = 0,005$). Para el %cVSB, las curvas mostraron resultados similares, indicando que los pacientes cuyo %cVSB descendió por debajo del umbral de $-2,49\%$ durante el primer año de terapia con IFN β eran más propensos a

desarrollar progresión confirmada de la EDSS durante los 4 años de seguimiento (HR sin ajustar de 4,286; IC95% 1,27 – 9,20; $p = 0,015$).

Figura 15. Gráfico que representa el cálculo del punto de corte con mayor índice de Youden (punto de máxima sensibilidad y especificidad) de las medidas de volumetría cerebral para la predicción de progresión confirmada de discapacidad a 4 años.

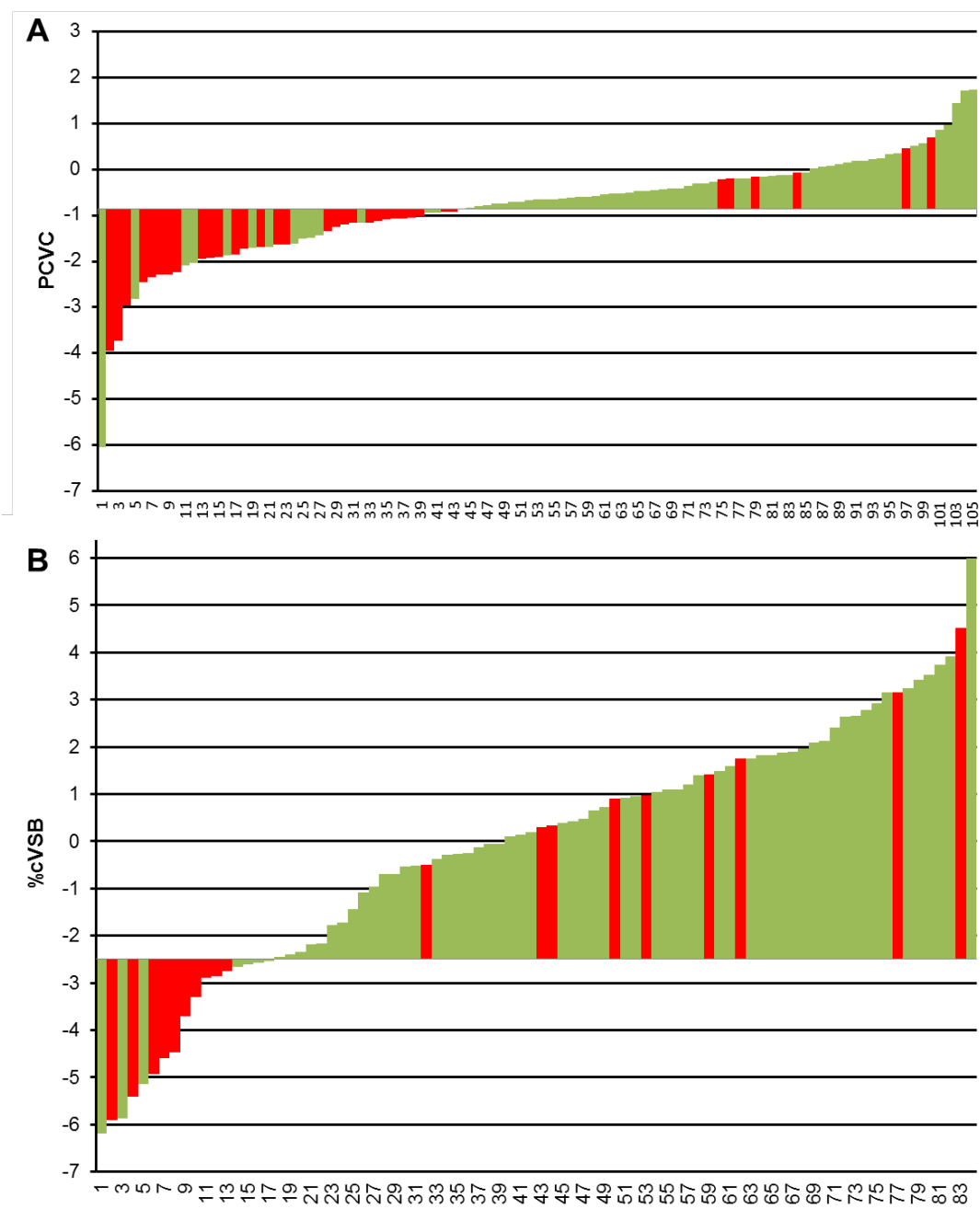


A. Cálculo del punto de corte para el porcentaje de cambio del volumen cerebral (PCVC), determinado en -0,86%.

B. Cálculo del punto de corte para el porcentaje de cambio del volumen de sustancia blanca, determinado en -2,49%.

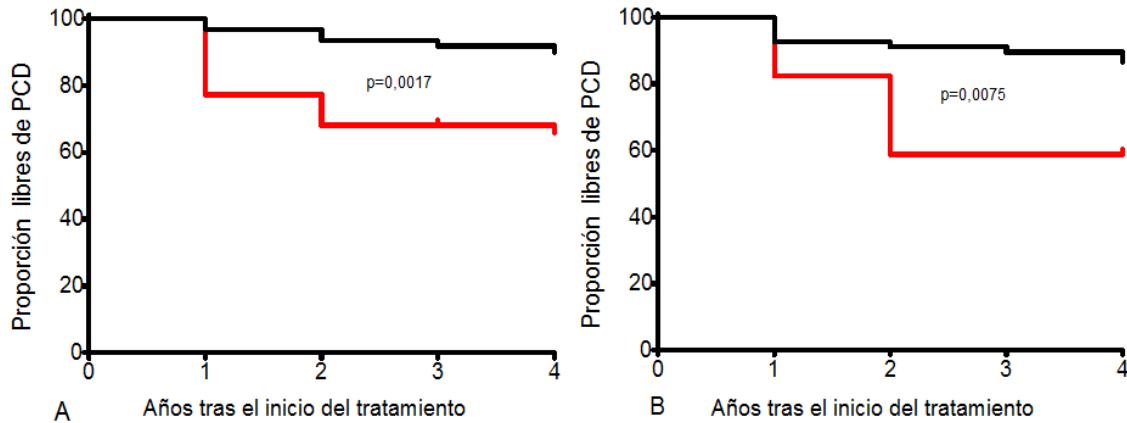
S+E: sumatorio de la sensibilidad y especificidad.

Figura 16. Gráfico en cascada que representa el cálculo de los puntos de corte de los cambios de volumen cerebral asociados significativamente en el análisis univariado a progresión confirmada del EDSS a los 4 años.



Cada barra representa un paciente individual. Las barras verdes representan a pacientes correctamente clasificados (hacia arriba, verdaderos negativos; hacia abajo, verdaderos positivos); las barras rojas representan sujetos erróneamente clasificados (hacia arriba, falsos negativos; hacia abajo, falsos positivos). A. Gráfico en cascada para el PCVC. B. Gráfico en cascada para el %cVSB. %cVSB: porcentaje de cambio del volumen de sustancia blanca; EDSS: escala expandida del estado de discapacidad (Expanded Disability Status Scale); PCVC: porcentaje de cambio del volumen cerebral.

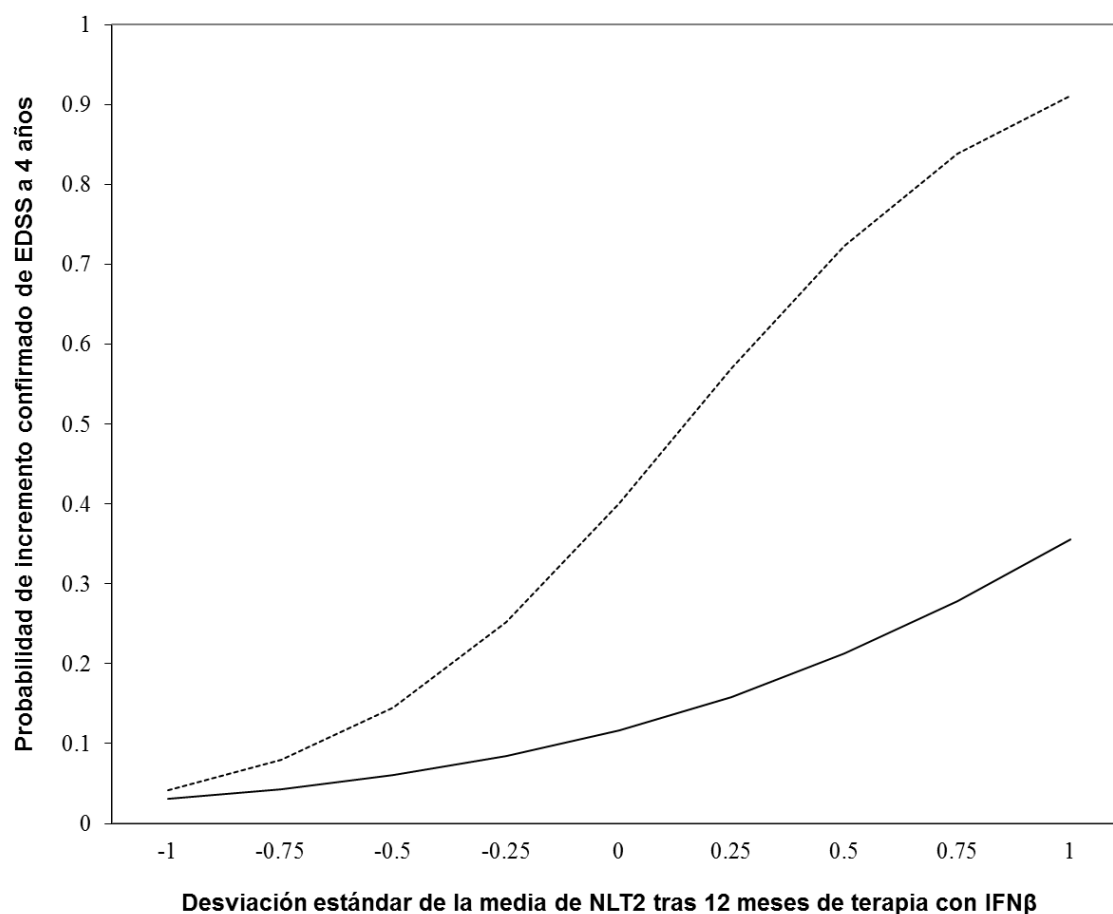
Figura 17. Comparación de las curvas de Kaplan-Meier de tiempo a incremento confirmado de discapacidad.



A. De acuerdo al porcentaje de cambio del volumen cerebral (PCVC) dividido en dos grupos: $\leq -0,86\%$ (línea roja) o superior (línea negra). B. De acuerdo al porcentaje de cambio del volumen de sustancia blanca (%cVSB) dividido en dos grupos: $\leq -2,49\%$ (línea roja) o superior (línea negra). El valor de p mostrado corresponde al valor del test *log-rank*.

Análisis multivariante. Se encontró que existe una interacción en grado moderado entre la presencia de NLT2 y tener o no un descenso del %cVSB respecto al umbral de $-2,49\%$, interacción no existente para el PCVC. Aunque la probabilidad de tener progresión confirmada de discapacidad tras 4 años de seguimiento se incrementa en ambos grupos de %cVSB al incrementarse las NLT2, el incremento es más rápido en el grupo con %cVSB $\leq -2,49\%$ (figura 18), por lo que estas variables se han expresado como interacción en el modelo de regresión.

Figura 18. Gráfico de la interacción de dos factores (regresión logística) entre el porcentaje de cambio del volumen de sustancia blanca y la presencia de lesiones nuevas o que han aumentado de tamaño en la RM de seguimiento.

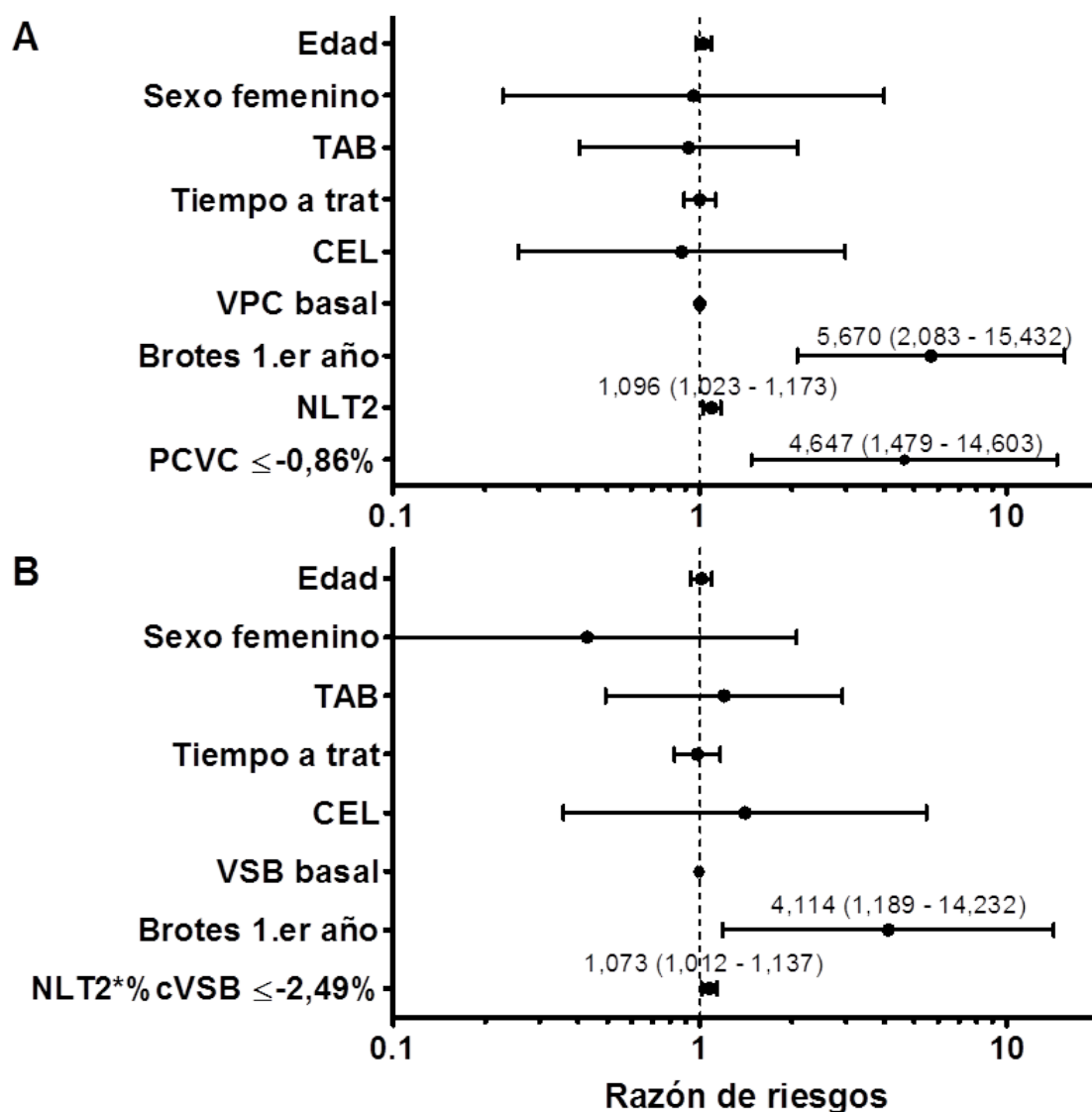


Las líneas representan la función $\ln\left(\frac{p}{1-p}\right) = a + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3(x_1x_2)$; $a = -2,797$; x_1 es el número de lesiones nuevas o que han aumentado de tamaño en secuencias T2 en la RM de seguimiento (NLT2), con un coeficiente de regresión (b_1) de 0,314; x_2 representa tener ($x_2 = 1$) o no ($x_2 = 0$) un porcentaje de cambio del volumen de sustancia blanca (%cVSB) inferior a $-2,49\%$, con un coeficiente de regresión (b_2) de 0,915; x_1x_2 representa el producto de ambas variables, con un coeficiente de regresión (b_3) de 0,287. La línea continua representa el valor de la función cuando $x_2 = 0$ (es decir, el %cVSB es mayor a $-2,49\%$), y la discontinua representa el valor de la función cuando $x_2 = 1$ (es decir, el %cVSB es inferior a $-2,49\%$).

Se usaron dos modelos para la regresión de riesgos proporcionales de Cox (figura 19). Las variables comunes a ambos modelos son las que se han descrito anteriormente en la sección de Pacientes y Métodos. El modelo 1

(n=105) muestra que un PCVC anual de $\leq -0,86\%$ tras el tratamiento con IFN β (HR ajustada de 4,647, IC95% 1,479 – 14,603, p = 0,009), el número de NLT2 y la presencia de nuevos brotes durante el primer año de tratamiento son factores predictores independientes para el desarrollo de un incremento confirmado de discapacidad tras el inicio de IFN β . El modelo 2 (n = 84) indica que la interacción entre el número de NLT2 y un %cVSB anual de $\leq -2,49\%$ tras el tratamiento con IFN β (HR ajustada de 1,073, IC95% 1,012 – 1,137, p = 0,018), junto con la presencia de nuevos brotes durante el primer año de tratamiento son factores predictores independientes para el desarrollo de un incremento confirmado de discapacidad tras el inicio de IFN β . El %cVPC y el %cVSG, tanto en el análisis univariante como en el multivariante según los modelos descritos, no fueron predictores de progresión confirmada de discapacidad.

Figura 19. Modelos de regresión de riesgos proporcionales de Cox para la predicción de desarrollo de progresión confirmada de discapacidad a 4 años tras el inicio de tratamiento con interferón β .



La razón de riesgos se representa en las gráficas con el intervalo de confianza del 95%. A. Modelo que incluye el porcentaje de cambio del volumen cerebral (PCVC), categorizado en $\leq -0,86\%$ o mayor. B. Modelo que incluye el porcentaje de cambio del volumen de sustancia blanca (%cVSB) categorizado en $\leq -2,49\%$ o mayor como interacción con el número de lesiones nuevas o que han aumentado de tamaño en secuencias T2 (NLT2) tras 12 meses de terapia con interferón β . CEL: lesiones que presentan realce tras la administración de contraste; TAB: tasa anualizada de brotes, calculada como la media de brotes en los 2 años previos al tratamiento con interferón β ; Tiempo a trat: tiempo en años desde el primer síntoma de esclerosis múltiple al inicio de tratamiento con interferón β ; VPC: volumen del parénquima cerebral; VSB: volumen de la sustancia blanca. El porcentaje de cambio se calculó como sigue: $\%cambio = 100 \times \frac{(Volumen\ anual - Volumen\ basal)}{Volumen\ basal}$

6 Discusión de los resultados

La presente tesis se basa en el estudio de la utilidad clínica de las medidas de atrofia cerebral en pacientes con EM. Con este objetivo, se han analizado las medidas de atrofia y su valor pronóstico en dos escenarios comunes en la práctica clínica habitual: el primer año tras un SCA con la incertidumbre sobre el pronóstico en términos de discapacidad y aparición de nuevos brotes, y el momento de inicio de un TME (en nuestro estudio con la terapia aún hoy en día más extendida, el IFN β) con la incertidumbre sobre la evolución a medio plazo bajo terapia, a partir de las estimaciones de los cambios del volumen cerebral precoz.

6.1 Importancia de los cambios del volumen cerebral en pacientes con síndromes clínicos aislados

Desarrollo precoz de atrofia de sustancia gris en pacientes con síndromes clínicos aislados y desarrollo posterior de esclerosis múltiple. La pérdida de volumen de sustancia gris puede hallarse ya en las etapas más precoces de EMRR y EMPP, en comparación con sujetos sanos [164, 165]. Su presencia en pacientes tras un SCA ya fue establecida en un estudio prospectivo de Dalton et al. [145], quienes encontraron una pérdida de sustancia gris, pero no de blanca, dentro de los tres primeros años tras un primer brote de EM. En dicho trabajo, los pacientes con SCA que desarrollaron EM presentaron un mayor descenso de la fracción de sustancia gris en comparación a aquellos que no tuvieron nuevos brotes hasta el final del estudio. La relevancia clínica de la pérdida de sustancia gris y su presencia en las fases más precoces de la enfermedad han sido confirmadas y expandidas en trabajos recientes, usando

métodos de volumetría global y específica de tejido [166–172]. En todos estos estudios se ha mostrado que la pérdida de volumen de sustancia gris, y no la blanca, es la que se asocia con la conversión clínica a EM. Nuestros resultados, tanto en atrofia global como específica de tejido, son consistentes con estas observaciones, y muestran, de forma prospectiva, que no solo la pérdida de volumen cerebral global, sino también la de sustancia gris ya son detectables el primer año después de un SCA, y que ésta se asocia con una conversión más precoz a EM, tanto en términos clínicos como de resonancia magnética. En este sentido, parece haber una relación dosis-efecto entre la actividad clínica de la enfermedad y la pérdida de volumen cerebral global y de sustancia gris, de forma que los pacientes que desarrollan un segundo brote parecen mostrar mayores pérdidas de volumen que los pacientes que cumplen solamente criterios radiológicos de EM. En comparación, los valores medianos de reducción del porcentaje de volumen cerebral en controles sanos se ha estimado en torno al 0,18% anual [148]. Aunque pueda parecer que existe una tendencia a un incremento del VSB en pacientes con *EM radiológica*, no hubo diferencias estadísticamente significativas con los pacientes que tuvieron un segundo brote o los pacientes *SCA no EM*. Dichos resultados están en consonancia con estudios anteriores [145], siendo una combinación de mecanismos inflamatorios y de neurodegeneración, junto con los cambios fisiológicos del volumen cerebral, los que probablemente entren en juego para producir tales resultados. En este sentido, los cambios en la fracción de sustancia blanca tanto en el grupo de pacientes con *EM radiológica* como en el grupo de *SCA no EM* (que muestran incrementos de la FSB, aunque de forma no significativa) concuerdan con los cambios fisiológicos que se producen en

sujetos sanos en el mismo grupo de edad [173, 174]. Los pacientes con un PCVC por debajo del primer quintil tuvieron de 2 a 3 veces más riesgo de un segundo brote durante el seguimiento, independientemente de la presencia de la actividad inflamatoria demostrada en la RM por nuevas lesiones con realce tras contraste con gadolinio o de la presencia de lesiones desmielinizantes que sugiriesen un diagnóstico de EM (3 – 4 criterios de Barkhof-Tintoré, o tener 10 o más lesiones en secuencias T2), y esta asociación de riesgo se mantuvo incluso al eliminar del análisis a los pacientes que fueron tratados antes de la RM de control, potencialmente más graves. En los modelos de regresión, no obstante, el hecho de cumplir 3 – 4 criterios de Barkhof-Tintoré en la RM basal es el mejor factor predictor para un segundo brote.

Desarrollo de atrofia y cambios de discapacidad en los pacientes con un síndrome clínico aislado. La atrofia cerebral global y de sustancia gris ha mostrado estar relacionada con los cambios de la EDSS, especialmente dentro de los primeros años de evolución de EM [165, 175]. En pacientes con un SCA, Fisniku et al. [171] mostró que la FSG medida después de 20 años de evolución tras el primer brote se correlacionaba de forma independiente con la EDSS y con la MSFC. La atrofia de sustancia gris ha mostrado ser un mejor marcador de imagen para predecir progresión de discapacidad que la sustancia blanca [170, 171, 176]. Otro estudio ha sugerido que la pérdida de volumen de sustancia gris predice mejor la progresión en la MSFC, que es una escala cuantitativa lineal, que la progresión en base a la EDSS, que es una escala no lineal [166]. Nuestros resultados son coherentes con las descripciones previas y apoyan la asociación clínica entre el desarrollo de atrofia (especialmente la

de sustancia gris) y el desarrollo de discapacidad, indicando que esta asociación puede ser ya detectable tan pronto como 1 año tras el SCA.

Limitaciones y problemas metodológicos específicos del estudio de pacientes con SCA. Un hecho importante, aunque no una limitación, es la definición de SCA, no basada en los hallazgos de imagen, lo que puede dificultar la comparabilidad con los resultados de otros estudios que incluyen solamente a pacientes con SCA que presentan alteraciones constatables en las imágenes de RM, pero que acerca nuestros resultados a la práctica clínica habitual. Es importante recalcar que un estudio de RM cerebral normal no excluye la posibilidad de desarrollar EM, especialmente en pacientes que presentan BOC en el LCR [177].

Hemos usado los criterios de McDonald de 2005 [59] para el diagnóstico de EM en vez de los actuales criterios de 2010 [68], puesto que el análisis de las imágenes de RM se inició en 2008, previo a la publicación de los criterios actuales. Aunque pueda ser una limitación del presente estudio, creemos que es improbable que haya influido significativamente en los resultados, puesto que el objetivo principal del estudio ha sido la predicción de la aparición de un segundo brote. La elección de este objetivo y no el de conversión a EM según criterios de McDonald obedece a varias razones. Primero, porque al ser un estudio longitudinal, el análisis de supervivencia es más preciso usando un suceso claro y bien definido como es la aparición de un segundo brote clínico, que depende en exclusiva de la evolución de la enfermedad; el diagnóstico de EM, por otro lado, es un suceso temporalmente menos definido, puesto que depende también del número de observaciones de RM.

Aunque el tratamiento con TME se asoció con un mayor porcentaje de cambio del volumen cerebral global en toda la muestra, este efecto parece estar, al menos en esta cohorte, mayormente relacionado al hecho de que solo aquellos pacientes “más graves” tuvieron una indicación de tratamiento con TME. En el grupo de pacientes que desarrollaron EM por criterios de McDonald 2005, no observamos diferencias estadísticas entre los pacientes tratados y no tratados. Por tanto, al diseñar los modelos de predicción, aunque se prefirió no incluir el uso de TME como factor debido a la alta colinealidad con los criterios de McDonald, se creó un modelo alternativo excluyendo a aquellos pacientes que iniciaron terapia previamente a la RM de control anual, observando que el valor predictor del desarrollo de atrofia cerebral global medida con el PCVC se mantiene, lo que añade robustez y consistencia a los resultados, y señala a la atrofia como un fenómeno específico que distingue a los pacientes con EM de los que no.

En el estudio, menos del 50% de los pacientes recibieron tratamiento con corticoesteroides durante el primer brote. El uso de las imágenes de RM del 3.^{er} mes tras el SCA como las basales, en vez de las realizadas en el momento del primer brote ha evitado o minimizado potencialmente el efecto sobre el volumen cerebral de tanto el fenómeno inflamatorio relacionado con el brote, como del efecto de pseudoatrofia posterior debido a la terapia con corticoesteroides [178]. Con todo, se consideró en el análisis estadístico el uso de corticoesteroides durante el primer brote, no observando ninguna influencia sobre los resultados volumétricos ni en los modelos predictivos.

Como observación, encontramos una tendencia a una mayor proporción de presencia de BOC en el LCR en los pacientes que se excluyeron del análisis en relación a los que se analizaron. Esto es muy probablemente una observación aleatoria y, en cualquier caso, no observamos ninguna influencia en la tasa de conversión a EM, como se muestra en la tabla 3.

6.2 Importancia de los cambios del volumen cerebral en pacientes con esclerosis múltiple que inician terapia con interferón β

La importancia de la detección de fallo terapéutico y valor de las medidas de atrofia cerebral. En la actualidad, la detección de fallo terapéutico se basa en una combinación de marcadores clínicos (presencia de nuevos brotes, empeoramiento confirmado de la discapacidad) y de neuroimagen por RM (presencia de NLT2 o CEL) [179]. En este sentido, la actividad inflamatoria detectada en RM ha ganado terreno como marcador subrogado en la monitorización de la actividad de la enfermedad y para la detección de pacientes con una respuesta subóptima a la terapia, estando integrada en prácticamente todas las definiciones propuestas de fracaso terapéutico [126, 127]. Sin embargo, ya de forma muy precoz en el curso de la enfermedad existe un proceso de neurodegeneración debido a daño neuroaxonal, presente no solo en las lesiones visibles en RM, sino también en el tejido cerebral aparentemente normal, y que se piensa es el responsable del desarrollo de la

discapacidad irreversible en el curso de la EM [147]. Por consiguiente, se ha propuesto a la pérdida de volumen cerebral (atrofia), una medida de la integridad del tejido cerebral y un indicador de neurodegeneración, como una potencial herramienta pronóstica en EM, en base a que la cuantificación de las lesiones de EM por sí sola no refleja por completo los procesos patogénicos clínicamente relevantes. El volumen cerebral es relativamente fácil de medir a partir de secuencias convencionales de RM, para las que se han desarrollado métodos reproducibles y suficientemente sensibles, y que parecen correlacionar mejor con la discapacidad neurológica que el mero recuento de las placas de desmielinización de la EM [146, 152]. La atrofia cerebral global es un marcador fiable para predecir el desarrollo de discapacidad al nivel de los ensayos clínicos. Un reciente metaanálisis que evaluó un gran número de ensayos clínicos ha mostrado que el efecto de los tratamientos sobre la atrofia cerebral global explicaba más del 60% de la varianza del efecto de los tratamientos sobre la discapacidad a 2 años [180]. Por otro lado, se ha relacionado también el desarrollo de atrofia cerebral global con el fracaso terapéutico [181].

Establecimiento de puntos de corte de los cambios de volumen cerebral y detección de fracaso a terapia. Hasta el momento, no se ha establecido ningún umbral de pérdida de volumen cerebral que se considere significativo en práctica clínica tras el inicio de TME, y su impacto clínico específico sobre el pronóstico no ha sido descrito. Las tasas de atrofia cerebral global varían desde $-0,7\%$ a $-1,2\%$ anual en pacientes con EMRR tratados con placebo [182], en comparación con el $-0,18\%$ anual en sujetos sanos [148]. Un estudio

reciente con una metodología de proceso de imagen similar a la nuestra, ha mostrado de forma longitudinal que una tasa de atrofia anualizada superior a 0,37% anual presenta una sensibilidad del 67% y una especificidad del 80% para detectar pacientes con EM (sin distinguir entre formas remitente-recurrente, secundaria progresiva o primaria progresiva) frente a controles sanos [183]. Nuestro estudio propone unos puntos de corte para los porcentajes de cambio del volumen cerebral global y de sustancia blanca para la predicción individual del desarrollo de progresión confirmada de discapacidad durante los primeros 4 años de seguimiento tras iniciar terapia con IFN β .

Es importante destacar que los valores predictivos positivos (VPP) de los umbrales descritos para predecir progresión de discapacidad son bajos (para el PCVC de 34%, para el %cVSB de 41,2%), lo que significa que un valor aislado en uno de estos parámetros de volumetría por debajo del punto de corte es un pobre marcador de progresión de discapacidad, y que el resto de variables clínicas (presencia de nuevos brotes durante el primer año) y de resonancia magnética (presencia de NLT2) también contribuyen de forma significativa a los modelos de predicción de progresión. Esta falta de VPP puede deberse a la pseudoatrofia que ocurre durante el primer año de tratamiento [184]. La pseudoatrofia, como se ha visto, es la reducción del volumen cerebral debido a la pérdida de contenido de agua tisular y a la resolución del fenómeno inflamatorio, y no como consecuencia de una lesión tisular irreversible [185]. Este efecto podría mitigarse empleando como basales las imágenes de RM realizadas al menos 3 meses después de iniciar la terapia [186]. Por el

contrario, los valores predictivos negativos de los puntos de corte propuestos son altos (para el PCVC de 90%, para el %cVSB de 87%), indicando que estas medidas podrían ser una importante herramienta pronóstica precoz en la práctica clínica, puesto que los pacientes que desarrollan cambios de volumen cerebral por encima de los puntos de corte (es decir, menores tasas de atrofia), tienen muy pocas probabilidades de presentar posteriormente progresión de discapacidad durante el seguimiento. Debido a que su cálculo es más simple, menos dado a error y menos influido por la actividad inflamatoria (presencia de NLT2) que el %cVSB, el PCVC podría ser la medida de elección para su uso en práctica clínica habitual.

Finalmente, la adquisición de un nuevo control de imagen por RM al segundo año del tratamiento podría añadir información muy útil para distinguir a aquellos pacientes en los que solo la pseudoatrofia es la que está condicionando los cambios de volumen sobre aquellos en los que predomina el fenómeno neurodegenerativo; sin embargo, la identificación precoz de los pacientes que no responden a las terapias es clave, por lo que preferimos usar la evolución durante el primer año.

Falta de correlato clínico entre la evolución de la discapacidad y los cambios de volumen en sustancia gris en el primer año tras tratamiento con interferón β en pacientes con esclerosis múltiple remitente-recurrente. No hemos encontrado ninguna asociación entre el %cVSG y la evolución clínica, lo que puede ser incongruente con lo descrito en gran parte de la literatura científica (incluyendo nuestro análisis previo en pacientes con SCA), que describe una estrecha correlación entre el desarrollo de atrofia de sustancia gris y discapacidad [187].

En un estudio previo se ha descrito que la terapia con IFN β podría enlentecer la progresión de la atrofia cerebral global y de sustancia gris [188]. No obstante, los ensayos clínicos más recientes de teriflunomida y laquinimod (ensayos de gran tamaño, aleatorizados y controlados con placebo) parecen indicar que el efecto antiinflamatorio de los TME puede reflejarse mejor en los cambios de volumen de la sustancia blanca [189, 190]. En este sentido, diferentes estudios han indicado que los marcadores subrogados válidos para predecir la respuesta a terapia podrían no ser tan útiles para predecir la evolución de los grupos placebo (o de historia natural) y viceversa [119, 191]. Dicho de otra forma, los cambios precoces en el volumen de sustancia gris pueden ayudar a diferenciar los pacientes con EM de los grupos control, pero, al menos con las terapias actuales y al corto plazo, no parece ayudar a discernir el pronóstico a medio plazo (4 años), siendo la sustancia blanca la que mejor recoge el efecto antiinflamatorio de las TME.

Efecto de los cambios del volumen cerebral junto con el resto de variables clínicas y de imagen sobre la predicción de incremento confirmado de discapacidad. Es un hecho establecido que el desarrollo de nuevas lesiones desmielinizantes durante el primer año tras el inicio de IFN β conlleva información pronóstica [117, 126, 127, 191]. Nuestro estudio es coherente con este hallazgo y añade nuevas evidencias: el efecto de la aparición de nuevas lesiones en el riesgo de desarrollar progresión de discapacidad se modifica de acuerdo a la presencia o ausencia de pérdida de VSB, de forma que cada nueva lesión incrementa el riesgo de progresión, pero especialmente cuando esto ocurre conjuntamente con un %cVSB de $-2,49\%$ o menos.

En el modelo que emplea los cambios de volumen cerebral global mediante SIENA (PCVC), la aparición de NLT2 y de brotes durante el primer año de terapia fueron también predictores independientes del pronóstico; esto concuerda con hallazgos previos en esta área [181, 192, 193], e incorpora la pérdida de volumen cerebral como un marcador de respuesta susceptible de usarse como variable dicotómica en la práctica clínica. Se necesitan nuevos estudios para confirmar estos hallazgos de forma prospectiva, especialmente cuando deba evaluarse el fracaso terapéutico de otros fármacos que no sean IFN β , puesto que el efecto sobre la atrofia puede variar en cada fármaco [185]. Finalmente, al igual que en la mayoría de estudios previos, el impacto de las características basales no fue significativo en nuestro estudio [126], aunque es aconsejable seguir investigando su posible rol a la hora de determinar la respuesta al tratamiento.

6.3 Limitaciones y problemas metodológicos

Ausencia de grupo control. La ausencia de un grupo control es la principal limitación de este estudio, dada su naturaleza observacional. Por tanto, los cambios en los volúmenes cerebrales globales y específicos de tejido podrían atribuirse al envejecimiento fisiológico y no al proceso de enfermedad en sí en el caso del estudio de la cohorte de pacientes con SCA, o debidos a la historia natural y no a la respuesta real del tratamiento en el caso de los pacientes con EM que inician terapia con IFN β .

Sin embargo, éste no parece ser el caso en los pacientes con SCA, puesto que la intensidad de los cambios de volumen cerebral global y

específico de tejido fue mayor en los pacientes con formas “más graves”, mostrando una plausible curva dosis-efecto (figura 11). También, aquellos pacientes que desarrollaron una pérdida de volumen cerebral significativa durante el primer año (pacientes por debajo del primer quintil de PCVC) desarrollaron hasta 2 veces más rápido que el resto de pacientes un segundo brote, independientemente de la edad, sexo y volumen de lesiones en RM. La falta de un grupo control también ha imposibilitado detectar atrofia significativa de sustancia gris ya presente, ya que el inicio clínico de la enfermedad (SCA) puede no coincidir con el inicio del proceso neurodegenerativo, que puede preceder varios años (el llamado síndrome radiológico aislado) a la primera manifestación clínica [194]; en esta última entidad, existen trabajos recientes que han mostrado que los pacientes con un síndrome radiológico aislado presentan, de forma transversal, un menor volumen talámico [195], o menor volumen cerebral total y de sustancia gris cortical [196] que en sujetos sanos, aunque no existen en la actualidad estudios prospectivos longitudinales que analicen en qué grado se desarrolla la atrofia y qué valor clínico predictivo tiene ésta en el síndrome radiológico aislado.

Limitaciones técnicas. Las imágenes de RM se obtuvieron de un protocolo clínico aplicado desde 2001, con un grosor de corte de 3 mm y sin separación entre cortes, por lo que la resolución espacial de los estudios de RM cerebral no fue isotrópica. Las secuencias tridimensionales con una resolución espacial casi isotrópica, aunque producen, entre otros beneficios, un proceso de segmentación más preciso al reducir los errores de volumen parcial [152], no suelen usarse todavía en práctica clínica de manera rutinaria para el

diagnóstico o seguimiento de los pacientes con SCA o EM. Sin embargo, esto no quiere decir que estas últimas no sean válidas para extraer las medidas de volumen cerebral, habiendo sido aplicadas en numerosos estudios y por nuestro propio grupo [147, 197–199].

Las técnicas de postproceso de imagen basadas en la segmentación tienen una peor precisión de test/re-test en estudios longitudinales en comparación con las técnicas basadas en el registro de imágenes, como lo es SIENA [200]. Este hecho puede explicar la robustez del PCVC en comparación con las medidas específicas de tejido en nuestras series.

Es conocido que la presencia de hipointensidades en la sustancia blanca en las secuencias potenciadas en T1 (los llamados “agujeros negros”) afectan a las técnicas de postproceso de imagen médica basada en la segmentación, de forma que se produce una clasificación errónea de vóxeles de sustancia blanca en sustancia gris, y afectando por tanto a la precisión de los resultados. El efecto de este sesgo metodológico (solo significativo en aquellos pacientes con una alta carga de lesiones) es el de un incremento espurio de los volúmenes de sustancia gris, que puede producirse incluso tras la corrección por la máscara de lesiones [201].

En consecuencia, en el estudio de pacientes con SCA, el hallazgo de un descenso en la FSG en los pacientes con EM (tanto en pacientes que presentan un segundo brote, como en los que convierten radiológicamente) y no en los pacientes *SCA no EM* es probablemente verídico, y no producido por un sesgo técnico que, en todo caso, actuaría en el sentido contrario, es decir, aumentando falsamente el volumen de sustancia gris en los pacientes con EM.

En el estudio de pacientes con EM que inician IFN β , los pacientes con nuevos brotes o con progresión confirmada de la discapacidad tienden a tener un mayor recuento y volumen de lesiones (y esto es especialmente relevante en los pacientes que desarrollan progresión confirmada a los 4 años); por tanto, una explicación a la alta variabilidad del %cVSG en este grupo de pacientes es la aparición de errores aleatorios de medida. Aparte, la proporción relativamente baja de pacientes que desarrollan un incremento confirmado de discapacidad, junto con este sesgo técnico, pueden haber aumentado la dispersión de la muestra y, por tanto, haber afectado a la precisión de las medidas específicas de tejido.

Los *software* de postproceso de imagen han experimentado actualizaciones: en concreto, desde que se inició el estudio ha habido dos nuevas versiones del software de segmentación *Statistical Parametrical Mapping* (SPM8 y SPM12); sin embargo, el análisis de estudio de los pacientes con SCA se inició en 2009, cuando SPM5 era la versión más extendida y, aparte, la herramienta *spm_segment* utilizada para la segmentación no es compatible con las nuevas versiones. El análisis de estudio de los pacientes con EM que iniciaron IFN β se inició en 2010, siendo SPM8 la versión más extendida.

Limitaciones de tipo estadístico. El número de comparaciones y correlaciones realizadas puede incrementar la posibilidad de un error de tipo I. La plausibilidad de todos los hallazgos, así como el ajuste por el análisis multivariado van en contra de que éstos no sean reales. No obstante, la

probabilidad de haber cometido un error de tipo I no puede descartarse, con lo que es recomendable confirmar estos resultados en futuros estudios.

7 Conclusiones

Respecto al valor pronóstico de las medidas de volumen cerebral en pacientes que desarrollan un primer síndrome neurológico desmielinizante o SCA, las conclusiones que se derivan de esta tesis son:

1. La pérdida de volumen cerebral ya es detectable durante el primer año tras un primer brote desmielinizante, y se debe probablemente a una pérdida de volumen mayoritariamente de la sustancia gris y no de la blanca.
2. Se ha detectado una asociación entre el desarrollo de atrofia precoz y los cambios de discapacidad entre el primer y segundo año tras un SCA, en aquellos pacientes con SCA que desarrollarán EM.
3. En el primer año tras un SCA, los pacientes que desarrollan un segundo brote durante el seguimiento tienen mayores pérdidas de volumen cerebral global que aquellos que no, y esta pérdida se asocia de forma independiente con el desarrollo más precoz de EM clínicamente definida.

En resumen, estos resultados no solo confirman, sino que expanden los conceptos de estudios previos, mostrando que existe un proceso neurodegenerativo muy precoz y clínicamente significativo en EM, y que se centra en la sustancia gris y no en la blanca.

Respecto al valor pronóstico de las medidas de volumen cerebral en pacientes con EMRR que inician tratamiento con IFN β , las conclusiones que se derivan de esta tesis son:

1. La pérdida de volumen cerebral global y de sustancia gris en los pacientes que inician terapia con IFN β ya es detectable en el primer año de tratamiento.
2. El grado de pérdida de volumen cerebral global o específica de tejido entre los pacientes que presentaron o no nuevos brotes a 2 o 4 años de seguimiento no fue diferente. Sin embargo, sí se encontró un mayor descenso de volumen cerebral global, medido con PCVC, y del volumen de sustancia blanca en los pacientes que presentaron un incremento confirmado de discapacidad a los 4 años de seguimiento.
3. La pérdida de volumen cerebral global mayor a $-0,86\%$ y la pérdida de volumen de sustancia blanca por encima de $-2,49\%$ en interacción con el efecto de las lesiones nuevas o que han aumentado de tamaño en las secuencias potenciadas en T2, exponen de forma independiente a un mayor riesgo de desarrollar un incremento confirmado de la discapacidad a 4 años tras un año de terapia con IFN β .

En resumen, los resultados indican que los cambios del volumen cerebral durante el primer año de tratamiento con IFN β son predictores de la evolución clínica posterior, junto con otras medidas clínicas y radiológicas, y proponen valores de punto de corte como referencia para estudios confirmatorios.

8 Bibliografía

1. Pugliatti M, Sotgiu S, Rosati G (2002) The worldwide prevalence of multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 104:182–191. doi: 10.1016/S0303-8467(02)00036-7.
2. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG (2000) Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343:938–952. doi: 10.1056/NEJM200009283431307.
3. Pugliatti M, Rosati G, Carton H, et al. (2006) The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *Eur J Neurol* 13:700–722. doi: 10.1111/j.1468-1331.2006.01342.x.
4. Hirtz D, Thurman DJ, Gwinn-Hardy K, et al. (2007) How common are the “common” neurologic disorders? *Neurology* 68:326–337. doi: 10.1212/01.wnl.0000252807.38124.a3.
5. Modrego PJ, Pina MA (2003) Trends in prevalence and incidence of multiple sclerosis in Bajo Aragón, Spain. *J Neurol Sci* 216:89–93. doi: 10.1016/j.jns.2003.07.007.
6. Aladro Y, Alemany MJ, Pérez-Vieitez MC, et al. (2005) Prevalence and incidence of multiple sclerosis in Las Palmas, Canary Islands, Spain. *Neuroepidemiology* 24:70–75. doi: 10.1159/000081052.
7. Ares B, Prieto JM, Lema M, et al. (2007) Prevalence of multiple sclerosis in Santiago de Compostela (Galicia, Spain). *Mult Scler* 13:262–264. doi: 10.1177/1352458506069540.
8. Otero-Romero S, Roura P, Sola J, et al. (2013) Increase in the prevalence of multiple sclerosis over a 17-year period in Osona, Catalonia, Spain. *Mult Scler* 19:245–248. doi: 10.1177/1352458512444751.
9. Alonso A, Hernán MA (2008) Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. *Neurology* 71:129–135.

10. Confavreux C, Vukusic S, Adeleine P (2003) Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. *Brain* 126:770–782.
11. Leray E, Yaouanq J, Le Page E, et al. (2010) Evidence for a two-stage disability progression in multiple sclerosis. *Brain* 133:1900–1913. doi: 10.1093/brain/awq076.
12. Lublin FD, Reingold SC (1996) Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 46:907–911.
13. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, et al. (2014) Defining the clinical course of multiple sclerosis : The 2013 revisions Defining the clinical course of multiple sclerosis The 2013 revisions. *Neurology* 83:278–286. doi: 10.1212/WNL.0000000000000560.
14. Olerup O, Hillert J (1991) HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens* 38:1–15.
15. Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD (2004) Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 3:104–110.
16. Oksenberg JR, Hauser SL (2005) Genetics of multiple sclerosis. *Neurol Clin* 23:61–75. doi: 10.1016/j.ncl.2004.09.006.
17. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, et al. (2012) Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 476:214–219. doi: 10.1038/nature10251.Genetic.
18. Lill CM, Schjeide B-MM, Graetz C, et al. (2013) MANBA, CXCR5, SOX8, RPS6KB1 and ZBTB46 are genetic risk loci for multiple sclerosis. *Brain* 136:1778–1782. doi: 10.1093/brain/awt101.

-
19. Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, et al. (2013) Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet* 45:1353–1360. doi: 10.1038/ng.2770.
 20. Lill CM, Luessi F, Alcina A, et al. (2015) Genome-wide significant association with seven novel multiple sclerosis risk loci. *J Med Genet*: jmedgenet–2015–103442. doi: 10.1136/jmedgenet-2015-103442.
 21. Dyment DA, Yee IML, Ebers GC, Sadovnick AD (2006) Multiple sclerosis in stepsiblings: recurrence risk and ascertainment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77:258–259. doi: 10.1136/jnnp.2005.063008.
 22. Sospedra M, Martin R (2005) Immunology of Multiple Sclerosis. *Annu Rev Immunol* 23:683–747. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115707.
 23. Kurtzke JF, Hyllested K (1979) Multiple sclerosis in the Faroe Islands: I. Clinical and epidemiological features. *Ann Neurol* 5:6–21. doi: 10.1002/ana.410050104.
 24. Ascherio A, Munger KL (2010) Epstein-barr virus infection and multiple sclerosis: A review. *J Neuroimmune Pharmacol* 5:271–277. doi: 10.1007/s11481-010-9201-3.
 25. Nissen KK, Laska MJ, Hansen B, et al. (2013) Endogenous retroviruses and multiple sclerosis-new pieces to the puzzle. *BMC Neurol* 13:111. doi: 10.1186/1471-2377-13-111.
 26. Kurtzke JF (1975) A reassessment of the distribution of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 51:110–136.
 27. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, et al. (2006) Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA* 296:2832–2838. doi: 10.1001/jama.296.23.2832.

28. Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, et al. (2011) Smoking and multiple sclerosis: An updated meta-analysis. *PLoS One* 6:e16149. doi: 10.1371/journal.pone.0016149
29. Ramanujam R, Hedström A-K, Manouchehrinia A, et al. (2015) Effect of Smoking Cessation on Multiple Sclerosis Prognosis. *JAMA Neurol.* 72:1117-1123. doi: 10.1001/jamaneurol.2015.1788.
30. Farez MF, Fiol MP, Gaitán MI, et al. (2015) Sodium intake is associated with increased disease activity in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 86:26–31. doi: 10.1136/jnnp-2014-307928.
31. Gianfrancesco MA, Acuna B, Shen L, et al. (2014) Obesity during childhood and adolescence increases susceptibility to multiple sclerosis after accounting for established genetic and environmental risk factors. *Obes Res Clin Pract* 8:e435–e447. doi: 10.1016/j.orcp.2014.01.002.
32. Hemmer B, Nessler S, Zhou D, et al. (2006) Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol* 2:201–211. doi: 10.1038/ncpneuro0154.
33. Beltrán E, Hernández A, Lafuente EM, et al. (2012) Neuronal antigens recognized by cerebrospinal fluid IgM in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 247:63–69. doi: 10.1016/j.jneuroim.2012.03.013.
34. Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, et al. (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: Implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47:707–717.
35. Metz I, Weigand SD, Popescu BFG, et al. (2014) Pathologic heterogeneity persists in early active multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 75:728–738. doi: 10.1002/ana.24163.

-
36. Barnett MH, Prineas JW (2004) Relapsing and remitting multiple sclerosis: Pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol* 55:458–468. doi: 10.1002/ana.20016.
37. Breij ECW, Brink BP, Veerhuis R, et al. (2008) Homogeneity of active demyelinating lesions in established multiple sclerosis. *Ann Neurol* 63:16–25. doi: 10.1002/ana.21311.
38. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, et al. (1983) New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 13:227–231. doi: 10.1002/ana.410130302.
39. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, et al. (1998) Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 338:278–285. doi: 10.1056/NEJM199801293380502.
40. Evangelou N, Esiri MM, Smith S, et al. (2000) Quantitative pathological evidence for axonal loss in normal appearing white matter in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 47:391–395.
41. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, et al. (2005) Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain* 128:2705–2712. doi: 10.1093/brain/awh641.
42. Peterson JW, Bö L, Mörk S, et al. (2001) Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 50:389–400. doi: 10.1002/ana.1123.
43. Bø L, Vedeler CA, Nyland HI, et al. (2003) Subpial demyelination in the cerebral cortex of multiple sclerosis patients. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:723–732.
44. Wegner C, Esiri MM, Chance SA, et al. (2006) Neocortical neuronal, synaptic, and glial loss in multiple sclerosis. *Neurology* 67:960–967. doi: 10.1212/01.wnl.0000237551.26858.39.

45. Murray PD, McGavern DB, Sathornsumetee S, Rodriguez M (2001) Spontaneous remyelination following extensive demyelination is associated with improved neurological function in a viral model of multiple sclerosis. *Brain* 124:1403–1416.
46. Miller DH, Weinshenker BG, Filippi M, et al. (2008) Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach. *Mult Scler* 14:1157–1174. doi: 10.1177/1352458508096878.
47. Wingerchuk DM, Lucchinetti CF (2007) Comparative immunopathogenesis of acute disseminated encephalomyelitis, neuromyelitis optica, and multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 20:343–350. doi: 10.1097/WCO.0b013e3280be58d8.
48. Schumacker GA, Beebe G, Kibler RF, et al. (1965) Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: Report by the panel on the evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 122:552–568.
49. Pérez-Miralles FC, Palavra F, Montalban X (2010) Early Identification of Clinically Isolated Syndrome – How this is Best Achieved and the Implications for Patient Outcomes. *Eur Neurol Rev* 5:90–94.
50. Uhlenbrock D, Seidel D, Gehlen W, et al. (1988) MR imaging in multiple sclerosis: comparison with clinical, CSF, and visual evoked potential findings. *AJNR Am J Neuroradiol* 9:59–67.
51. Poser CM, Brinar V V (2001) Diagnostic criteria for multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 103:1–11.
52. Paty DW, Oger JJ, Kastrukoff LF, et al. (1988) MRI in the diagnosis of MS: a prospective study with comparison of clinical evaluation, evoked potentials, oligoclonal banding, and CT. *Neurology* 38:180–185.

-
53. Fazekas F, Offenbacher H, Fuchs S, et al. (1988) Criteria for an increased specificity of MRI interpretation in elderly subjects with suspected multiple sclerosis. *Neurology* 38:1822–1825.
54. Offenbacher H, Fazekas F, Schmidt R, et al. (1993) Assessment of MRI criteria for a diagnosis of MS. *Neurology* 43:905–909.
55. Tas MW, Barkhof F, van Walderveen MAA, et al. (1995) The effect of gadolinium on the sensitivity and specificity of MR in the initial diagnosis of multiple sclerosis. *Am J Neuroradiol* 16:259–264.
56. Tintoré M, Rovira A, Martínez MJ, et al. (2000) Isolated demyelinating syndromes: comparison of different MR imaging criteria to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol* 21:702–706.
57. Barkhof F, Filippi M, Miller DH, et al. (1997) Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain* 120:2059–2069.
58. McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. (2001) Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50:121–127.
59. Polman CH, Reingold SC, Edan G, et al. (2005) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald Criteria”. *Ann Neurol* 58:840–846. doi: 10.1002/ana.20703.
60. Swanton JK, Rovira A, Tintore M, et al. (2007) MRI criteria for multiple sclerosis in patients presenting with clinically isolated syndromes: a multicentre retrospective study. *Lancet Neurol* 6:677–686. doi: 10.1016/S1474-4422(07)70176-X.
61. Korteweg T, Uitdehaag BMJ, Knol DL, et al. (2007) Interobserver agreement on the radiological criteria of the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Eur Radiol* 17:67–71. doi: 10.1007/s00330-006-0303-5.

62. Frohman EM, Goodin DS, Calabresi P a, et al. (2003) The utility of MRI in suspected MS: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 61:602–611. doi: 10.1212/WNL.63.6.1140.
63. Swanton JK, Fernando K, Dalton CM, et al. (2006) Modification of MRI criteria for multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77:830–833. doi: 10.1136/jnnp.2005.073247.
64. Dalton CM, Brex PA, Miszkief KA, et al. (2003) New T2 lesions enable an earlier diagnosis of multiple sclerosis in clinically isolated syndromes. *Ann Neurol* 53:673–676. doi: 10.1002/ana.10580.
65. Tur C, Tintoré M, Rovira A, et al. (2008) Very early scans for demonstrating dissemination in time in multiple sclerosis. *Mult Scler* 14:631–635. doi: 10.1177/1352458507087327.
66. Rovira A, Swanton J, Tintoré M, et al. (2009) A single, early magnetic resonance imaging study in the diagnosis of multiple sclerosis. *Arch Neurol* 66:587–592. doi: 10.1001/archneurol.2009.49.
67. Montalban X, Tintoré M, Swanton J, et al. (2010) MRI criteria for MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology* 74:427–434. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181cec45c.
68. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. (2011) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 69:292–302. doi: 10.1002/ana.22366.
69. Weinshenker BG, Bass B, Rice GP, et al. (1989) The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. *Brain* 112:133–146.

70. Arrambide G, Sastre-Garriga J (2014) Predictive markers of disease evolution after a CIS in everyday practice. *J Neurol Sci* 343:8–14. doi: 10.1016/j.jns.2014.05.023.
71. Fox RJ, Ransohoff RM (2004) New directions in MS therapeutics: Vehicles of hope. *Trends Immunol* 25:632–636. doi: 10.1016/j.it.2004.09.012.
72. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group (1993) Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* 43:655–661.
73. PRISMS Study Group (1998) Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon -1a in relapsing / remitting multiple sclerosis. *Lancet* 352:1498–1504.
74. Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, et al. (1996) Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Ann Neurol* 39:285–294. doi: 10.1002/ana.410390304.
75. Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, et al. (1995) Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 45:1268–1276.
76. O'Connor P, Wolinsky JS, Confavreux C, et al. (2011) Randomized Trial of Oral Teriflunomide for Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 365:1293–1303. doi: 10.1016/j.yneu.2012.04.031.
77. Confavreux C, O'Connor P, Comi G, et al. (2014) Oral teriflunomide for patients with relapsing multiple sclerosis (TOWER): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Neurol* 13:247–256. doi: 10.1016/S1474-4422(13)70308-9.

78. Gold R, Kappos L, Arnold DL, et al. (2012) Placebo-Controlled Phase 3 Study of Oral BG-12 for Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 367:1098–1107. doi: 10.1056/NEJMoa1114287.
79. Kappos L, Radue E-W, O'Connor P, et al. (2010) A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 362:387–401. doi: 10.1056/NEJMoa0909494.
80. Calabresi PA, Radue E-W, Goodin D, et al. (2014) Safety and efficacy of fingolimod in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (FREEDOMS II): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Neurol* 13:545–556. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70049-3.
81. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, et al. (2006) A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 354:899–910. doi: 10.1056/NEJMoa044397.
82. Schwartzman RJ, Simpkins N, Alexander GM, et al. (2009) High-dose cyclophosphamide in the treatment of multiple sclerosis. *CNS Neurosci Ther* 15:118–127. doi: 10.1111/j.1755-5949.2008.00072.x.
83. La Mantia L, Milanese C, Mascoli N, et al. (2007) Cyclophosphamide for multiple sclerosis. *Cochrane database Syst Rev* 1:CD002819. doi: 10.1002/14651858.CD002819.pub2.
84. Saccardi R, Freedman M, Sormani M, et al. (2012) A prospective, randomized, controlled trial of autologous haematopoietic stem cell transplantation for aggressive multiple sclerosis: a position paper. *Mult Scler J* 18:825–834. doi: 10.1177/1352458512438454.
85. García Merino A, Fernández O, Montalbán X, et al. (2010) Documento de consenso de la Sociedad Española de Neurología sobre el uso de medicamentos en esclerosis múltiple: Escalado terapéutico. *Neurologia* 25:378–390. doi: 10.1016/j.nrl.2010.03.006.

-
86. Baron S, Tyring SK, Fleischmann WR, et al. (1991) The interferons. Mechanisms of action and clinical applications. *JAMA* 266:1375–1383.
87. Lublin F (2005) History of modern multiple sclerosis therapy. *J Neurol* 252:3–9. doi: 10.1007/s00415-005-2010-6.
88. Panitch HS, Hirsch RL, Haley AS, Johnson KP (1987) Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet* (London, England) 1:893–895.
89. Panitch HS, Hirsch RL, Schindler J, Johnson KP (1987) Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: Exacerbations associated with activation of the immune system. *Neurology* 37:1097–1097. doi: 10.1212/WNL.37.7.1097.
90. Knobler RL (1988) Systemic interferon therapy of multiple sclerosis: the pros. *Neurology* 38:58–61.
91. Kasper LH, Reder AT (2014) Immunomodulatory activity of interferon-beta. *Ann Clin Transl Neurol* 1:622–631. doi: 10.1002/acn3.84.
92. Agencia Europea de Medicamentos. Ficha técnica o resumen de las características del producto interferón beta-1a 22/44 microgramos. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000136/WC500048681.pdf.
93. Agencia Europea de Medicamentos. Ficha técnica o resumen de las características del producto interferón beta-1a 30 microgramos. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000102/WC500029425.pdf.
94. Agencia Europea de Medicamentos. Ficha técnica o resumen de las características del producto interferón beta-1b 250 mg (Betaferon). Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000081/WC500053225.pdf.

95. Agencia Europea de Medicamentos. Ficha técnica o resumen de las características del producto interferón beta-1b 250 mg (Extavia). Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000933/WC500034701.pdf.
96. Filippini G, Munari L, Incorvaia B, et al. (2003) Interferons in relapsing remitting multiple sclerosis: a systematic review. *Lancet* (London, England) 361:545–552. doi: 10.1016/S0140-6736(03)12512-3.
97. Filippini G, Del Giovane C, Vacchi L, et al. (2013) Immunomodulators and immunosuppressants for multiple sclerosis: a network meta-analysis. *Cochrane database Syst Rev* 6:CD008933. doi: 10.1002/14651858.CD008933.pub2.
98. Shirani A, Zhao Y, Karim ME, et al. (2012) Association between use of interferon beta and progression of disability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *JAMA* 308:247–256. doi: 10.1001/jama.2012.7625.
99. Kappos L, Freedman MS, Polman CH, et al. (2007) Effect of early versus delayed interferon beta-1b treatment on disability after a first clinical event suggestive of multiple sclerosis: a 3-year follow-up analysis of the BENEFIT study. *Lancet* 370:389–397. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61194-5.
100. Kappos L, Freedman MS, Polman CH, et al. (2009) Long-term effect of early treatment with interferon beta-1b after a first clinical event suggestive of multiple sclerosis: 5-year active treatment extension of the phase 3 BENEFIT trial. *Lancet Neurol* 8:987–997. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70237-6.
101. Goodin DS, Reder AT, Ebers GC, et al. (2012) Survival in MS: a randomized cohort study 21 years after the start of the pivotal IFN β -1b trial. *Neurology* 78:1315–1322. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182535cf6.
102. Trojano M, Pellegrini F, Paolicelli D, et al. (2009) Real-life impact of early interferon beta therapy in relapsing multiple sclerosis. *Ann Neurol* 66:513–520. doi: 10.1002/ana.21757.

-
103. Tintore M, Rovira a., Rio J, et al. (2015) Defining high, medium and low impact prognostic factors for developing multiple sclerosis. *Brain* 1863–1874. doi: 10.1093/brain/awv105.
104. Iannucci G, Tortorella C, Rovaris M, et al. (2000) Prognostic value of MR and magnetization transfer imaging findings in patients with clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis at presentation. *Am J Neuroradiol* 21:1034–1038.
105. Comi G (2000) Why treat early multiple sclerosis patients? *Curr Opin Neurol* 13:235–240.
106. Comi G, Filippi M, Barkhof F, et al. (2001) Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: a randomised study. *Lancet* 357:1576–1582.
107. Jacobs L, Beck R, Simon JH, et al. (2000) Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343:898–904.
108. Kappos L, Polman CH, Freedman MS, et al. (2006) Treatment with interferon beta-1b delays conversion to clinically definite and McDonald MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology* 67:1242–1249. doi: 10.1212/01.wnl.0000237641.33768.8d.
109. Comi G, De Stefano N, Freedman MS, et al. (2012) Comparison of two dosing frequencies of subcutaneous interferon beta-1a in patients with a first clinical demyelinating event suggestive of multiple sclerosis (REFLEX): a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Neurol* 11:33–41. doi: 10.1016/S1474-4422(11)70262-9.
110. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Ficha técnica de Copaxone 20 mg/ml solución inyectable en jeringa precargada. Disponible en: http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/65983/FT_65983.pdf.

111. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Ficha técnica de Copaxone 40 mg/ml solución inyectable en jeringa precargada. Disponible en: http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/79515/FT_79515.pdf.
112. Agencia Europea de Medicamentos. Ficha técnica o resumen de las características del producto teriflunomida. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002514/WC500148682.pdf.
113. Agencia Europea de Medicamentos. Ficha técnica o resumen de las características del producto dimetilfumarato. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002601/WC500162069.pdf.
114. Agencia Europea de Medicamentos. Ficha técnica o resumen de las características del producto natalizumab. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000603/WC500044686.pdf.
115. Agencia Europea de Medicamentos. Ficha técnica o resumen de las características del producto fingolimod. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002202/WC500104528.pdf.
116. Agencia Europea de Medicamentos. Ficha técnica o resumen de las características del producto alemtuzumab. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/003718/WC500150521.pdf. 1–42.
117. Río J, Castelló J, Rovira A, et al. (2009) Measures in the first year of therapy predict the response to interferon beta in MS. *Mult Scler* 15:848–853. doi: 10.1177/1352458509104591.

-
118. Kobelt G, Berg J, Lindgren P, et al. (2006) Costs and quality of life of patients with multiple sclerosis in Europe. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77:918–926. doi: 10.1136/jnnp.2006.090365.
119. Bermel RA, You X, Foulds P, et al. (2013) Predictors of long-term outcome in multiple sclerosis patients treated with interferon β . *Ann Neurol* 73:95–103. doi: 10.1002/ana.23758.
120. Río J, Comabella M, Montalban X (2009) Predicting responders to therapies for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 5:553–560. doi: 10.1038/nrneurol.2009.139.
121. Freedman MS, Patry DG, Grand'Maison F, et al. (2004) Treatment optimization in multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci* 31:157–168.
122. Freedman MS, Forrestal FG (2008) Canadian treatment optimization recommendations (TOR) as a predictor of disease breakthrough in patients with multiple sclerosis treated with interferon beta-1a: analysis of the PRISMS study. *Mult Scler* 14:1234–1241. doi: 10.1177/1352458508093892.
123. Freedman MS, Selchen D, Arnold DL, et al. (2013) Treatment optimization in MS: Canadian MS Working Group updated recommendations. *Can J Neurol Sci* 40:307–323.
124. Río J, Nos C, Tintoré M, et al. (2006) Defining the response to interferon-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 59:344–352. doi: 10.1002/ana.20740.
125. Río J, Nos C, Tintoré M, et al. (2002) Assessment of different treatment failure criteria in a cohort of relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with interferon beta: implications for clinical trials. *Ann Neurol* 52:400–406. doi: 10.1002/ana.10290.
126. Río J, Rovira A, Tintoré M, et al. (2008) Relationship between MRI lesion activity and response to IFN-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 14:479–484. doi: 10.1177/1352458507085555.

127. Sormani MP, Rio J, Tintorè M, et al. (2013) Scoring treatment response in patients with relapsing multiple sclerosis. *Mult Scler* 19:605–612. doi: 10.1177/1352458512460605.
128. Rudick RA, Lee J-C, Simon J, et al. (2004) Defining interferon beta response status in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 56:548–555. doi: 10.1002/ana.20224.
129. Hutchinson M, Kappos L, Calabresi P A., et al. (2009) The efficacy of natalizumab in patients with relapsing multiple sclerosis: Subgroup analyses of AFFIRM and SENTINEL. *J Neurol* 256:405–415. doi: 10.1007/s00415-009-0093-1.
130. Havrdova E, Galetta S, Hutchinson M, et al. (2009) Effect of natalizumab on clinical and radiological disease activity in multiple sclerosis: a retrospective analysis of the Natalizumab Safety and Efficacy in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis (AFFIRM) study. *Lancet Neurol* 8:254–260. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70021-3.
131. Stangel M, Penner IK, Kallmann BA, et al. (2014) Towards the implementation of “no evidence of disease activity” in multiple sclerosis treatment: the multiple sclerosis decision model. *Ther Adv Neurol Disord* 8:3–13. doi: 10.1177/1756285614560733.
132. Miller DH, Grossman RI, Reingold SC, Mcfarland HF (1998) The role of magnetic resonance techniques in understanding and managing multiple sclerosis. *Brain* 121:3–24.
133. Rovira A (2001) Resonancia magnética en el diagnóstico de la esclerosis múltiple. *Radiologia* 43:465–476.
134. Runge VM, Price AC, Kirshner HS, et al. (1986) Evaluation of Multiple Sclerosis By Magnetic Resonance Imaging. *RadioGraphics* 6:203–212.

-
135. Fog T. (1965) The topography of plaques in multiple sclerosis: with special reference to cerebral plaques. *Acta Neurol Scand* 14:7–161.
136. Grossman RI, Gonzalez-Scarano F, Atlas SW, et al. (1986) Multiple sclerosis: gadolinium enhancement in MR imaging. *Radiology* 161:721–725. doi: 10.1148/radiology.161.3.3786722.
137. Van Walderveen MA, Barkhof F, Hommes OR, et al. (1995) Correlating MRI and clinical disease activity in multiple sclerosis: relevance of hypointense lesions on short-TR/short-TE (T1-weighted) spin-echo images. *Neurology* 45:1684–1690.
138. Kappos L, Städt D, Keil W, et al. (1987) An attempt to quantify magnetic resonance imaging in multiple sclerosis--correlation with clinical parameters. *Neurosurg Rev* 10:133–135.
139. Filippi M, Paty DW, Kappos L, et al. (1995) Correlations between changes in disability and T2-weighted brain MRI activity in multiple sclerosis: a follow-up study. *Neurology* 45:255–260.
140. Barkhof F (2002) The clinico-radiological paradox in multiple sclerosis revisited. *Curr Opin Neurol* 15:239–245. doi: 10.1097/00019052-200206000-00003.
141. Kurtzke JF (1983) Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33:1444–1452.
142. Cutter GR, Baier ML, Rudick RA, et al. (1999) Development of a multiple sclerosis functional composite as a clinical trial outcome measure. *Brain* 122:871–882.
143. Roosendaal SD, Schoonheim MM, Hulst HE, et al. (2010) Resting state networks change in clinically isolated syndrome. *Brain* 133:1612–1621. doi: 10.1093/brain/awq058.

144. Filippi M, Tortorella C, Rovaris M, et al. (2000) Changes in the normal appearing brain tissue and cognitive impairment in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 68:157–161. doi: 10.1136/jnnp.68.2.157.
145. Dalton CM, Chard DT, Davies GR, et al. (2004) Early development of multiple sclerosis is associated with progressive grey matter atrophy in patients presenting with clinically isolated syndromes. *Brain* 127:1101–1107. doi: 10.1093/brain/awh126.
146. Bermel RA, Bakshi R (2006) The measurement and clinical relevance of brain atrophy in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 5:158–170. doi: 10.1016/S1474-4422(06)70349-0.
147. Miller DH, Barkhof F, Frank JA, et al. (2002) Measurement of atrophy in multiple sclerosis: pathological basis, methodological aspects and clinical relevance. *Brain* 125:1676–1695.
148. Raz N, Rodrigue KM (2006) Differential aging of the brain: patterns, cognitive correlates and modifiers. *Neurosci Biobehav Rev* 30:730–748. doi: 10.1016/j.neubiorev.2006.07.001.
149. Pfefferbaum A, Mathalon DH, Sullivan EV, et al. (1994) A quantitative magnetic resonance imaging study of changes in brain morphology from infancy to late adulthood. *Arch Neurol* 51:874–887.
150. Sastre-Garriga J, Ingle GT, Chard DT, et al. (2005) Metabolite changes in normal-appearing gray and white matter are linked with disability in early primary progressive multiple sclerosis. *Arch Neurol* 62:569–573. doi: 10.1001/archneur.62.4.569.
151. Rovaris M, Gambini A, Gallo A, et al. (2005) Axonal injury in early multiple sclerosis is irreversible and independent of the short-term disease evolution. *Neurology* 65:1626–1630. doi: 10.1212/01.wnl.0000184493.06254.a6.

152. Vrenken H, Jenkinson M, Horsfield MA, et al. (2013) Recommendations to improve imaging and analysis of brain lesion load and atrophy in longitudinal studies of multiple sclerosis. *J Neurol* 260:2458–2471. doi: 10.1007/s00415-012-6762-5.
153. Bakshi R, Benedict RH, Bermel RA, Jacobs L (2001) Regional brain atrophy is associated with physical disability in multiple sclerosis: semiquantitative magnetic resonance imaging and relationship to clinical findings. *J Neuroimaging* 11:129–136.
154. Simon JH, Jacobs LD, Campion MK, et al. (1999) A longitudinal study of brain atrophy in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Neurology* 53:139–148.
155. Anderson VM, Fox NC, Miller DH (2006) Magnetic resonance imaging measures of brain atrophy in multiple sclerosis. *J Magn Reson Imaging* 23:605–618. doi: 10.1002/jmri.20550.
156. Rudick RA, Fisher E, Lee JC, et al. (1999) Use of the brain parenchymal fraction to measure whole brain atrophy in relapsing-remitting MS. Multiple Sclerosis Collaborative Research Group. *Neurology* 53:1698–1704.
157. Ashburner J, Friston K (1997) Multimodal image coregistration and partitioning--a unified framework. *Neuroimage* 6:209–217. doi: 10.1006/nimg.1997.0290.
158. Smith SM, Zhang Y, Jenkinson M, et al. (2002) Accurate, robust, and automated longitudinal and cross-sectional brain change analysis. *Neuroimage* 17:479–489.
159. Smith SM, De Stefano N, Jenkinson M, Matthews PM (2001) Normalized accurate measurement of longitudinal brain change. *J Comput Assist Tomogr* 25:466–475.

160. Rovira A, Tintoré M, Álvarez-Cermeño JC, et al. (2010) Recomendaciones para la utilización e interpretación de los estudios de resonancia magnética en la esclerosis múltiple. *Neurología* 25:248–265. doi: 10.1016/j.nrl.2010.03.001.
161. Smith SM, Jenkinson M, Woolrich MW, et al. (2004) Advances in functional and structural MR image analysis and implementation as FSL. *Neuroimage* 23 Suppl 1:S208–S219. doi: 10.1016/j.neuroimage.2004.07.051.
162. Budczies J, Klauschen F, Sinn B V, et al. (2012) Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS One* 7:e51862. doi: 10.1371/journal.pone.0051862.
163. Perneger TV (1998) What's wrong with Bonferroni adjustments. *BMJ* 316:1236–1238.
164. Chard DT, Griffin CM, Parker GJM, et al. (2002) Brain atrophy in clinically early relapsing-remitting multiple sclerosis. *Brain* 125:327–337. doi: 10.1093/brain/awf025.
165. Sastre-Garriga J, Ingle GT, Chard DT, et al. (2004) Grey and white matter atrophy in early clinical stages of primary progressive multiple sclerosis. *Neuroimage* 22:353–359. doi: 10.1016/j.neuroimage.2004.02.008.
166. Rudick RA, Lee J-C, Nakamura K, Fisher E (2009) Gray matter atrophy correlates with MS disability progression measured with MSFC but not EDSS. *J Neurol Sci* 282:106–111. doi: 10.1016/j.jns.2008.11.018.
167. Calabrese M, Rinaldi F, Mattisi I, et al. (2011) The predictive value of gray matter atrophy in clinically isolated syndromes. *Neurology* 77:257–263. doi: 10.1212/WNL.0b013e318220abd4.
168. Raz E, Cercignani M, Sbardella E, et al. (2010) Gray- and white-matter changes 1 year after first clinical episode of multiple sclerosis: MR imaging. *Radiology* 257:448–454. doi: 10.1148/radiol.10100626.

169. Kalincik T, Vaneckova M, Tyblova M, et al. (2012) Volumetric MRI markers and predictors of disease activity in early multiple sclerosis: a longitudinal cohort study. *PLoS One* 7:e50101. doi: 10.1371/journal.pone.0050101.
170. Fisher E, Lee J-C, Nakamura K, Rudick RA (2008) Gray matter atrophy in multiple sclerosis: A longitudinal study. *Ann Neurol* 64:255–265. doi: 10.1002/ana.21436.
171. Fisniku LK, Chard DT, Jackson JS, et al. (2008) Gray matter atrophy is related to long-term disability in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 64:247–254. doi: 10.1002/ana.21423.
172. Raz E, Cercignani M, Sbardella E, et al. (2010) Clinically isolated syndrome suggestive of multiple sclerosis: voxelwise regional investigation of white and gray matter. *Radiology* 254:227–234. doi: 10.1148/radiol.2541090817.
173. Courchesne E, Chisum HJ, Townsend J, et al. (2000) Normal brain development and aging: quantitative analysis at in vivo MR imaging in healthy volunteers. *Radiology* 216:672–682. doi: <http://dx.doi.org/10.1148/radiology.216.3.r00au37672>.
174. Ge Y, Grossman RI, Babb JS, et al. (2002) Age-related total gray matter and white matter changes in normal adult brain. Part I: volumetric MR imaging analysis. *AJNR Am J Neuroradiol* 23:1327–1333.
175. Horakova D, Dwyer MG, Havrdova E, et al. (2009) Gray matter atrophy and disability progression in patients with early relapsing-remitting multiple sclerosis: a 5-year longitudinal study. *J Neurol Sci* 282:112–119. doi: 10.1016/j.jns.2008.12.005.
176. Roosendaal SD, Bendfeldt K, Vrenken H, et al. (2011) Grey matter volume in a large cohort of MS patients: relation to MRI parameters and disability. *Mult Scler J* 17:1098–1106. doi: 10.1177/1352458511404916.

177. Tintoré M, Rovira A, Río J, et al. (2008) Do oligoclonal bands add information to MRI in first attacks of multiple sclerosis? *Neurology* 70:1079–1083. doi: 10.1212/01.wnl.0000280576.73609.c6.
178. Zivadinov R (2005) Steroids and brain atrophy in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 233:73–81. doi: 10.1016/j.jns.2005.03.006.
179. Sormani MP, De Stefano N (2013) Defining and scoring response to IFN- β in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 9:504–512. doi: 10.1038/nrneurol.2013.146.
180. Sormani MP, Arnold DL, De Stefano N (2014) Treatment effect on brain atrophy correlates with treatment effect on disability in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 75:43–49. doi: 10.1002/ana.24018.
181. Rojas JI, Patrucco L, Miguez J, et al. (2014) Brain atrophy as a non-response predictor to interferon-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurol Res* 36:615-618. doi: 10.1179/1743132813Y.0000000304.
182. Zivadinov R, Bakshi R (2004) Central nervous system atrophy and clinical status in multiple sclerosis. *J Neuroimaging* 14:27S–35S. doi: 10.1177/1051228404266266.
183. De Stefano N, Stromillo ML, Giorgio A, et al. (2015) Establishing pathological cut-offs of brain atrophy rates in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. doi: 10.1136/jnnp-2014-309903.
184. Rudick RA, Fisher E, Lee JC, et al. (2000) Brain atrophy in relapsing multiple sclerosis: relationship to relapses, EDSS, and treatment with interferon beta-1a. *Mult Scler* 6:365–372.
185. Zivadinov R, Reder AT, Filippi M, et al. (2008) Mechanisms of action of disease-modifying agents and brain volume changes in multiple sclerosis. *Neurology* 71:136–144. doi: 10.1212/01.wnl.0000316810.01120.05.

186. Hardmeier M, Wagenpfeil S, Freitag P, et al. (2005) Rate of brain atrophy in relapsing MS decreases during treatment with IFNbeta-1a. *Neurology* 64:236–240. doi: 10.1212/01.WNL.0000149516.30155.B8.
187. Geurts JGG, Calabrese M, Fisher E, Rudick RA (2012) Measurement and clinical effect of grey matter pathology in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 11:1082–1092. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70230-2.
188. Zivadinov R, Locatelli L, Cookfair D, et al. (2007) Interferon beta-1a slows progression of brain atrophy in relapsing-remitting multiple sclerosis predominantly by reducing gray matter atrophy. *Mult Scler* 13:490–501. doi: 10.1177/1352458506070446.
189. Wolinsky JS, Narayana P a, Nelson F, et al. (2013) Magnetic resonance imaging outcomes from a phase III trial of teriflunomide. *Mult Scler* 19:1310–1319. doi: 10.1177/1352458513475723.
190. Filippi M, Rocca MA, Pagani E, et al. (2014) Placebo-controlled trial of oral laquinimod in multiple sclerosis: MRI evidence of an effect on brain tissue damage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 85:851–858. doi: 10.1136/jnnp-2013-306132.
191. Dobson R, Rudick RA, Turner B, et al. (2014) Assessing treatment response to interferon- β : is there a role for MRI? *Neurology* 82:248–254. doi: 10.1212/WNL.0000000000000036.
192. Sormani M, De Stefano N, Francis G, et al. (2015) Fingolimod effect on brain volume loss independently contributes to its effect on disability. *Mult Scler J* 21:916–924. doi: 10.1177/1352458515569099.
193. Fisher E, Nakamura K, Lee J-C, et al. (2015) Effect of intramuscular interferon beta-1a on gray matter atrophy in relapsing-remitting multiple sclerosis: A retrospective analysis. *Mult Scler J*. doi: 10.1177/1352458515599072.

194. Sierra-Marcos A, Mitjana R, Castelló J, et al. (2010) Lesiones incidentales desmielinizantes en resonancia magnética: Estudio de 11 casos con seguimiento clinicorradiológico y revisión de la bibliografía. *Rev Neurol* 51:129–134.
195. Azevedo CJ, Overton E, Khadka S, et al. (2015) Early CNS neurodegeneration in radiologically isolated syndrome. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation* 2:e102. doi: 10.1212/NXI.0000000000000102.
196. Rojas JI, Patrucco L, Míguez J, et al. (2015) Brain atrophy in radiologically isolated syndromes. *J Neuroimaging* 25:68–71. doi: 10.1111/jon.12182.
197. Filippi M, Rovaris M, Inglese M, et al. (2004) Interferon beta-1a for brain tissue loss in patients at presentation with syndromes suggestive of multiple sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 364:1489–1496. doi: 10.1016/S0140-6736(04)17271-1.
198. Miller D, Barkhof F, Montalban X, et al. (2005) Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis. *Lancet Neurol* 4:281–288. doi: 10.1016/S1474-4422(05)70071-5.
199. Vidal-Jordana A, Sastre-Garriga J, Pérez-Miralles F, et al. (2013) Early brain pseudoatrophy while on natalizumab therapy is due to white matter volume changes. *Mult Scler* 19:1175–1181. doi: 10.1177/1352458512473190.
200. Durand-Dubief F, Belaroussi B, Armspach JP, et al. (2012) Reliability of Longitudinal Brain Volume Loss Measurements between 2 Sites in Patients with Multiple Sclerosis : Comparison of 7 Quantification Techniques. *Am J Neuroradiol* 33:1918–1924.
201. Battaglini M, Jenkinson M, De Stefano N (2012) Evaluating and reducing the impact of white matter lesions on brain volume measurements. *Hum Brain Mapp* 33:2062–2071. doi: 10.1002/hbm.21344.

9 Anexos

Publicaciones y comunicaciones en
congresos derivadas de la presente
tesis

9.1 Pósters en congresos internacionales, publicados en forma de *abstract*

- F.C. Pérez-Miralles, J. Sastre-Garriga, M. Tintoré, C. Nos, H. Perkal, J. Río, M.C. Edo, A. Horga, J. Castelló, C. Auger, E. Huerga, E. Huerga, A. Rovira, X. Montalban. **Magnitude and clinical underpinnings of short-term tissue specific atrophy development in first attacks of multiple sclerosis.** 25th Congress of the European Committee for the Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS). Düsseldorf, 2009
- F. Pérez-Miralles, J. Sastre-Garriga, À. Vidal Jordana, D. Pareto, J. Río, M. Tintoré, C. Auger, Á. Rovira. X. Montalban. **Early brain volume loss on interferon predicts disability progression after 4 years.** 2014 Joint ACTRIMS-ECTRIMS Meeting. Boston (EEUU), 2014

9.2 Comunicaciones orales en congresos, publicadas en forma de *abstract*

- Pérez Miralles F, Sastre Garriga J, Tintoré M, Nos C, Perkal H, Río J, Edo MC, Horga A, Castelló J, Auger C, Huerga E, Rovira A, Montalban X. **Desarrollo a corto plazo de atrofia global y de sustancia gris y blanca en primeros brotes de Esclerosis Múltiple: magnitud y correlato clínico.** LXI Reunión Anual de la Sociedad Española de Neurología, Barcelona 2009
- Pérez Miralles F, Sastre Garriga J, Vidal Jordana A, Pareto Onghena D, Río Izquierdo J, Tintoré Subirana M, Auger C, Rovira Cañellas A, Montalban Gairin X. **La pérdida de volumen cerebral en el primer año tras terapia con interferón- β predice la progresión clínica tras 4 años de seguimiento.** LXVI Reunión Anual de la Sociedad Española de Neurología, Barcelona 2014

9.3 Artículos científicos en revistas indexadas

Pérez-Miralles F, Sastre-Garriga J, Tintoré M, Arrambide G, Nos C, Perkal H, Río J, Edo MC, Horga A, Castelló J, Auger C, Huerga E, Rovira A, Montalban X. **Clinical impact of early brain atrophy in clinically isolated syndromes.** *Mult Scler.* 2013;19(14):1878-86. doi:10.1177/1352458513488231.

Abstract

Background: The impact of global and tissue-specific brain atrophy on conversion to multiple sclerosis (MS) after a clinically isolated syndrome (CIS) is not fully gauged. Objectives: We aimed to determine the magnitude and clinical relevance of brain volume dynamics in the first year after a CIS. Methods: We assessed 176 patients with CIS within 3 months of onset, clinically and by conventional magnetic resonance imaging (MRI) scans, at baseline and 1 year after clinical onset. We determined the percentage of brain volume change (PBVC) and the brain parenchymal (BPF), grey matter (GMF) and white matter (WMF) fractions. Results: The mean follow-up time was 53 months (SD = 16.8): 76 patients (43%) experienced a second attack, 32 (18%) fulfilled MRI-only 2005 McDonald criteria and 68 (39%) remained as CIS. Statistically significant decreases in the volume measures tested were observed in patients with a second attack, for BPF and PBVC; in both MS groups for GMF; whereas in all groups, the WMF was unchanged. Patients with a second attack had larger PBVC decreases (- 0.65% versus + 0.059%; $p < 0.001$). PBVC decreases below - 0.817% independently predicted shorter times to a second attack. Conclusions: Global brain and grey matter volume loss occurred within the first year after a CIS; brain volume loss predicted conversion to MS.

Pérez-Miralles FC, Sastre-Garriga J, Vidal-Jordana A, Río J, Auger C, Pareto D, Tintoré M, Rovira A, Montalban X. **Predictive value of early brain atrophy on response in patients treated with interferon β** . *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2015;2(4):e132. doi: 10.1212/NXI.000000000000132.

Abstract

Objective: To investigate the association between brain volume loss during the first year of interferon treatment and clinical outcome at 4 years. Methods: Patients with multiple sclerosis initiating interferon β were clinically evaluated every 6 months for the presence of relapses and assessment of global disability using the Expanded Disability Status Scale (EDSS). MRI scans were performed at baseline and after 12 months, and the percentage of brain volume change (PBVC), brain parenchymal volume change (BPVc%), gray matter volume change (GMVc%), and white matter volume change (WMVc%) were estimated. Patients were divided based on the cutoff values for predicting confirmed EDSS worsening obtained by receiver operating characteristic analysis for all atrophy measurements. Survival curves and Cox proportional hazards regression to predict disability worsening at last observation were applied, adjusting for demographic, clinical, and radiologic variables. Results: Larger PBVC and WMVc% decreases were observed in patients with disability worsening at 4 years of follow-up, whereas no differences were found in BPVc% or GMVc%. Cutoff points were obtained for PBVC (-0.86%; sensitivity 65.5%, specificity 71.4%) and WMVc% (-2.49%; sensitivity 85.3%, specificity 43.8%). Patients with decreases of PBVC and WMVc% below cutoff values were more prone to develop disability worsening (unadjusted hazard ratio [HR] 3.875, $p = 0.005$; HR 4.246, $p = 0.004$, respectively). PBVC (HR 4.751, $p = 0.008$) and the interaction of new T2 lesions with WMVc% (HR 1.086, $p = 0.005$) were found to be independent predictors of disability worsening in the multivariate analysis. Conclusions: At the patient level, whole-brain and white matter volume changes in the first year of interferon β therapy are predictive of subsequent clinical evolution under treatment.

Clinical impact of early brain atrophy in clinically isolated syndromes

Multiple Sclerosis Journal
19(14) 1678–1886
© The Author(s) 2013
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/1352458513488231
msj.sagepub.com


F Pérez-Miralles^{1,2}, J Sastre-Garriga¹, M Tintoré¹, G Arrambide¹,
C Nos¹, H Perkal¹, J Río¹, MC Edo¹, A Horga¹, J Castelló¹,
C Auger³, E Huerga³, A Rovira³ and X Montalban¹

Abstract

Background: The impact of global and tissue-specific brain atrophy on conversion to multiple sclerosis (MS) after a clinically isolated syndrome (CIS) is not fully gauged.

Objectives: We aimed to determine the magnitude and clinical relevance of brain volume dynamics in the first year after a CIS.

Methods: We assessed 176 patients with CIS within 3 months of onset, clinically and by conventional magnetic resonance imaging (MRI) scans, at baseline and 1 year after clinical onset. We determined the percentage of brain volume change (PBVC) and the brain parenchymal (BPF), grey matter (GMF) and white matter (WMF) fractions.

Results: The mean follow-up time was 53 months (SD = 16.8): 76 patients (43%) experienced a second attack, 32 (18%) fulfilled MRI-only 2005 McDonald criteria and 68 (39%) remained as CIS. Statistically significant decreases in the volume measures tested were observed in patients with a second attack, for BPF and PBVC; in both MS groups for GMF; whereas in all groups, the WMF was unchanged. Patients with a second attack had larger PBVC decreases (– 0.65% versus + 0.059%; $p < 0.001$). PBVC decreases below – 0.817% independently predicted shorter times to a second attack.

Conclusions: Global brain and grey matter volume loss occurred within the first year after a CIS; brain volume loss predicted conversion to MS.

Keywords

Brain atrophy, brain volume, clinically isolated syndrome, disability, grey matter, magnetic resonance imaging, multiple sclerosis

Date received: 30 October 2012; revised: 18 March 2013; accepted: 20 March 2013

Introduction

Multiple sclerosis (MS) has been associated with irreversible brain damage and evidence of an early neurodegenerative process has been reported, not only in acute demyelinating plaques, but also in normal-appearing white and grey matter.¹

Atrophy measurement techniques are nowadays well developed; segmentation-based methods have allowed white and grey matter volumes to be assessed separately.² Grey matter atrophy has been observed independently from white matter atrophy in early MS^{3,4} and it has also been found to be more prominent in those patients with a clinically isolated syndrome (CIS) whom will go on to develop MS.^{3,5,6} Previous studies investigating early development of atrophy (1 year after a CIS) and providing mid-term clinical follow-up did not perform grey and white matter segmentation,⁷ and those providing tissue-specific data did not provide posterior follow-up.⁸ Other

studies have used larger time-frames (from 2–4 years of magnetic resonance imaging (MRI) follow-up) for atrophy detection;^{3,5,6,9} however, no study investigating short-term changes in the global and in the grey and white matter fractions in the first year after a CIS provides posterior

¹Multiple Sclerosis Center of Catalonia (Cemcat), Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.

²Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain.

³Department of Radiology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

Corresponding author:

Jaume Sastre-Garriga, Cemcat, Edifici Antiga Escola d'Infermeria, 2^a planta, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Passeig de la Vall d'Hebron 119–129, Barcelona, 08035, Spain.
Email: jsastre-garriga@cem-cat.org

clinical follow-up, so as to confirm whether early tissue-specific atrophy is a useful marker for prognosis.

The present study aims to investigate the short-term evolution of tissue-specific and global brain atrophy in patients with CIS, to further define their separate clinical relevance, in terms of mid-term disability development, as well as conversion to MS (i.e. receiving a diagnosis of MS by McDonald 2005 criteria).¹⁰

Methods

Patient disposition and clinical measurements

From a total of 368 patients with a CIS prospectively recruited in a long-term longitudinal study ongoing at the MS Center of Catalonia since 2001, we selected a subsample according to the following criteria: (a) less than 50 years of age; (b) less than 12 weeks from the first symptom to clinical assessment; (c) total follow-up time of more than 24 months from the first clinical event; (d) availability of brain MRI examinations performed at 3 and 12 months after the CIS. On this basis, 133 patients were excluded due to a follow-up inferior to 24 months, and a further 59 were excluded because of incomplete MRI protocol and/or suboptimal imaging quality. Finally, a total of 176 patients were included. Demographic and clinical features of the study sample and of patients who were excluded due to incomplete or suboptimal MRI protocol are shown in Table 1. There were no statistically significant differences between these two groups of patients, except for a higher frequency of treatment with intravenous steroids in the study sample, as compared to the group of excluded patients ($p = 0.045$).

All patients were followed up on a 3–6 month basis, where we determined their Kurtzke Expanded Disability Status Scale (EDSS) status¹¹ and assessed the presence of relapses. We performed any diagnoses of MS as per the 2005 McDonald criteria.¹⁰ According to these criteria, all subsequent analyses were performed on the whole sample of patients ($n = 176$), or on any of these three mutually exclusive subgroups: patients with a second attack ($n = 76$), patients fulfilling 2005 McDonald dissemination in time and space criteria only in radiological terms (MRI-only MS, $n = 32$) and patients not fulfilling 2005 McDonald MS criteria (pure CIS, $n = 68$).

MRI methods and brain volume analysis

MRI was performed on a 1.5-T magnet with a standard head coil and included the following pulse sequences: transverse proton density and T2-weighted fast spin-echo (repetition time (TR) 3000 ms/ (TE) 14–85 ms/number of excitations (NEX) 2) and unenhanced and contrast-enhanced (0.1 mmol/kg; imaging delay, 5 min) T1-weighted spin-echo (TR 600/ TE 15/ NEX 2). All sequences obtained

with 3 mm slice thickness, without an interslice gap. MRI scans were performed in each patient at 3 months after the first symptom (baseline MRI scan), and after 1 year (follow-up MRI scan). We evaluated baseline scans as normal/abnormal (defined as absence/presence of subclinical focal brain lesions of the type seen in MS), and we determined the number of lesions and Barkhof-Tintoré criteria, and the number of contrast-enhancing lesions (CEL). We evaluated follow-up scans, comparing them with the baseline study, to assess the presence of radiological dissemination in space and time.¹⁰ MRI scans were performed at least 30 days after the last dose of corticosteroids, if a case had received that therapy.

Baseline and follow-up MRI scans from each subject were analyzed to calculate the brain parenchymal fraction (BPF), grey matter fraction (GMF) and white matter fraction (WMF), using a semi-automated algorithm (spm_segment by Jon Jackson, available at www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/ext/#spm_segment) implemented on Statistical Parametrical Mapping version 5 (SPM5, Wellcome Department of Cognitive Neurology, University College of London, UK) and MRIcro software (Chris Rorden, University of Nottingham, UK). MS lesion masks were created by a trained operator, with the aim of avoiding misclassification of focal white matter lesions as grey matter. Changes from baseline to follow-up in the MRI scans were determined for each fraction. The percentage of brain volume change (PBVC) was calculated by comparing both baseline and follow-up MRI scans using Structural Image Evaluation, using Normalization, of Atrophy (SIENA) software, part of FSL (FMRIB Software Library).^{12,13} PBVC, BPF, and both GMF and WMF variables were grouped into quintiles for further analysis.

Statistical analysis

The analysis was performed using SPSS v17.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL, USA). Percentage changes in tissue fractions were obtained by subtracting the baseline from the 1-year follow-up estimates and dividing by the baseline values, then multiplying by 100. Pearson correlation coefficients were used to assess the presence of linear associations between PBVC, the percentage change in tissue fractions (BPF, GMF and WMF) and clinical and radiological variables, except for EDSS, when Spearman rank correlation coefficients were calculated. Significance values for correlation coefficients are reported without correction for multiple comparisons, to avoid type II errors.¹⁴

We determined survival curves of time to a second attack for each quintile grouping of PBVC, BPF, GMF and WMF; and compared them using the log-rank (Mantel-Cox) test. The Cox proportional hazards regression model ("enter" method) was applied to adjust the global and tissue-specific brain volume/fractions changes for age, gender and use of corticosteroids at the first attack. To investigate

Table 1. Demographic and clinico-radiological characteristics of the study sample and excluded patients. Significant *p* values appear in bold.

	Study sample (<i>n</i> = 176)	Patients excluded ^a (<i>n</i> = 59)	<i>p</i>
Gender (% Female)	70.5	76.3	0.246
Age mean (SD)	30.9 (8.3)	31.2 (8.2)	0.767
First relapse topography (% ON/other)	33.5 / 66.5	37.3 / 62.7	0.354
IV steroid treatment for 1 st attack, % (<i>n</i>)	49.4 (86)	35.6 (21)	0.045
Positive OCB in CSF, % (<i>n</i>)	59.3 (86)	74.4 (32)	0.051
Follow-up time in months, mean (SD)	53 (16.8)	47.9 (19.3)	0.054
Presence of a 2 nd attack, % (<i>n</i>)	43.2 (76)	38.6 (22)	0.326
Time to 2 nd attack in months, mean (SD)	22.4 (19.7)	20 (20.3)	0.620
DMD treatment, % (<i>n</i>)	40.2 (70)	40.7 (24)	0.535
McDonald MS on follow-up, % (<i>n</i>)	58.5 (103)	56.4 (31)	0.448
Abnormal baseline MRI scan, % (<i>n</i>)	77.8 (130)	71 (39)	0.193
3/4 B-T MRI criteria at baseline, % (<i>n</i>)	50.3 (83)	38 (19)	0.086

^aPatients excluded because of suboptimal MRI quality or incomplete MRI protocol.

B-T: Barkhof-Tintoré criteria; CSF: cerebrospinal fluid; DMD: disease modifying drugs; IV: intravenous; MRI: magnetic resonance imaging; MS: multiple sclerosis; OCB: oligoclonal bands; ON: optic neuritis; SD: standard deviation.

the additional predictive value of atrophy, adjusting for all previously-mentioned variables, two models were assessed, each including a different set of MRI parameters, as follows: (a) number of T2 lesions in the baseline MRI scan, presence of CEL in both baseline and follow-up MRI scans, and (b) number of Barkhof-Tintoré MRI criteria. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Sample characteristics

Clinical and demographic features of the patients included in the study are presented in Table 1. A total of 27% of patients' baseline scans had CEL, with a mean number of 5.6 lesions (SD: 7.5). Follow-up MRI scans demonstrated CEL in 27% of patients, although not necessarily in the same patients as before, with a mean number of 2.5 (SD: 2.3). Mean time between the first clinical event and baseline scan was 3.5 months (SD: 1.02). Mean time between baseline and follow-up scans was 8.4 months (SD: 1.8).

Brain volume changes

Whole sample (*n* = 176). Statistically significant decreases were observed for PBVC (mean: -0.29% ; SD: 1.28; $p < 0.001$) and GMF (mean: -0.54% ; SD: 2.1; $p = 0.001$) on the 1-year scan, as compared to baseline. No statistically significant changes were observed for BPF (mean: -0.19% ; SD: 1.58; $p = 0.102$) or WMF (mean: $+0.39\%$; SD: 3.83; $p = 0.175$).

Patients with a second attack (*n* = 76). Statistically significant decreases in global brain volume (PBVC: -0.65% ; SD: 1.34; $p < 0.0001$ and BPF: -0.46% ; SD:

1.79; $p = 0.028$) and in GMF (-0.67% ; SD: 2.31; $p = 0.013$) were observed after 1 year, but no statistically significant changes were detected for WMF. In the group of patients with no further relapses ($n = 100$), no variation in global brain volume was observed (PBVC: -0.02% and BPF: $+0.003\%$), but statistically significant changes were observed in tissue-specific fractions, with a decrease in GMF (-0.45% ; SD: 2.07; $p = 0.03$) and an increase in WMF ($+0.77\%$; SD: 3.52; $p = 0.03$). Patients with a second attack displayed larger PBVC decreases than those without further attacks prior to follow-up (-0.65% versus -0.02% ; $p = 0.001$), while no statistically significant differences were observed for BPF, GMF or WMF changes.

MRI-only MS patients (*n* = 32). A statistically significant decrease in GMF (-0.697% ; SD: 1.747%; $p = 0.031$) was found on the 1-year scan, as compared to baseline. No statistically significant changes were observed for PBVC (mean -0.215% ; SD: 0.899%; $p = 0.186$), BPF (mean -0.040% ; SD: 1.256%; $p = 0.852$) or WMF (mean $+0.938\%$; SD: 2.806%; $p = 0.068$).

Pure CIS patients (*n* = 68). We observed no significant volume changes on the 1-year scan as compared to baseline, neither for global brain volume (mean PBVC $+0.059\%$; SD: 1.282% and mean BPF $+0.023\%$; SD: 1.446%) nor for tissue-specific fractions (mean GMF -0.340% ; SD: 2.212% and mean WMF $+0.695\%$; SD: 3.830).

Intergroup comparison with Bonferroni adjustment. When comparing the three subgroups (patients with a second attack, patients with MRI-only MS and pure CIS patients), statistically significant ($p < 0.001$) differences for mean PBVC were only observed between patients who had a

Table 2. Comparison of brain and tissue-specific volume changes across patients subgroups. Significant *p* values appear in bold.

	2 nd attack (n = 76)		MRI-only MS (n = 32)		Pure CIS (n = 68)		Between groups
	Mean (SD)	<i>p</i>	Mean (SD)	<i>p</i>	Mean (SD)	<i>p</i>	<i>p</i>
PBVC	-0.651 (1.345)	< 0.0001	-0.215 (0.899)	0.186	+0.059 (1.282)	0.707	0.0034
BPF change, %	-0.461 (1.791)	0.028	-0.040 (1.256)	0.852	+0.023 (1.446)	0.895	0.154
GMF change, %	-0.676 (2.315)	0.013	-0.697 (1.74)	0.031	-0.340 (2.212)	0.209	0.600
WMF change, %	-0.072 (4.193)	0.881	+0.938 (2.806)	0.068	+0.695 (3.835)	0.139	0.338

BPF: brain parenchymal fraction; CIS: clinically isolated syndrome; GMF: grey matter fraction; MRI: magnetic resonance imaging; MS: multiple sclerosis; PBVC: percentage brain volume change; SD: standard deviation; WMF: white matter fraction.

Table 3. Clinico-radiological correlations.

	Whole sample (n = 176)			2 nd attack (n = 76)			MRI-only MS (n = 32)			Pure CIS (n = 68)		
	Parameter	r/rho	<i>p</i>	Parameter	r/rho	<i>p</i>	Parameter	r/rho	<i>p</i>	Parameter	r/rho	<i>p</i>
Age	NC	NC	NC	NC	NC	NC	BPF	-0.401	0.023	BPF	0.279	0.021
										GMF	0.241	0.048
CEL, baseline	PBVC	-0.212	0.005	PBVC	-0.239	0.041	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	BPF	-0.160	0.036									
CEL, follow-up	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
T2 lesion load, baseline	PVBC	-0.277	< 0.001	PVBC	-0.293	0.013	NC	NC	NC	NC	NC	NC
				BPF	-0.318	0.007						
ΔT2 lesion load ^a	NC	NC	NC	NC	NC	NC	GMF	0.441	0.012	NC	NC	NC
EDSS ^a												
12 mo	PVBC	-0.198	0.009	NC	NC	NC	BPF	-0.377	0.040	NC	NC	NC
24 mo	NC	NC	NC	NC	NC	NC	BPF	-0.373	0.047	NC	NC	NC
							GMF	-0.445	0.016			
Change 0–12	PVBC	-0.195	0.011	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Change 0–24	BPF	-0.188	0.017	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	GMF	-0.177	0.025									

^aSpearman rank correlation.

BPF, WMF and GMF refer to changes between baseline and follow-up measurements.

2nd Attack: patients with CIS who develop a second attack during the follow-up; BPF: brain parenchymal fraction; change 0–12 and 0–24: changes in EDSS over 0–12 and 0–24 months, respectively; CEL: number of contrast-enhancing lesions; CIS: clinically isolated syndrome; GMF: grey matter fraction; EDSS: Expanded Disability Status Scale; mo: months; MRI: magnetic resonance imaging; MRI-only MS: patients with clinically isolated syndromes who fulfill 2005 McDonald dissemination in time and space criteria only in radiological terms during follow-up; MS: multiple sclerosis; NC: no correlations were found; PBVC: percentage of brain volume change; pure CIS: CIS patients who neither fulfill 2005 McDonald MS criteria nor develop a second attack during the study follow-up; WMF: white matter fraction. ΔT2 lesion load: T2 lesion load change.

second attack and patients in the pure CIS group (Figure 1). No other statistically significant intergroup differences were found for mean BPF, GMF nor WMF changes.

Correlation between brain volume and clinical and radiological outcomes

Whole sample. Larger decreases in brain volume, as measured by PBVC, were found to be related to higher numbers

of CEL ($r = -0.212$; $p = 0.005$), larger T2 lesion loads at baseline ($r = -0.277$; $p < 0.001$), worse EDSS scores at 1 year ($\rho = -0.198$; $p = 0.009$), and larger EDSS increases over 0–12 months of follow-up ($\rho = -0.195$; $p = 0.011$). The BPF decreases were associated with a higher number of gadolinium-enhancing lesions at baseline ($r = -0.160$; $p = 0.036$) and larger EDSS increases over 0–24 months ($\rho = -0.188$; $p = 0.017$). Also, GMF decreases were associated with larger EDSS increases over 0–24 months

Table 4. Cox proportional hazards model for predicting a second attack.

	HR	p	95% CI	
			Inferior	Superior
PBVC				
1st quintile	¹ 2.376	0.031	1.080	5.225
	² 3.108	0.003	1.467	6.588
2nd quintile		ns		
3rd quintile		ns		
4th quintile		ns		
Age of 30 years or less		ns		
Female gender		ns		
Corticosteroid treatment at first attack		ns		
MODEL NUMBER 1¹				
CEL lesions, baseline MRI	2.316	0.004	1.318	4.070
CEL lesions, 1-year MRI		ns		
Number of T2 lesions at baseline MRI scan				
1–9 lesions		ns		
> 9 lesions	3.841	0.021	1.223	12.060
MODEL NUMBER 2²				
Number of Barkhof-Tintoré criteria				
1–2 criteria	5.545	0.001	1.982	15.509
3–4 criteria	7.256	< 0.001	2.827	18.626

¹Model including the presence of gadolinium-enhancing lesions at baseline MRI scan, gadolinium-enhancing lesions at follow-up MRI scan, and the number of T2 lesions in the baseline MRI scan categorized into three groups: 0 lesions, 1–9 lesions and > 9 lesions.

²Model including the number of Barkhof-Tintoré criteria categorized into three groups: 0 criteria, 1–2 criteria, 3–4 criteria.

Common variables to both models^{1,2} were: PBVC categorized into quintiles (intervals shown in Figure 2), age categorized into being below or above 30 years of age, gender, and corticosteroid treatment at first attack.

The 5th quintile (PBVC of 0.360% or above), 0 T2 lesions at baseline MRI scan, and 0 criteria for the number of Barkhof-Tintoré criteria are not shown and are marked as reference for the Cox regression analysis.

CEL: Contrast-enhancing lesions; CI: confidence interval; HR: hazard ratio; MRI: magnetic resonance imaging; ns: non-significant; PBVC: percentage of brain volume change.

($\rho = -0.177$; $p = 0.025$). No statistically significant correlations were found between WMF changes and the clinical or MRI parameters.

Patients with a second attack. Larger decreases in brain volume as measured by PBVC were found to be related to higher numbers of CEL ($r = -0.239$; $p = 0.041$) and larger T2 lesion loads at baseline ($r = -0.293$; $p = 0.013$). Larger BPF decreases were also associated with larger T2 lesion loads at baseline ($r = -0.318$; $p = 0.007$). We observed no other associations between global or tissue-specific changes and clinical or MRI parameters.

MRI-only MS patients. No statistically significant correlations were found between global brain volume changes measured by PBVC and clinical or MRI parameters. Larger BPF decreases were associated with an older age at baseline ($r = -0.401$; $p = 0.023$), and higher EDSS scores at 12 months ($\rho = -0.377$; $p = 0.040$) and 24 months of follow-up ($\rho = -0.373$; $p = 0.047$). Larger GMF decreases were associated with higher EDSS scores at 24 months ($\rho = -0.445$; $p = 0.016$), and GMF increase was associated with an increase in the difference between T2 lesion volumes on

annual and baseline MRIs ($r = 0.441$; $p = 0.012$). No associations with WMF were observed.

Pure CIS patients. In patients who remained with only CIS for the duration of the follow-up, no statistically significant correlations were detected between global brain or tissue-specific volume changes and the clinical or MRI parameters (with the exception of age with BPF and GMF changes).

Effect of disease-modifying drugs (DMDs) and corticosteroids

Treatment with DMDs was significantly associated in all patients with higher rates of global atrophy as detected by SIENA (mean PBVC in treated group -0.67% , versus -0.133% in the untreated group; $p = 0.001$) and a trend by SPM5 (mean BPF change in DMD group -0.5% , versus -0.065% in the untreated group; $p = 0.059$), but not for GMF nor WMF. Nevertheless, statistical significance disappeared when correcting by 2005 McDonald MS conversion or presence of a second relapse, due to high colinearity between conversion variables and the presence of treatment and a higher association with brain volume

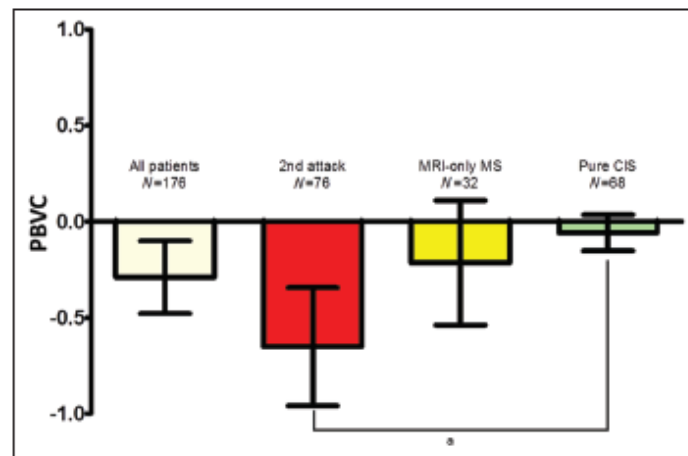


Figure 1. Brain volume change rates (mean with 95% CI).

*Statistically significant difference ($p < 0.001$) on Bonferroni post-hoc test.

2nd attack: patients with CIS who developed a second attack during the follow-up; CI: confidence interval; CIS: clinically isolated syndrome; MRI: magnetic resonance imaging; MRI-only MS: patients with clinically isolated syndromes who fulfill 2005 McDonald dissemination in time and space criteria only in radiological terms during follow-up; MS: multiple sclerosis; PBVC: percentage of brain volume change; Pure CIS: patients not fulfilling McDonald MS criteria during the study follow-up.

variables in the former. No relation was found between the atrophy parameters and treatment with corticosteroids for the first attack.

Brain atrophy over the first year as predictor of a second attack

Patients were grouped into quintiles of PBVC, the first quintile meaning the largest and fifth quintile smallest brain volume loss (Figure 2). Patients grouped into the first quintile ($PBVC \leq -0.8715\%$) were more prone to a second attack over time than the other quintiles ($p = 0.003$). Two models for the Cox proportional hazards regression were used, as explained in the methods section (Table 4). Common variables used were: PBVC (grouped into quintiles), gender, corticosteroid treatment for the first attack, and age (grouped into 30 years old or younger, versus older than 30). Model 1 showed that belonging to the first quintile of PBVC, presenting with CEL and with more than nine T2 lesions at baseline MRI scan were independent predictors of a second attack. Model 2 showed that belonging to the first quintile of PBVC and the number of Barkhof-Tintoré criteria fulfilled at baseline were independent predictors of a second attack. Changes in BPF, GMF and WMF were not found to predict a second attack, either alone or in combination, as per the models above (data not shown).

Discussion

In the present study, we aimed to investigate the magnitude and clinical correlates of global and tissue-specific

brain volume changes in the first year after a CIS. Our results showed that during the first year after a CIS, patients who will develop a second attack during the follow-up time period have larger brain volume losses than those who do not. In parallel, short-term global brain volume loss after a CIS was found to be associated with early disability development and early conversion to MS.

Early development of grey matter atrophy in CIS and conversion to MS

Grey matter volume loss is found in patients at the early stages of relapsing–remitting and primary progressive MS, compared to healthy controls.^{15,16} Its presence in CIS patients was established in a prospective study by Dalton et al.,³ who found grey, but not white matter loss within 3 years after a first attack of MS. In this study, larger grey matter fraction decreases were present in CIS patients that developed MS, as compared to those remaining as CIS at the end of the study. These findings were confirmed and further extended in later studies, using global and regional approaches.^{5,6,8,9,17–20} In all, these studies show that grey and not white matter volume loss is associated with conversion to MS. Our results in both global and tissue-specific atrophy were consistent with these observations, and showed, in a prospective fashion, that not only global brain but also grey matter volume losses were already detectable as early as 1 year after a CIS and were associated with conversion to MS, both on clinical and MRI grounds. Along these lines, there seemed to be a dose-effect-like relationship between clinical disease activity,

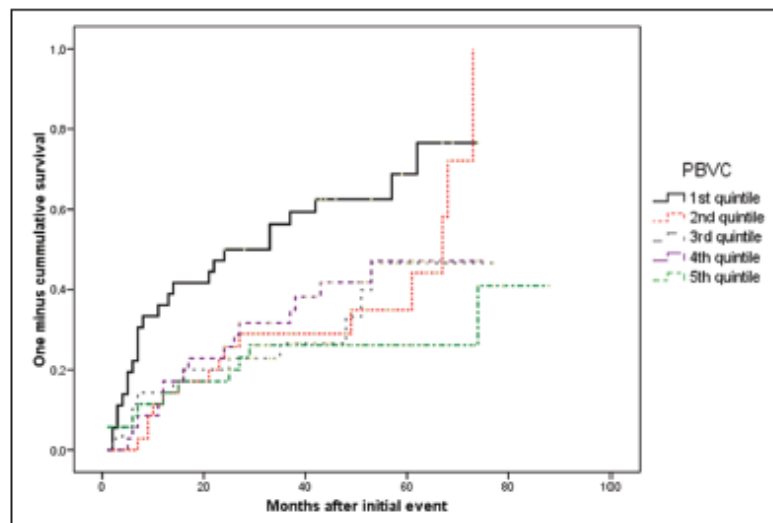


Figure 2. Comparison of survival curves (Mantel-Cox) based on the PBVC, divided into quintiles. 1st quintile (PBVC of -0.817% or below) is shown by a black line; 2nd quintile (PBVC between -0.817% and -0.413%) is shown by a red line; 3rd quintile (PBVC between -0.413% and -0.085%) is shown by a grey line; 4th quintile (PBVC between -0.085% and 0.360%) is shown by a purple line; 5th quintile (PBVC of 0.360% or above) is shown by a green line. PBVC: percentage brain volume change.

and whole brain and grey matter volume loss, so that patients with a second attack might display larger volume losses than patients fulfilling MRI-only MS criteria. In comparison, median values for brain volume percentage reductions in healthy controls are estimated to be of about 0.18% per annum.²¹ Although there appears to be a trend for an increase in WMF in patients with MRI-only MS, no statistically significant differences with patients having a second attack or pure CIS patients were observed. Such results are in line with previous studies.³ A combination of neurodegenerative and inflammatory mechanisms, together with physiological brain volume dynamics, may be at play to produce such results. In this regard, white matter fraction changes in both the MRI-only MS and the pure CIS (which display non-significant WMF increases) patient groups seem to be in keeping with what is described in healthy subjects.^{22,23}

In our study, GMF decreases were not an independent factor of early conversion to MS, but were related with higher EDSS scores during the follow-up. Patients with a PBVC below the first quintile had a 2–3 fold increase in the risk of a second attack by the follow-up assessment, independently of the presence of gadolinium activity at baseline MRI or the presence of demyelinating lesions, suggesting a diagnosis of MS (3–4 Barkhof criteria, or 10 or more lesions). In our models, fulfillment of 3–4 Barkhof criteria at the first MRI remained the most predictive factor for a second attack.

Global and tissue-specific atrophy in CIS and DMDs

Although treatment with DMDs is associated with subsequent global brain atrophy in the total group, this effect seemed to be, at least in this cohort, mostly related to the fact that only those “more severe” patients had an indication for DMDs. In the group of patients converting to McDonald MS, we observed no statistical differences between treated and untreated patients. Therefore, in the reported predictive models, DMDs were not used because of high colinearity with McDonald criteria and a higher predictive power of the latter.

Development of atrophy and disability changes in CIS patients

Global and grey matter atrophy are shown to be related to EDSS changes, especially within the first years of evolution of MS.^{16,24} In patients with CIS, Fisniku et al.¹⁸ show that GMF measured after 20 years from the first attack is independently correlated with EDSS and MSFC scores. Grey matter atrophy has been shown to be a better MRI-derived marker of disability progression than white matter.^{17,18,25} Another study suggests that progression in the MS Functional Composite (MSFC) scale is better predicted by grey matter volume losses than EDSS progression.⁵ Our results were consistent with the presence of an association

between atrophy development (especially with grey matter) and disability accrual, indicating that this association may be already detectable as early as 1 year after a CIS.

Limitations and methodological issues

The present study is limited by the absence of a control group. Therefore, changes in global and tissue-specific brain volumes might be attributed to aging and not to the disease process itself. However, this seems not to be the case, as patients with more "severe" conditions displayed more marked changes in global and tissue-specific brain volumes, showing a plausible dose-effect-like curve. Also, those patients who developed significant brain volume loss during the first year (patients within the first quintile of PBVC) developed a second attack 2-fold quicker than the rest, independently of age, gender and lesion volume. The lack of a control group also made it impossible to detect significant grey matter atrophy already present, as the clinical onset of the disease may not coincide with the beginning of the neurodegenerative process, which could precede the first clinical manifestation by several years.²⁶ An important feature, but not a limitation, of the present study is the non-MRI-based definition of CIS, which may hamper comparability with results from other studies including only CIS patients with proven abnormalities on MRI scans, but which renders our study more similar to clinical practice. It is worth mentioning that a normal MRI scan during the study of a clinically suggestive demyelinating attack does not exclude the possibility of developing MS, especially in patients with the presence of oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid (CSF).²⁷ In this study, we used the 2005 McDonald MS criteria instead of the current 2010 criteria, as the analysis of the MRI scans began in 2008, prior to the publication of the current criteria.²⁸ This is a limitation of the present study, but it is unlikely to significantly influence the results.

In our study, less than 50% of patients were treated with corticosteroids during the first attack. In order to minimize pseudoatrophy effects, we considered for analysis the MRI scan at month 3 as baseline, instead of that performed at the moment of the first attack, thus avoiding both the initial attack-related inflammatory phenomena and the subsequent pseudoatrophy effect due to corticosteroid therapy. In any case, corticosteroid therapy was adjusted for in the statistical analyses, where no influence on the outcomes was observed.

The presence of white matter hypointensities in T1-weighted sequences is known to affect segmentation-based techniques, leading to misclassification of pixels and affecting the accuracy of the results. The effect of such a methodological flaw (only significant in patients with large lesion loads) is that of a spurious increase of grey matter volumes, even after lesion masking.²⁹ Consequently, our findings of significant GMF decreases were most likely to be genuine, rather than produced by such bias.

MRI scans were obtained from a clinical protocol applied since 2001, with a 3 mm slice thickness without interslice gaps. Three-dimensional (3D) pulse sequences with near-isotropic spatial resolution, albeit producing more accurate segmentation outputs by, among other benefits, reducing partial volume errors,³⁰ are rarely applied in clinical practice for the diagnosis or follow-up of patients with CIS or MS. On the other hand, two-dimensional (2D) T1 sequences have been also successfully applied to derive volume measures in the CNS.² It should be also mentioned as a limitation that a newer version of the segmentation software is now available (SPM8); however, the present analysis of MRI scans was performed in 2008 and 2009, when SPM5 was the most tested version of the software package available for segmentation.

We found a trend toward a higher proportion of patients having OCBs in the excluded, as compared to the analyzed, group. This is most likely a random observation and, in any case, no influence in conversion rates was observed, as is shown in Table 1.

Finally, the number of correlations performed may increase the possibility of a type-I error; the plausibility of all correlations reported would argue against these findings being fictitious. However, the probability of a type-I error cannot be ruled out and it is advisable that the present results be confirmed in future studies.

Conclusions

In summary, the findings of the present study seem to indicate that:

1. Brain volume loss was already detectable over the first year after a first demyelinating attack; and it was likely to be due to grey, but not white, matter volume loss; and it was more prominent in CIS patients who will go on to develop MS.
2. An association between very early atrophy development and disability changes in the first and second year after a CIS existed in CIS patients who will later develop MS.

Our results further confirmed and expanded on those of previous studies showing that there is a clinically significant, very early neurodegenerative process in MS that can be detected in grey matter, but not in white matter.

Declaration of conflicting interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Funding

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

References

1. Bjartmar C and Trapp BD. Axonal and neuronal degeneration in multiple sclerosis: Mechanisms and functional consequences. *Curr Opin Neurol* 2001; 14: 271–278.
2. Miller DH, Barkhof F, Frank JA, et al. Measurement of atrophy in multiple sclerosis: Pathological basis, methodological aspects and clinical relevance. *Brain* 2002; 125: 1676–1695.
3. Dalton CM, Chard DT, Davies GR, et al. Early development of multiple sclerosis is associated with progressive grey matter atrophy in patients presenting with clinically isolated syndromes. *Brain* 2004; 127: 1101–1107.
4. Sastre-Garriga J, Ingle GT, Chard DT, et al. Grey and white matter changes in early primary progressive multiple sclerosis: A longitudinal study. *Brain* 2005; 128: 1454–1460.
5. Rudick RA, Lee JC, Nakamura K, et al. Gray matter atrophy correlates with MS disability progression measured with MSFC but not EDSS. *J Neurol Sci* 2009; 282: 106–111.
6. Calabrese M, Rinaldi F, Mattisi I, et al. The predictive value of gray matter atrophy in clinically isolated syndromes. *Neurology* 2011; 77: 257–263.
7. Di Filippo, Anderson VM, Altmann DR, et al. Brain atrophy and lesion load measures over 1 year relate to clinical status after 6 years in patients with clinically isolated syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010; 81: 204–208.
8. Raz E, Cercignami M, Sbardella E, et al. Gray- and white-matter changes 1 year after first clinical episode of multiple sclerosis: MR imaging. *Radiology* 2010; 257: 448–454.
9. Kalincik T, Vaneckova M, Tyblova M, et al. Volumetric MRI markers and predictors of disease activity in early multiple sclerosis: A longitudinal cohort study. *PLoS One* 2012; 7: e50101.
10. Polman CH, Reingold SC, Edan G, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 Revisions to the “McDonald Criteria.” *Ann Neurol* 2005; 58: 840–846.
11. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: An expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983; 33: 1444–1452.
12. Woolrich MW, Jbabdi S, Patenaude B, et al. Bayesian analysis of neuroimaging data in FSL. *Neuroimage* 2009; 45: S173–186.
13. Smith SM, Jenkinson M, Woolrich MW, et al. Advances in functional and structural MR image analysis and implementation as FSL. *Neuroimage* 2004; 23: S208–219.
14. Pemeger TV. What’s wrong with Bonferroni adjustments. *BMJ* 1998; 316: 1236–1238.
15. Chard DT, Griffin CM, Parker GJM, et al. Brain atrophy in clinically early relapsing-remitting multiple sclerosis. *Brain* 2002; 125: 327–337.
16. Sastre-Garriga J, Ingle GT, Chard DT, et al. Grey and white matter atrophy in early clinical stages of primary progressive multiple sclerosis. *Neuroimage* 2004; 22: 353–359.
17. Fisher E, Lee JC, Nakamura K, et al. Gray matter atrophy in multiple sclerosis: A longitudinal study. *Ann Neurol* 2008; 64: 255–265.
18. Fisniku LK, Chard DT, Jackson JS, et al. Gray matter atrophy is related to long-term disability in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2008; 64: 247–254.
19. Calabrese M, Atzori M, Bernardi V, et al. Cortical atrophy is relevant in multiple sclerosis at clinical onset. *J Neurol* 2007; 254: 1212–1220.
20. Raz E, Cercignami M, Sbardella E, et al. Clinically isolated syndrome suggestive of multiple sclerosis: Voxelwise regional investigation of white and gray matter. *Radiology* 2010; 254: 227–234.
21. Raz N and Rodrigue KM. Differential aging of the brain: Patterns, cognitive correlates and modifiers. *Neurosci Biobehav Rev* 2006; 30: 730–748.
22. Courchesne E, Chisum HJ, Townsend J, et al. Normal brain development and aging: Quantitative analysis at in vivo MR imaging in healthy volunteers. *Radiology* 2000; 216: 672–682.
23. Ge Y, Grossman RI, Babb JS, et al. Age-related total gray matter and white matter changes in normal adult brain. Part I: Volumetric MR imaging analysis. *Am J Neuroradiol* 2002; 23: 1327–1333.
24. Horakova D, Dwyer MG, Havrdova E, et al. Gray matter atrophy and disability progression in patients with early relapsing-remitting multiple sclerosis. A 5-year longitudinal study. *J Neurol Sci* 2009; 282: 112–119.
25. Roosendaal SD, Bendfeldt K, Vrenken H, et al. Grey matter volume in a large cohort of MS patients: Relation to MRI parameters and disability. *Mult Scler* 2011; 17: 1098–1106.
26. Sierra-Marcos A, Mitjana R, Castelló J, et al. Demyelinating lesions as incidental findings in magnetic resonance imaging. A study of 11 cases with clinico-radiological follow-up and a review of the literature. *Rev Neurol* 2010; 51: 129–134.
27. Tintoré M, Rovira A, Rio J, et al. Do oligoclonal bands add information to MRI in first attacks of multiple sclerosis? *Neurology* 2008; 70: 1079–1083.
28. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions of the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011; 69: 292–302.
29. Battaglini M, Jenkinson M and De Stefano N. Evaluating and reducing the impact of white matter lesions on brain volume measurements. *Hum Brain Mapp* 2012; 33: 2062–2071.
30. Vrenken H, Jenkinson M, Horsfield MA, et al. Recommendations to improve imaging and analysis of brain lesion load and atrophy in longitudinal studies of multiple sclerosis. *J Neurol Epub ahead of print 12 Dec 2012*. DOI 10.1007/s00415-012-6762-5.

Predictive value of early brain atrophy on response in patients treated with interferon β

OPEN

Francisco Carlos Pérez-Miralles, MD
Jaume Sastre-Garriga, MD
Angela Vidal-Jordana, MD
Jordi Rfo, MD, PhD
Cristina Auger, MD
Deborah Pareto, RT
Mar Tintoré, MD, PhD
Alex Rovira, MD
Xavier Montalban, MD, PhD

Correspondence to
Dr. Sastre-Garriga:
jsastre-garriga@cem-cat.org

ABSTRACT

Objective: To investigate the association between brain volume loss during the first year of interferon treatment and clinical outcome at 4 years.

Methods: Patients with multiple sclerosis initiating interferon β were clinically evaluated every 6 months for the presence of relapses and assessment of global disability using the Expanded Disability Status Scale (EDSS). MRI scans were performed at baseline and after 12 months, and the percentage of brain volume change (PBVC), brain parenchymal volume change (BPVc%), gray matter volume change (GMVc%), and white matter volume change (WMVc%) were estimated. Patients were divided based on the cutoff values for predicting confirmed EDSS worsening obtained by receiver operating characteristic analysis for all atrophy measurements. Survival curves and Cox proportional hazards regression to predict disability worsening at last observation were applied, adjusting for demographic, clinical, and radiologic variables.

Results: Larger PBVC and WMVc% decreases were observed in patients with disability worsening at 4 years of follow-up, whereas no differences were found in BPVc% or GMVc%. Cutoff points were obtained for PBVC (−0.86%; sensitivity 65.5%, specificity 71.4%) and WMVc% (−2.49%; sensitivity 85.3%, specificity 43.8%). Patients with decreases of PBVC and WMVc% below cutoff values were more prone to develop disability worsening (unadjusted hazard ratio [HR] 3.875, $p = 0.005$; HR 4.246, $p = 0.004$, respectively). PBVC (HR 4.751, $p = 0.008$) and the interaction of new T2 lesions with WMVc% (HR 1.086, $p = 0.005$) were found to be independent predictors of disability worsening in the multivariate analysis.

Conclusions: At the patient level, whole-brain and white matter volume changes in the first year of interferon β therapy are predictive of subsequent clinical evolution under treatment. *Neuroimmunol Neuroinflamm* 2015;2:e132; doi: 10.1212/NXI.000000000000132

GLOSSARY

ARR = annualized relapse rate; **BPV** = brain parenchymal volume; **BPVc%** = brain parenchymal volume change; **CEL** = contrast-enhanced lesions; **CI** = confidence interval; **CW** = confirmed worsening; **EDSS** = Expanded Disability Status Scale; **GMV** = gray matter volume; **GMVc%** = gray matter volume change; **HR** = hazard ratio; **MS** = multiple sclerosis; **NEL** = new or enlarging lesions; **PBVC** = percentage of brain volume change; **RRMS** = relapsing-remitting MS; **WMV** = white matter volume; **WMV%** = white matter volume change.

Therapy initiation with interferon β is still the first step in the treatment of many patients with multiple sclerosis (MS). However, patients' response to interferon is variable, and treatment failure may lead to irreversible increases in disability before appropriate therapy switches are implemented.¹ Health care costs incurred in maintaining an inefficient therapy should also be taken into account.² Persistence of biological activity in spite of interferon β therapy will be manifested by the occurrence of new clinical (attacks, disability progression) and MRI activity (new lesions).³ Unfortunately, it is still not possible to accurately predict which patients will have a good response to therapy, so refinement of early markers of failure to respond to interferon β is necessary.⁴

Supplemental data
at Neurology.org/nn

From the Servei de Neurologia/Neuroimmunologia (F.C.P.-M., J.S.-G., A.V.-J., J.R., M.T., X.M.) Multiple Sclerosis Centre of Catalonia (Cemcat) and Unitat de Resonància Magnètica (Servei de Radiologia) (C.A., D.P., A.R.), Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; and Departament de Medicina (F.C.P.-M.), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

Funding information and disclosures are provided at the end of the article. Go to Neurology.org/nn for full disclosure forms. The Article Processing Charge was paid by the authors.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License 4.0 (CC BY-NC-ND), which permits downloading and sharing the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially.

Table 1 Baseline demographic, clinical, and brain volume features of patients included

Study sample (n = 105)		
Age, y, mean (SD)	34.30 (9.05)	
Female sex, n (%)	83 (79)	
Years from first attack to treatment, mean (SD)	4.47 (4.16)	
Positive OCB in CSF (n = 30), n (%)	29 (96.7)	
	Mean (SD)	Median (IQR)
Relapses before treatment		
Second year before (-2 y)	2.05 (0.78)	2.0 (3.0)
First year before (-1 y)	1.5 (0.67)	1.0 (3.0)
Annualized relapse rate = (-2 y + -1 y)/2	1.78 (0.65)	1.5 (2.5)
Median baseline EDSS (IQR)	1.5 (1.0)	
Initial treatment		
Interferon β -1b SC, n (%)	21 (20)	
Interferon β -1a IM, n (%)	38 (36.2)	
Interferon β -1a SC, n (%)	46 (43.8)	
Final treatment		
Maintenance, n (%)	86 (81.9)	
Change to other DMD, n (%)	11 (10.5)	
Withdrawal, n (%)	8 (7.6)	
	Mean (SD)	Median (IQR)
MRI tissue volumes (n = 84)		
Total brain, mL	1,072.63 (110.57)	1,073.17 (146.29)
Gray matter, mL	588.15 (69.74)	585.29 (96.26)
White matter, mL	482.02 (62.76)	484.06 (76.41)

Abbreviations: DMD = disease-modifying drug; EDSS = Expanded Disability Status Scale; IQR = interquartile range; OCB = oligoclonal bands; SC = subcutaneous. Number of patients is 105 if not indicated otherwise.

At the trial level, on-therapy development of whole-brain atrophy and the presence of new lesion activity have been associated with the impact of such therapy on disability in a recent meta-analysis.⁵ However, at the patient level, less is known about the clinical implications of whole-brain or tissue-specific brain volume decreases and at what level this decline is clinically meaningful.

For that reason, we sought to analyze clinical implications of whole-brain and tissue-specific brain volume dynamics early after therapy onset in a cohort of patients initiating treatment with interferon β .

METHODS Patient disposition and clinical measurements.

A total of 124 patients with MS initiating interferon β were selected from an ongoing long-term longitudinal study at the MS Center of Catalonia since 2001 according to the following criteria: (1) more than 48 months since the beginning of treatment with interferon β ;

(2) no previous immunosuppressant or immunomodulatory drug other than interferon β ; and (3) availability of brain MRI examinations performed in the 3 months prior to and 12 months after therapy onset. Eighteen of 124 patients were excluded because of incomplete MRI protocol and/or suboptimal imaging quality; 1 patient was lost to follow-up before 24 months and 2 were lost to follow-up before 48 months (figure e-1 at Neurology.org/nn).

The only second-line treatment approved at the time of observation was mitoxantrone; none of the patients received any currently available second-line therapies or immunosuppressants during the time of observation.

Clinical definitions of annualized relapse rate (ARR) and confirmed Expanded Disability Status Scale (EDSS) worsening (CW) are described in appendix e-1. All patients were clinically assessed for EDSS⁶ and the presence of relapses on a 3- to 6-month basis. Diagnosis of MS was made according to the 2001 McDonald criteria.⁷

MRI acquisition and analysis. MRI scans were performed in each patient within 3 months before initiation of interferon β treatment (baseline MRI scan) and approximately 12 months after therapy began (follow-up MRI scan). Pulse sequences are described in appendix e-1 and are in line with the current recommendations of the Spanish Society of Neurology for the correct interpretation of MRI studies from patients with MS.⁸

Follow-up T2-weighted scans were compared with the baseline scan to assess the presence of new or enlarging lesions (NEL). In both baseline and follow-up scans, number and volume of hyperintense T2 lesions and contrast-enhancing lesions (CEL) were determined using the Dispimage software package.⁹

Baseline and follow-up MRI scans from each patient were analyzed to calculate brain parenchymal volume (BPV), gray matter volume (GMV), and white matter volume (WMV). Changes from baseline to follow-up MRI scans were determined for each volume. Finally, we analyzed the percentage of brain volume change (PBVC) in all patients (n = 105). (Due to segmentation errors produced when determining tissue-specific brain volumes [GMV, WMV], only 84 patients were included in the analysis of tissue-specific variables.) Software specifications are described in appendix e-1.^{10,11}

Statistical analysis. The analysis was performed using SPSS v19.0 (SPSS, Chicago, IL). The Kolmogorov-Smirnoff test was used to assess normality, except if n < 30, when the Shapiro-Wilk test was used instead. Nonparametric tests were preferred when a normal distribution was not assumed.

Cutoff values for all global and tissue-specific brain volume changes were obtained as described in appendix e-1. Survival curves of time to CW for each group were compared using the log-rank test. Cox proportional hazards model ("enter" method) to predict CW after 4 years of follow-up was applied to adjust the cutoff values for global and tissue-specific brain volume changes for age, sex, time from first relapse to treatment, ARR before treatment, presence of further MS attacks within the first year of follow-up, number of NEL after 12 months of therapy, presence of CEL in either baseline or follow-up MRI scan, and baseline volume values. Statistical significance was set at $p < 0.05$. No attempt to correct for multiple comparisons was made in order to avoid type II errors.¹²

RESULTS Sample features at baseline. Baseline demographic, clinical, and brain volume features of the patients included in the study are presented in table 1. Baseline and follow-up lesion-related MRI parameters are shown in table 2.

Table 2 Lesion volumes and numbers from baseline and follow-up MRI scans

	Baseline scan		Follow-up scan		p
	Mean (SD)	Median (IQR)	Mean (SD)	Median (IQR)	
N = 105					
Lesion counts					
T2-weighted scans	68.08 (58.66)	54 (55.0)	70.39 (58.79)	55 (56.5)	0.019 ^a
CEL	2.94 (7.82)	1 (3.0)	0.4 (0.94)	0 (0.0)	<0.001 ^a
Lesion volumes, mL					
T2-weighted scans	7.94 (8.77)	5.04 (7.35)	6.92 (7.30)	4.29 (6.90)	<0.001 ^a
CEL	0.45 (1.36)	0.05 (0.27)	0.05 (0.15)	0 (0.0)	<0.001 ^a
		N (%)	N (%)		p
Presence of CEL		62 (59)	21 (20)		<0.001 ^b

Abbreviations: CEL = contrast-enhancing lesion; IQR = interquartile range.

^a Wilcoxon signed-rank test.

^b McNemar test.

Clinical evolution after interferon β initiation and changes in lesion parameters according to subsequent clinical evolution are shown in appendix e-2 and tables e-1 and e-2.

First-year brain volume change in the whole sample and according to subsequent clinical evolution. *Whole sample.*

Decreases were observed for PBVC ($n = 105$; mean -0.829% , SD 1.128, $p < 0.001$). Statistical Parametric Mapping 8-derived parameters ($n = 84$) showed decreases for BPV change (BPVc%) (mean -0.476% , SD 1.340, $p = 0.002$) and GMV change (GMVc%) (mean -0.727% , SD 2.123, $p = 0.002$) but not for WMV change (WMVc%) (mean -0.099% , SD 2.623, $p = 0.730$) (figure 1).

Summary of first-year volume changes. No differences for any global or tissue-specific measures were observed between patients with or without relapses after 2 or 4 years or with or without CW after 2 years. Larger PBVC and WMVc% decreases within the first year of treatment were observed in patients with CW at 4 years of follow-up, whereas no differences were found in BPVc% or GMVc% (figure 1, table 3).

Predictive models of disability progression on interferon β therapy. *Selection of cutoff points for change in brain volume measurements.*

Cutoff points for brain volume changes associated with CW at 4 years in the univariate analysis (PBVC and WMVc%) were obtained by receiver operating characteristic curves and were as follows (figure e-2): PBVC cutoff = -0.86% (sensitivity 71.4%, 95% confidence interval [CI]

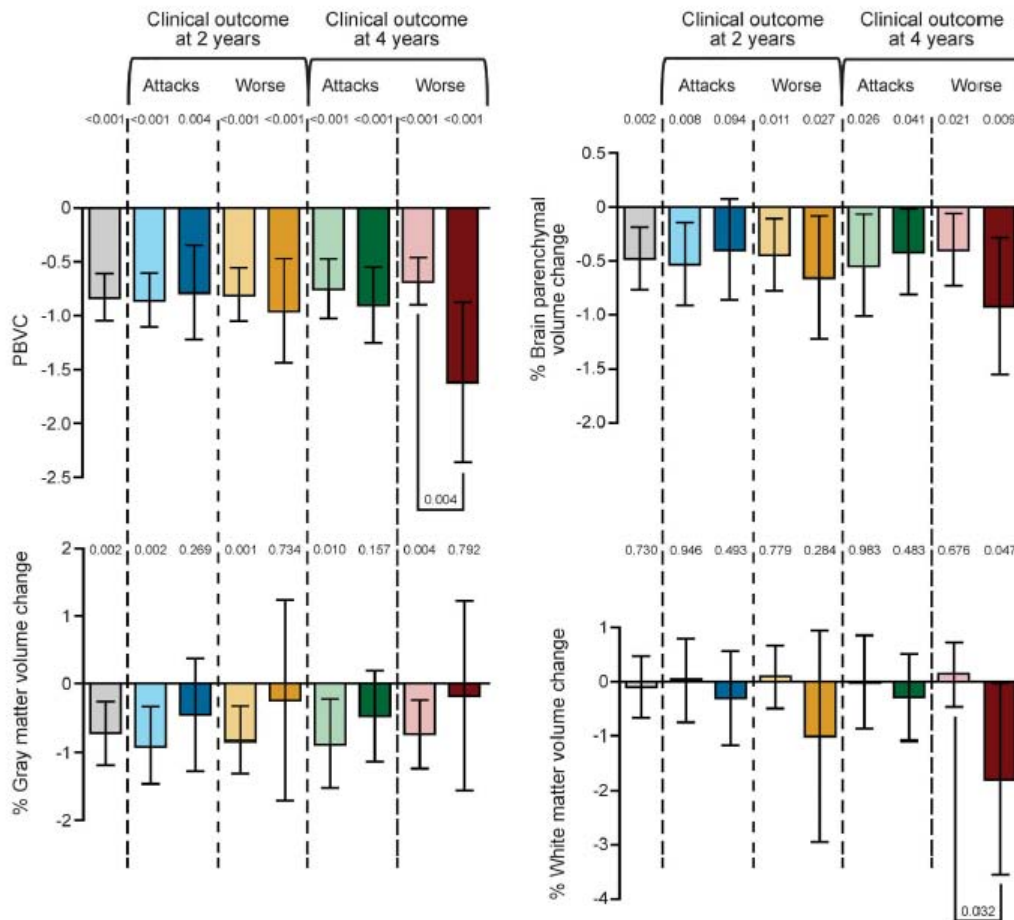
50%–86.2%; specificity 65.5%, 95% CI 54.8%–74.8%) and WMVc% cutoff = -2.49% (sensitivity 85.3%, 95% CI 75%–91.8%; specificity 43.8%, 95% CI 23.1%–66.8%).

Survival analysis. For PBVC, Kaplan-Meier curves (figure 2) up to 4 years showed an early separation of the event-free lines. Patients whose PBVC decreased below the -0.86% cutoff were more prone to develop CW during the 4 years of follow-up (unadjusted hazard ratio [HR] 3.875, 95% CI 1.5–10.0, $p = 0.005$). For WMVc%, Kaplan-Meier curves (figure 2) displayed similar results, indicating that patients losing more than 2.49% of WMV in the first year of interferon β therapy were more likely to develop confirmed EDSS increases during the 4 years of follow-up (unadjusted HR 4.246, 95% CI 1.27–9.20, $p = 0.015$).

Multivariate analysis. Signs of a moderate interaction between NEL and the presence or absence of a WMVc% of -2.49% or lower were detected, but not for PBVC. Although the likelihood of having CW after 4 years of follow-up increases with NEL for both groups of WMVc%, it increases faster for the group with WMVc% $\leq -2.49\%$ (figure e-3), so these variables were expressed as an interaction in the regression model. Two models for the Cox proportional hazards regression were used (figure 3). Common variables used are those already explained in the methods section. Model 1 ($n = 105$) showed that an annual PBVC $\leq -0.86\%$ after treatment (adjusted HR 4.647, 95% CI 1.479–14.603, $p = 0.009$), the number of NEL, and the presence of relapses during the first year of therapy were independent predictors for developing CW. Model 2 ($n = 84$) indicated that the interaction between NEL and annual WMVc% $\leq -2.49\%$ after treatment (adjusted HR 1.073, 95% CI 1.012–1.137, $p = 0.018$), together with the presence of relapses in the first year of therapy, were independent predictors for CW. BPVc% and GMVc%, either alone or in combination, were not found to predict sustained progression as per the models above (data not shown).

DISCUSSION The present study aimed to investigate the association between the development of global and regional (gray and white matter) brain atrophy during the first year of treatment and evolution of disability in the medium-term. Our results showed that during the first year of therapy with interferon β , patients with relapsing-remitting MS (RRMS) who have annual global brain volume losses beyond -0.86% are at a higher risk of CW at 4 years than those above that threshold. In addition, the effect of the number of new or enlarged T2 lesions on the probability of having CW seems to be enhanced in those patients who develop WMV decreases in excess of -2.49% after the first year of therapy.

Figure 1 Global brain and tissue-specific volume change rates (mean with 95% confidence interval)



The p value from a one-sample t test is shown above each bar. Statistically significant differences in the intergroup analysis are linked with the p value shown above the connecting line. Gray bars represent results from the whole cohort. Light-colored bars represent patients without the feature indicated above (further attacks or confirmed Expanded Disability Status Scale [EDSS] worsening). Dark-colored bars represent patients with the feature indicated above (further attacks or confirmed EDSS worsening). % change: $100 \times [\text{first year volume} - \text{baseline volume}] / [\text{baseline volume}]$. Attacks = presence of further attacks after interferon β therapy; PBVC = percentage brain volume change; Worse = confirmed EDSS worsening.

Currently, clinical (presence of attacks, confirmed disability worsening) and MRI lesion-related parameters (presence of new T2 or contrast-enhancing lesions) are used in combination to detect treatment failure.¹³ In this regard, MRI lesion activity has gained ground as a surrogate marker in disease activity monitoring and for the detection of patients with suboptimal response to therapy, as it is now fully integrated into virtually all proposed definitions of treatment failure.^{14,15} However, a neurodegenerative process due to neuroaxonal damage, not only at MRI-visible lesion sites but also in normal-appearing brain tissue, is already present from very early in the disease course and is thought to be responsible for the

development of irreversible disability.^{16,17} Therefore, brain volume loss (atrophy), a measure of brain tissue integrity and a proxy for neurodegeneration, has been proposed as a potential prognostic tool in MS on the grounds that quantification of MS lesions alone does not fully reflect the clinically relevant pathogenic processes. Brain volume is relatively easy to measure through conventional MRI, for which sufficiently sensitive and reproducible methods have been developed, and seems to correlate with established neurologic disability better than lesion-related measurements.^{18,19}

Global brain atrophy is a reliable marker for predicting CW at the trial level. A recent meta-analysis that evaluated a large number of recently performed

Table 3 Summary of the first-year brain volume changes according to clinical evolution after 4 years

	According to the presence of further relapses					According the presence of confirmed EDSS worsening				
	Relapse-free patients, Mean (SD)	<i>p</i> ^a	Presence of further attacks, Mean (SD)	<i>p</i> ^a	<i>p</i> ^b	Progression-free patients, Mean (SD)	<i>p</i> ^a	Patients with confirmed worsening, Mean (SD)	<i>p</i> ^a	<i>p</i> ^b
PBVC	-0.751 (0.965)	<0.001	-0.901 (1.287)	<0.001	0.488	-0.683 (1.030)	<0.001	-1.618 (1.395)	<0.001	0.004
	<i>n</i> = 38		<i>n</i> = 44			<i>n</i> = 70		<i>n</i> = 12		
BPVc%	-0.539 (1.432)	0.026	-0.413 (1.302)	0.041	0.590	-0.396 (1.400)	0.021	-0.915 (1.000)	0.009	0.233
GMVc%	-0.874 (1.974)	0.010	-0.475 (2.186)	0.157	0.403	-0.743 (2.074)	0.004	-0.171 (2.192)	0.792	0.512
WMVc%	-0.009 (0.482)	0.983	-0.281 (2.630)	0.483	0.649	+0.126 (2.505)	0.676	-1.791 (2.726)	0.047	0.032

Abbreviations: BPVc% = percentage brain parenchymal volume change; GMVc% = percentage gray matter volume change; PBVC = percentage brain volume change; WMVc% = percentage white matter volume change.

Percentage changes are expressed as: $100 \times (\text{follow-up MRI volume} - \text{baseline MRI volume}/\text{baseline MRI volume})$.

^a One-sample *t* test.

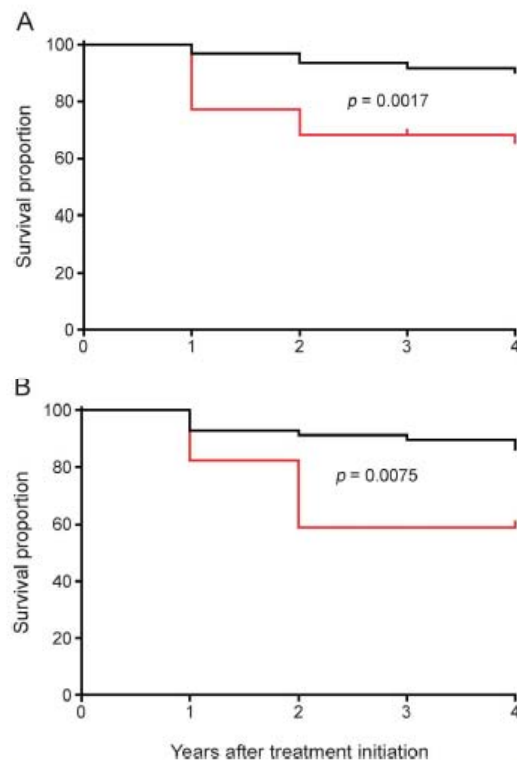
^b Mann-Whitney *U* test.

clinical trials showed that the treatment effect on global brain atrophy explained almost 50% of the variance in treatment effect on 2-year disability worsening.⁵ Nevertheless, to our knowledge, no threshold of

clinically significant volume loss at a patient level has been proposed, and its exact clinical impact on prognosis has not been reported.

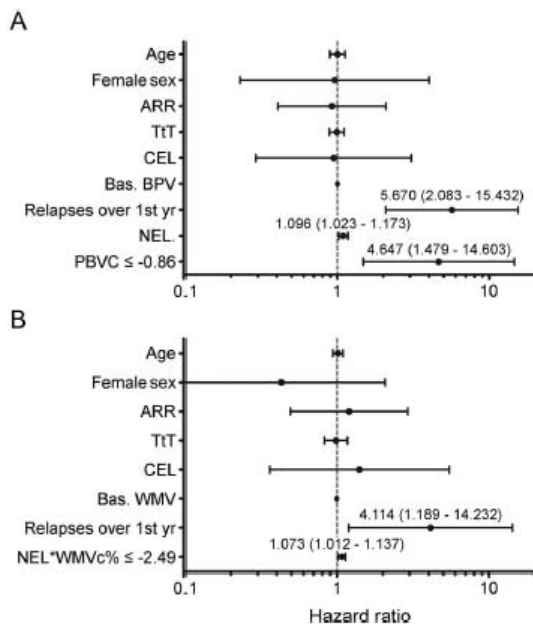
Global brain atrophy rates vary from -0.7% to -1.2% per year in patients with RRMS treated with placebo,²⁰ compared to 0.18% per annum in healthy controls.²¹ Our study proposes cutoff values of global and WMV changes for the individual prediction of further CW during the first 4 years of follow-up after starting treatment with interferon β .²²

It is important to highlight that the positive predictive values of the reported brain atrophy cutoff points for predicting CW are low (PBVC 34%, WMVc% 41.2%), which means that an isolated value of volume change below the cutoff is a poor marker of progression and that the occurrence of new attacks or new lesions also contributes significantly to predictive models of clinical progression. This may be due to the pseudoatrophy that occurs during the first year of treatment, which seems to be more apparent in high-dose interferon β regimens^{23,24} than low-dose regimens.^{25,26} Pseudoatrophy is brain volume reduction due to the loss of cerebral water content and the resolution of the inflammatory phenomena and not as a consequence of irreversible tissue injury.²⁷ This effect could be mitigated by using scans performed at least 3 months after starting therapy as baseline.²⁸ On the contrary, the negative predictive values of the reported brain atrophy cutoff values are high (PBVC 90%, WMVc% 87%), indicating that these measurements could be an important early prognostic tool in the clinical setting, since patients displaying volume changes above the cutoff values have a very low probability of CW in the subsequent follow-up. Because of simpler calculation and a higher HR than WMVc%, PBVC could be the measure of choice for use in clinical practice settings. Finally, the acquisition of a second-year MRI scan would add useful information and would further help

Figure 2 Comparison of survival curves based on confirmed Expanded Disability Status Scale worsening

(A) According to the percentage brain volume change divided into 2 groups: $\leq -0.86\%$ (red line) or $> -0.86\%$ (black line). (B) According to the percentage of white matter volume change divided into 2 groups: $\leq -2.49\%$ (red line) or $> -2.49\%$ (black line).

Figure 3 Cox proportional hazards regression models for predicting confirmed Expanded Disability Status Scale worsening at 4 years of follow-up



Hazard ratios are plotted with 95% confidence interval. (A) Model including percentage of brain volume change (PBVC) categorized into $\leq -0.86\%$ or higher. (B) Model including percentage of white matter volume change (WMVc%) categorized into $\leq -2.49\%$ or higher as an interaction with number of new or enlarged T2 lesions after 12 months of therapy (NEL). ARR = annualized relapse rate as the mean of relapses of the 2 years before starting treatment; Bas. BPV = baseline brain parenchymal volume; Bas. WMV = baseline white matter volume; CEL = contrast-enhancing lesions; TtT = time in years since the first attack until the start of therapy with interferon β ; WMVc% = $(100 \times [\text{first year WMV} - \text{baseline WMV}] / \text{baseline WMV})$.

to differentiate patients in whom only pseudoatrophy was driving brain volume changes from those in whom neurodegeneration was also present; however, early identification of nonresponders is key, so first-year MRI scans are preferable.

We did not find any association between GMV changes and clinical evolution, which might be inconsistent with a large body of literature reporting a close correlation between gray matter atrophy and disability.²⁹ In a previous study, therapy with interferon β was described as slowing the progression of global and gray matter atrophy.³⁰ However, recent results from large randomized placebo-controlled clinical trials of teriflunomide and laquinimod seem to indicate that the anti-inflammatory effect of current MS therapies might be better captured through WMV changes.^{31,32} Along these lines, at the trial level, surrogate markers valid for predicting treatment response may not be as useful for predicting the outcomes in the placebo arm and vice versa.^{3,33,34} On the other hand, it is known that segmentation-based techniques are prone to

misclassify lesional areas as gray matter even after lesion masking, especially in cases with large lesion loads.³⁵ Patients with further attacks or CW tend to have larger lesion volumes and counts (and this is especially relevant in patients with CW after 4 years); therefore, random measurement errors could explain the high variability of GMVc% in these patients. Finally, it is possible that cognitive performance outcomes might have shown significant associations with GMV changes.

It is now well-established that the presence of new lesions in the first year of interferon β therapy conveys prognostic information.^{1,4,15,33} Our study is consistent with this finding and adds novel information: the effect of the appearance of new lesions on the risk of CW is modified according to the presence or absence of WMV loss so that every new lesion increases the risk of progression, particularly in conjunction with WMVc% of -2.49% or lower. In models using whole-brain volume changes obtained with SIENA (PBVC), new lesions and relapses in the first year of therapy are also significant predictors of future evolution; this is in agreement with previous findings in this area^{3,13} and incorporates brain volume loss as a marker of response to interferon β that is amenable to use as a dichotomous variable in clinical practice. Future studies are needed to confirm these findings, especially when treatment failure of drugs other than interferon β is to be addressed. Finally, in line with most previous studies, the impact of baseline features was not significant in the present study¹⁴; however, it would be advisable to further investigate their possible role in determining response to treatment.

An important limitation is that the spatial resolution of the MRI scans is nonisotropic because images were obtained from a protocol first implemented in 2001 and volumetric 3D pulse sequences were seldom applied in MS clinical practice. Although 3D isotropic sequences reduce partial volume errors more efficiently than nonisotropic T1 sequences,¹⁸ the latter have been applied to extract brain volume measures in a number of studies and by our own group.^{16,25,36-38} Also, segmentation techniques have a poor scan-rescan accuracy for longitudinal studies compared with registration methods such as SIENA.³⁹ This might explain the robustness of the PBVC measure compared with tissue-specific volumes in our series. The relatively low proportion of patients with CW may also have increased dispersion of the sample and therefore affected the accuracy of tissue-specific measurements. Type I error cannot be ruled out due to the number of correlations performed; however, the verisimilitude of all the associations reported plus the multivariate analysis would argue against these findings being spurious. However, corrections for multiple comparisons were not performed statistically, and a substantial

proportion of the MRI-clinical correlations assessed were not significant. It is thus recommended that these results be confirmed in future studies. A further limitation of the present study, which is related to its observational design, is the lack of a placebo arm, so we cannot definitively conclude whether the results are due to natural history or real response to treatment.

Our study indicates that brain volume changes in the first year of interferon β therapy are predictive of subsequent clinical evolution under treatment along with other clinical and MRI-derived measurements and proposes cutoff values for reference in future confirmatory studies.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Dr. Francisco Carlos Pérez-Miralles contributed to selecting the patients, analyzing the clinical and volumetric MRI data, developing the statistical studies, discussing the results, and writing the manuscript. Dr. Jaume Sastre-Garriga contributed to designing the study, selecting the patients, analyzing the clinical and volumetric MRI data, developing the statistical studies, discussing the results, and writing the manuscript. Dr. Àngela Vidal-Jordana contributed to acquisition of clinical data, analyzing the clinical and volumetric MRI data, and drafting/revising the manuscript for content. Dr. Jordi Río contributed to acquisition of clinical data and drafting/revising the manuscript for content. Dr. Cristina Auger contributed to analyzing the MRI data and drafting/revising the manuscript for content. Ms. Deborah Pareto contributed to analyzing the MRI data and drafting/revising the manuscript for content. Dr. Mar Tintoré contributed to acquisition of clinical data and drafting/revising the manuscript for content. Dr. Alex Rovira contributed to analyzing the MRI data, discussing the results, and drafting/revising the manuscript for content. Dr. Xavier Montalban contributed to acquisition of clinical data, discussing the results, and drafting/revising the manuscript for content.

STUDY FUNDING

No targeted funding reported.

DISCLOSURE

F.C. Pérez-Miralles received speaker honoraria from Almirall, Biogen Idec, Genzyme, Novartis, Sanofi-Aventis, and Teva. J. Sastre-Garriga is on the scientific advisory board for Novartis, Bayer-Schering, Teva, Merck-Serono, and Biogen; received speaker honoraria from Novartis, Sanofi-Aventis, Teva, Serono Symposia International Foundation, Lundbeck, Biogen, Merck-Serono, Universitat Jaume I de Castelló, Almirall, Bayer-Schering, and Genzyme; is on the editorial board for *Multiple Sclerosis Journal* and *Latin American Multiple Sclerosis*; has consulted for Roche and Almirall; and received research support from Genzyme. A. Vidal-Jordana received speaker honoraria from Serono Symposia, Teva, and Sanofi-Aventis and received travel support from Novartis. J. Río received compensation for participating on advisory boards from Biogen Idec, Genzyme, and Novartis and received speaker honoraria from Schering-Bayer, Serono, Biogen, and Teva. C. Auger and D. Pareto report no disclosures. M. Tintoré is on the advisory board for Biogen, Novartis, and Genzyme; received travel funding from Bayer, Teva, Biogen Idec, Merck-Serono, Novartis, Sanofi-Aventis, and Genzyme; received speaker honoraria from Bayer, Teva, Biogen Idec, Merck-Serono, Novartis, Sanofi-Aventis, and Genzyme; is an advisory board member for *Multiple Sclerosis Journal*, *Neurologia*, and *Revista de Neurologia*, is an editor of *Multiple Sclerosis Journal—Experimental, Translational and Clinical*, and received research support from Bayer, Teva, Biogen Idec, Merck-Serono, Novartis, Sanofi-Aventis, Genzyme, and Spanish Agency for Sanitary Investigations. A. Rovira is on the scientific advisory board for Novartis, Biogen, and Genzyme; received travel funding and/or speaker honoraria from Bayer, Teva, Genzyme, Bracco, Merck-Serono,

Biogen Idec, and Olea; is on the editorial board of *American Journal of Neuroradiology* and *Neuroradiology*; and is on the speakers' bureau for Bayer, Teva, Genzyme, Bracco, Merck-Serono, Biogen Idec, and Olea. X. Montalban is on the scientific advisory board for Novartis, Teva Pharmaceutical, Merck-Serono, Biogen, Bayer-Schering Pharma, GSK, Almirall, Neurotec Pharma, Actellion, Genzyme, Octapharma, Receptos, Roche, Sanofi-Aventis, Trophos, and Lilly; received travel funding from Novartis, Teva Pharmaceutical, Merck-Serono, Biogen, Bayer-Schering Pharma, GSK, Almirall, Neurotec Pharma, Actellion, Genzyme, Octapharma, Receptos, Roche, Sanofi, Trophos, and Lilly; is on the editorial board for *Multiple Sclerosis*, *Journal of Neurology*, *The International MS Journal*, *Revista de Neurologia*, and *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*; has consulted for Novartis, Teva, Merck-Serono, Biogen, Bayer-Schering Pharma, GSK, Almirall, Neurotec Pharma, Actellion, Genzyme, Octapharma, Receptos, Roche, Sanofi, Trophos, and Lilly; and has received research support from Multiple Sclerosis Foundation of Barcelona. Go to Neurology.org/nn for full disclosure forms.

Received March 2, 2015. Accepted in final form May 20, 2015.

REFERENCES

- Río J, Castelló J, Rovira A, et al. Measures in the first year of therapy predict the response to interferon beta in MS. *Mult Scler* 2009;15:848–853. doi: 10.1177/1352458509104591.
- Kobelt G, Berg J, Lindgren P, Fredrikson S, Jönsson B. Costs and quality of life of patients with multiple sclerosis in Europe. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006;77:918–926. doi: 10.1136/jnnp.2006.090365.
- Bemel RA, You X, Foulds P, et al. Predictors of long-term outcome in multiple sclerosis patients treated with interferon β . *Ann Neurol* 2013;73:95–103. doi: 10.1002/ana.23758.
- Río J, Nos C, Tintoré M, et al. Defining the response to interferon-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 2006;59:344–352. doi: 10.1002/ana.20740.
- Sormani MP, Arnold DL, de Stefano N. Treatment effect on brain atrophy correlates with treatment effect on disability in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2014;75:43–49. doi: 10.1002/ana.24018.
- Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983;33:1444–1452.
- McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001;50:121–127.
- Rovira A, Tintoré M, Álvarez-Cemeño JC, Izquierdo G, Prieto JM. Recomendaciones para la utilización e interpretación de los estudios de resonancia magnética en la esclerosis múltiple. *Neurologia* 2010;25:248–265. doi: 10.1016/j.nrl.2010.03.001.
- Plummer D. Dispimage: a display and analysis tool for medical images. *Riv Neuroradiol* 1992;5:1715–1720.
- Smith SM, Zhang Y, Jenkinson M, et al. Accurate, robust, and automated longitudinal and cross-sectional brain change analysis. *Neuroimage* 2002;17:479–489.
- Smith SM, Jenkinson M, Woolrich MW, et al. Advances in functional and structural MR image analysis and implementation as FSL. *Neuroimage* 2004;23(suppl 1):S208–S219. doi: 10.1016/j.neuroimage.2004.07.051.
- Perneger TV. What's wrong with Bonferroni adjustments. *BMJ* 1998;316:1236–1238.
- Sormani MP, De Stefano N. Defining and scoring response to IFN- β in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2013;9:504–512. doi: 10.1038/nrneurol.2013.146.

14. Río J, Rovira A, Tintoré M, et al. Relationship between MRI lesion activity and response to IFN-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 2008;14:479-484. doi: 10.1177/1352458507085555.
15. Somani MP, Río J, Tintoré M, et al. Scoring treatment response in patients with relapsing multiple sclerosis. *Mult Scler* 2013;19:605-612. doi: 10.1177/1352458512460605.
16. Pérez-Miralles F, Sastre-Garriga J, Tintoré M, et al. Clinical impact of early brain atrophy in clinically isolated syndromes. *Mult Scler* 2013;19:1878-1886. doi: 10.1177/1352458513488231.
17. Dalton CM, Chard DT, Davies GR, et al. Early development of multiple sclerosis is associated with progressive grey matter atrophy in patients presenting with clinically isolated syndromes. *Brain* 2004;127:1101-1107. doi: 10.1093/brain/awh126.
18. Vrenken H, Jenkinson M, Horsfield MA, et al. Recommendations to improve imaging and analysis of brain lesion load and atrophy in longitudinal studies of multiple sclerosis. *J Neurol* 2013;260:2458-2471. doi: 10.1007/s00415-012-6762-5.
19. Bermel RA, Bakshi R. The measurement and clinical relevance of brain atrophy in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2006;5:158-170. doi: 10.1016/S1474-4422(06)70349-0.
20. Zivadinov R, Bakshi R. Central nervous system atrophy and clinical status in multiple sclerosis. *J Neuroimaging* 2004;14(3 suppl):27S-35S. doi: 10.1177/1051228404266266.
21. Raz N, Rodrigue KM. Differential aging of the brain: patterns, cognitive correlates and modifiers. *Neurosci Biobehav Rev* 2006;30:730-748. doi: 10.1016/j.neubiorev.2006.07.001.
22. Rojas JI, Patrucco L, Miguez J, Besada C, Cristiano E. Brain atrophy as a non-response predictor to interferon-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurol Res* 2014;36:615-618.
23. Kappos L, Freedman MS, Polman CH, et al. Effect of early versus delayed interferon beta-1b treatment on disability after a first clinical event suggestive of multiple sclerosis: a 3-year follow-up analysis of the BENEFIT study. *Lancet* 2007;370:389-397.
24. De Stefano N, Comi G, Kappos L, et al. Efficacy of subcutaneous interferon beta-1a on MRI outcomes in a randomised controlled trial of patients with clinically isolated syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2014;85:647-653. doi: 10.1136/jnnp-2013-306289.
25. Filippi M, Rovaris M, Inglese M, et al. Interferon beta-1a for brain tissue loss in patients at presentation with syndromes suggestive of multiple sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2004;364:1489-1496. doi: 10.1016/S0140-6736(04)17271-1.
26. Rudick RA, Fisher E, Lee JC, Duda JT, Simon J. Brain atrophy in relapsing multiple sclerosis: relationship to relapses, EDSS, and treatment with interferon beta-1a. *Mult Scler* 2000;6:365-372.
27. Zivadinov R, Reder AT, Filippi M, et al. Mechanisms of action of disease-modifying agents and brain volume changes in multiple sclerosis. *Neurology* 2008;71:136-144. doi: 10.1212/01.WNL.0000316810.01120.05.
28. Hardmeier M, Wagenpfeil S, Freitag P, et al. Rate of brain atrophy in relapsing MS decreases during treatment with IFNbeta-1a. *Neurology* 2005;64:236-240. doi: 10.1212/01.WNL.0000149516.30155.B8.
29. Geurts JGG, Calabrese M, Fisher E, Rudick RA. Measurement and clinical effect of grey matter pathology in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2012;11:1082-1092. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70230-2.
30. Zivadinov R, Locatelli L, Cookfair D, et al. Interferon beta-1a slows progression of brain atrophy in relapsing-remitting multiple sclerosis predominantly by reducing gray matter atrophy. *Mult Scler* 2007;13:490-501. doi: 10.1177/1352458506070446.
31. Wolinsky JS, Narayana PA, Nelson F, et al. Magnetic resonance imaging outcomes from a phase III trial of teriflunomide. *Mult Scler* 2013;19:1310-1319. doi: 10.1177/1352458513475723.
32. Filippi M, Rocca MA, Pagani E, et al. Placebo-controlled trial of oral laquinimod in multiple sclerosis: MRI evidence of an effect on brain tissue damage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2014;85:851-858. doi: 10.1136/jnnp-2013-306132.
33. Dobson R, Rudick RA, Turner B, Schmierer K, Giovannoni G. Assessing treatment response to interferon-beta: is there a role for MRI? *Neurology* 2014;82:248-254. doi: 10.1212/WNL.000000000000036.
34. Goodin DS, Traboulsee A, Knappertz V, et al. Relationship between early clinical characteristics and long term disability outcomes: 16 year cohort study (follow-up) of the pivotal interferon beta-1b trial in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012;83:282-287. doi: 10.1136/jnnp-2011-301178.
35. Battaglini M, Jenkinson M, De Stefano N. Evaluating and reducing the impact of white matter lesions on brain volume measurements. *Hum Brain Mapp* 2012;33:2062-2071. doi: 10.1002/hbm.21344.
36. Miller DH, Barkhof F, Frank JA, Parker GJM, Thompson AJ. Measurement of atrophy in multiple sclerosis: pathological basis, methodological aspects and clinical relevance. *Brain* 2002;125:1676-1695.
37. Vidal-Jordana A, Sastre-Garriga J, Pérez-Miralles F, et al. Early brain pseudoatrophy while on natalizumab therapy is due to white matter volume changes. *Mult Scler* 2013;19:1175-1181. doi: 10.1177/1352458512473190.
38. Miller D, Barkhof F, Montalban X, Thompson A, Filippi M. Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis. *Lancet Neurol* 2005;4:281-288. doi: 10.1016/S1474-4422(05)70071-5.
39. Durand-Dubief F, Belaroussi B, Armspach JP, et al. Reliability of longitudinal brain volume loss measurements between 2 sites in patients with multiple sclerosis: comparison of 7 quantification techniques. *AJNR Am J Neuroradiol* 2012;33:1918-1924.